

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

ÂNGELA ALVES VIEGAS

**Caracterização Genotípica do HIV-1 em Pacientes dos
Estados do Tocantins e Mato Grosso**

**Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Mariane Martins de Araújo Stefani**



Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO, 2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E
SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

ÂNGELA ALVES VIEGAS

**Caracterização Genotípica do HIV-1 em Pacientes dos
Estados do Tocantins e Mato Grosso**

**Orientadora:
Prof.^a Dr.^a Mariane Martins de Araújo Stefani**

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

**Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do
CNPq, processo n° 474174/03-4.**

Goiânia-GO, 2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(GPT/BC/UFG)

Viegas, Ângela Alves.

V656c **Caracterização genotípica do HIV-1 em pacientes dos estados do**

Tocantins e Mato Grosso [manuscrito] / Ângela Alves Viegas . – 2008.

85 f.: il., color., figs., grafs.

Orientadora: Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani.

**Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Insti-
tuto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2008.**

Bibliografia: f.56-84.

Inclui lista de abreviaturas e de figuras e tabelas.

Anexos.

1. HIV-1(vírus) – Diversidade genotípica 2. Infecção por HIV-1 – Pacientes – Tocantins (TO) 3. Infecção por HIV-1 – Pacientes – Mato Grosso (MT) I. Stefani, Mariane Martins de Araújo. II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU:616.98:578.828

DEDICATÓRIA

Aos meus pais

Maria Alice Alves Viegas

e José Antonio Viegas

por serem os meus grandes incentivadores

e verdadeiros mestres na minha jornada,

Ao meu grande companheiro

Thiago Santos

por todas as horas de carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por guiar os meus passos.

A Profa. Dra. Gisner Pereira, pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

A Mestre Ludimila Paula Vaz Cardoso, pela amizade, horas de estudo, dedicação e paciência.

A Profa. Dra. Samira Buhner Sekula pelas palavras de sabedoria e apoio.

A Banca do Exame de Qualificação, composta pelos professores, Dra. Sílvia Helena Rabelo dos Santos, Dr. Luiz Arthur Mendes Bataus e Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro pelas sugestões apresentadas.

Aos demais professores do Setor de Imunologia-DMIPP e funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFPA, pela boa convivência durante este trabalho.

As colaboradoras dos LACENs regionais, Maria Selma Soares (TO) e Aparecida Hg Mussi (MT), pelo recrutamento dos pacientes.

*A todos os meus amigos do laboratório pelo companheirismo e amizade:
Alexsander, Lucas, Adriano, Rejane e Mônica.*

Ao CNPq pelo auxílio financeiro através da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana.....	01
1.2. Origem do HIV.....	03
1.3. Classificação do HIV-1.....	04
1.4. Diversidade Genética do HIV-1.....	06
1.5. Formas Recombinantes do HIV-1.....	07
1.6. Transmissão do HIV-1.....	09
1.7. Ciclo replicativo do HIV-1.....	10
1.8. Patogênese do HIV-1.....	13
1.9. Números de Casos de HIV+/aids.....	15
1.10. Técnicas para Caracterização Molecular do HIV-1.....	17
1.10.1. Ensaio da Mobilidade do Heteroduplex.....	18
1.11. Epidemiologia Molecular do HIV-1.....	19

1.12. Impacto da Diversidade Sobre a Transmissão e Progressão da Doença.....	22
2. JUSTIFICATIVA.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Área Geográfica.....	25
4.1.1. Estado do Tocantins.....	25
4.1.2. Estado do Mato Grosso.....	25
4.2. Recrutamento dos Pacientes e Obtenção de Amostras de Sangue Total.....	26
4.3. Extração, Purificação e Quantificação do DNA Total.....	26
4.4. Amplificação de Fragmentos do Gene <i>gag</i> do DNA Proviral por Reação em Cadeia da Polimerase Tipo “nested”-PCR.....	28
4.5. Amplificação das Cepas de Referência do Gene <i>gag</i> do HIV-1.....	30
4.6. Eletroforese em Gel de Agarose 1%.....	30
4.7. Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex dos Subtipos de HIV-1 do Gene <i>gag</i>	31
4.8. Análise Estatística.....	32

5. RESULTADOS.....	33
5.1. Estudo da Diversidade Genética do HIV-1 em Pacientes do Estado do Tocantins.....	33
5.1.1. Características da População Estudada (n=70).....	33
5.1.2. Diversidade Genotípica do HIV-1 na Região do Gene <i>gag</i> de Pacientes do Estado do Tocantins.....	35
5.2. Estudo da Diversidade Genética do HIV-1 em Pacientes do Estado do Mato Grosso.....	38
5.2.1 Características da População Estudada (n=60).....	38
5.2.2. Diversidade Genotípica do HIV-1 na Região do Gene <i>gag</i> de Pacientes do Mato Grosso.....	40
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
9. ANEXOS.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

CRF – do inglês “Circulating Recombinant Form” (Forma Recombinante Circulante)

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HMA – do inglês “Heteroduplex Mobility Assay” (Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex)

IN - Integrase

LACEN - Laboratório Central

LT CD4⁺ - Linfócito T CD4⁺

MT – Mato Grosso

NIH – do inglês “National Institute of Health”

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PR - Protease

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia

TAE - Tris-Acetato-EDTA

TBE - Tris-Borato-EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TO – Tocantins

TR - Transcriptase Reversa

UNAIDS – do inglês “United Nations Programme on HIV/AIDS” (Programa das Nações Unidas em HIV/AIDS)

URF – do inglês “Unique Recombinant Form” (Forma Recombinante Única)

UDI – Usuário de Droga Injetável

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Figura 1. Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo I (HIV-1).....	02
Figura 2. Genoma do HIV-1.....	03
Figura 3. Árvore Filogenética de Lentivírus Humanos e Símios.....	05
Figura 4. Ciclo Replicativo do HIV-1.....	11
Tabela 1. Características dos Pacientes HIV+/aids do Estado do Tocantins.....	34
Tabela 2. Diversidade Genotípica na Região do Gene <i>gag</i> do HIV-1 de Pacientes Residentes no Estado do Tocantins Procedentes de Outros Estados.....	36
Tabela 3. Características dos Pacientes HIV+/aids do Estado do Mato Grosso.....	39
Gráfico 1. Diversidade Genotípica na Região do Gene <i>gag</i> do HIV-1 de Pacientes do Estado do Tocantins (n=64).....	36
Gráfico 2. Distribuição do Sexo dos Pacientes (TO) de Acordo com os Subtipos do HIV-1.....	37
Gráfico 3. Distribuição dos Subtipos do HIV-1 dos Pacientes (MTO) de Acordo Com a Categoria de Exposição.....	37
Gráfico 4. Diversidade Genotípica na Região do Gene <i>gag</i> do HIV-1 de Pacientes do Estado do Mato Grosso (n=54).....	40
Gráfico 5. Distribuição do Sexo dos Pacientes (MT) de Acordo com os Subtipos do HIV-1.....	41
Gráfico 6. Distribuição dos Subtipos do HIV-1 dos Pacientes (MT) de Acordo Com a Categoria de Exposição.....	42

RESUMO

Introdução: Os estudos sobre a diversidade genética do HIV-1 em pacientes do Centro-Oeste e Norte do Brasil são escassos.

Objetivos: Caracterizar a diversidade genotípica do HIV-1 na região *gag* em pacientes do estado do Tocantins (TO) e Mato Grosso (MT).

Material e Métodos: 130 pacientes infectados pelo HIV-1 foram recrutados entre 2003 a 2006, no Laboratório Central dos estado do TO (n=70) e MT (n=60). A diversidade genética do HIV-1 na região *gag* foi estudada pelo Ensaio de Mobilidade do Heteroduplex-HMA (HMA *gag* kits/AIDS Reagent Program/ NIH/ USA). A “Nested-PCR” foi realizada para *gag* empregando-se os pares de iniciadores H1G777/ H1P02 e H1gag1584/ g17. Cepas de referências dos subtipos do HIV-1 foram amplificadas utilizando os iniciadores da segunda etapa da “Nested-PCR”. HMA *gag* consiste na análise de migração de híbridos entre as cepas de referências do HIV-1 e amostras dos pacientes após eletroforese em gel de poliacrilamida (5%).

Resultados: A população de estudo consiste de 60% de homens no estado do TO e de 48,3% em MT. A mediana de idade foi de 34 anos (21 – 71 anos) em TO e 35,5 anos (4 – 64 anos) em MT. O grupo de estudo incluiu as categorias de exposição sexual (TO: 72,9%, MT: 93,3%), parenteral (TO: 4,3%, MT: 3,4%) e perinatal (MT: 1,4%). Os subtipos do HIV-1 identificados por HMA *gag* foram: B (TO: 82,8%, MT: 50,0%), F (TO: 7,8%, MT: 5,6%), C (TO: 4,7%, MT: 11,1%), B/D (TO: 4,7%, MT: 31,5%) e B/F (MT: 1,8%). Entre homens, mulheres e em todas as categorias de exposição observamos predomínio do subtipo B.

Conclusões: Análise da diversidade genética em isolados de HIV-1 do TO e MT indicou predomínio do subtipo B. A segunda forma mais prevalente no TO foi o subtipo F e no MT o subtipo C. Nossos resultados do estado do Tocantins e Mato Grosso contribuem para o mapeamento genético molecular do HIV-1 no Centro-Oeste e Norte Brasileiro.

ABSTRACT

Introduction: There are limited HIV-1 genetic diversity studies performed in Central West and North Brazil subjects.

Objectives: To characterize the HIV-1 genetic diversity in the *gag* region of patients from the States of Tocantins (TO) and Mato Grosso (MT).

Material and Methods: 130 patients infected with HIV-1 were recruited from 2003 to 2006, at the regional Public Health Central Laboratories (LACEN) from TO (n=70) e MT (n=60). The HIV-1 genetic diversity in the *gag* region was investigated by heteroduplex mobility analysis – HMA (HMA *gag* kits/AIDS Reagent Program/NIH/ USA). For the *gag* region the “Nested-PCR” was performed employing the primers H1G777/ H1P02 and H1gag1584/ g17. HIV-1 subtypes references were amplified using the primers of “Nested-PCR” second round. HMA *gag* consists in the migration analysis of the hybrid formed by HIV-1 subtypes references and patient samples after polyacrylamide gel electrophoresis (5%).

Results: Males were 60% of the study population in TO and 48,3% in MT. The median age was 34 years (21 – 171 years) in TO and 35.5 years (4 – 64 years) in MT. The risk exposure categories of this study group were: sexual exposure (TO: 72.9%, MT: 93.3%), parenteral risk (TO: 4.3%, MT: 3.4%) and vertical case (MT: 1.4%). The HIV-1 subtypes identified by HMA *gag* were: B (TO: 82.8%, MT: 50.0%), F (TO: 7.8%, MT: 5.6%), C (TO: 4.7%, MT: 11.1%), B/D (TO: 4.7%, MT: 31.5%) and B/F (MT: 1.8%). Subtype B was predominant among men, women and all risk exposure categories.

Conclusions: The genetic diversity analysis of HIV-1 isolates from TO and MT pointed subtype B as the prevalent. The most prevalent second form in TO was subtype F and in MT was subtype C. These results contribute to the genetic molecular mapping of the HIV-1 *gag* region in the Central West and North Brazil.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Vírus da Imunodeficiência Humana

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) continua a propagar-se desde sua primeira documentação em 1981 (CDC 1981). Após 26 anos chegamos a marca de 33,2 milhões de indivíduos vivendo com HIV/aids no mundo, de acordo com a UNAIDS (2007).

O agente etiológico da aids é o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), um retrovírus da família *Retroviridae*, do gênero *Lentivirus* (Barré-Sinoussi et al. 1983, ICTV 2006). O envelope viral do HIV é constituído de bicamada lipídica derivada da membrana da célula do hospedeiro (Figura 1) e apresenta um complexo de proteínas tetraméricas contendo a glicoproteína (gp) 120 (proteína de envelope viral externa) e a gp41 (proteína de envelope viral transmembrânica) associadas não covalentemente. Internamente ao envelope, encontra-se a proteína matriz p17, o capsídeo viral composto pela proteína p24 e o nucleocapsídeo pelas proteínas p7/p9. Na parte interna do capsídeo está o genoma diplóide de duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNA) idênticas e três enzimas virais: protease (p10), transcriptase reversa (p51) e integrase (p32) (Barré-Sinoussi 1996, Wyatt et al. 1998).

As proteínas estruturais do vírus HIV são codificadas por três diferentes genes. A proteína matriz (p17), a proteína principal do capsídeo (p24) e as proteínas do nucleocapsídeo (p7/p9) são codificadas pelo gene *gag*. As enzimas protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN) são codificadas pelo gene *pol*. A proteína precursora do envelope viral, gp160 é codificada pelo gene

env e, posteriormente clivada por uma protease celular originando a gp120 e a gp41.

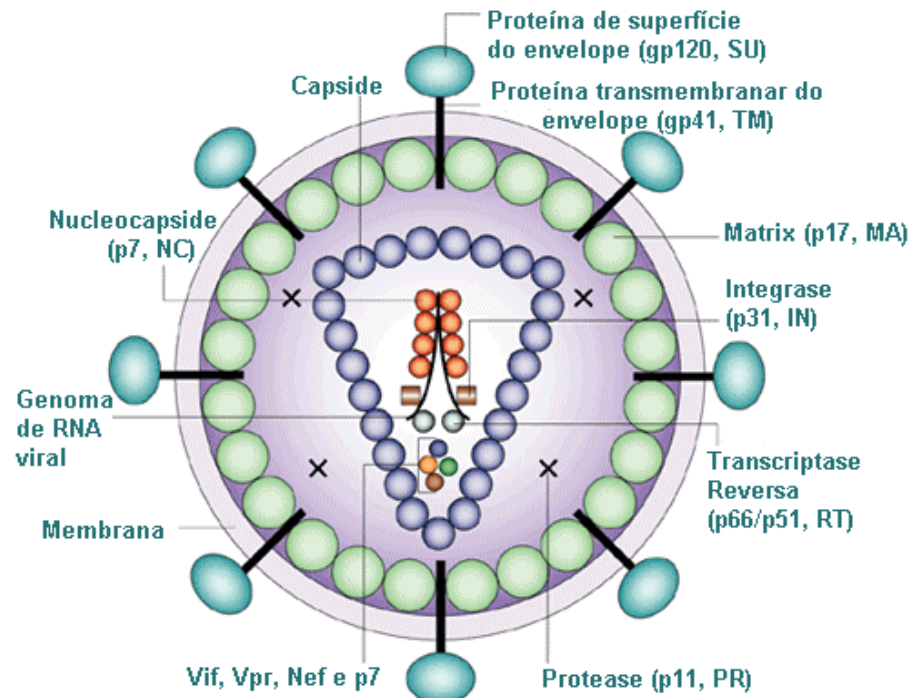


Figura 1. Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo I (HIV-1). (Adaptado de Robinson HL 2002).

O HIV possui seis genes com funções reguladoras: *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*. Os genes *vif* e *vpu* estão envolvidos na infectividade dos vírions; o gene *vpr*, na replicação viral em células que não estão em divisão; o gene *tat*, regula a transcrição da porção terminal (LTR) pela ligação aos RNAs recém-transcritos. O gene *rev*, promove a saída de RNA mensageiros (mRNA) do núcleo para tradução de novas proteínas de *env*, *gag* e, por último o gene *nef* que está envolvido na replicação do HIV *in vivo* (Barré-Sinoussi et al. 1996, Freed 2001) (Figura 2).

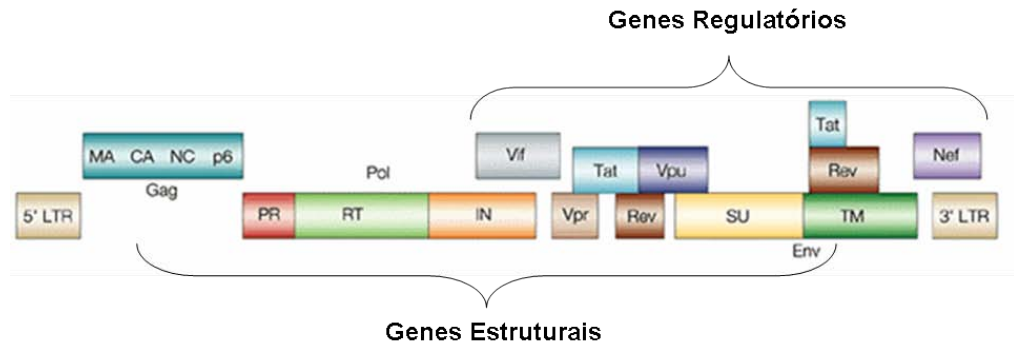


Figura 2: Genoma do HIV-1. (Adaptada de Robinson HL 2002)

1.2 Origem do HIV

Evidências atuais indicam que os dois tipos de vírus, HIV-1 e HIV-2, entraram na população humana através de múltiplas infecções zoonóticas do vírus da imunodeficiência símio (SIV), que infecta primatas não humanos (Hahn et al. 2000), por décadas, a possivelmente séculos. Mas estes eventos de transferência provavelmente começaram a aumentar nas décadas de 1920 a 1950 como resultado da migração humana no centro-oeste africano (Korber et al. 2000).

O reservatório símio para viroses humanas tem sido definido baseado em relações genéticas e no vínculo geográfico entre o habitat natural do primata hospedeiro e a região das possíveis primeiras introduções do SIV em humanos, que conseqüentemente, apresenta a maior diversidade do HIV-1 e HIV-2 (Korber et al. 2000, Hahn et al. 2000). O genoma do lentivírus isolado de dois chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) originário de Gabão (SIVcpz gab) (Huert et al. 1990) e Zaire (SIVcpz ant) (Vanden Haesevelde et al. 1996) é estruturalmente relacionado a duas distintas linhagens do HIV-1, os grupos M e N. A origem da terceira linhagem do HIV-1, o grupo O, pode estar relacionado a isolados do SIV de gorilas da espécie *Gorilla gorilla* (SIVgor) (Heuverswyn et al. 2006).

As formas mais diversas do HIV-1 são todas encontradas na região geográfica correspondente ao habitat natural do *P. t. troglodytes* e do *Gorilla gorilla* no oeste equatorial da África. As seqüências dos grupos HIV-1, do SIVcpz e do SIVgor se cruzam nas árvores filogenéticas, sugerindo que existe uma linhagem viral comum para humanos, chimpanzés e gorilas. Análises filogenéticas mostram que o SIVcpz é ancestral ao SIVgor, o que levanta a possibilidade dos chimpanzés terem transmitido o SIVcpz para gorilas. Analogamente, o HIV-2 tem estreita relação com o SIV do sooty mangabeys (SIVsm) presente na mesma região geográfica onde os vírus HIV-2 são mais diversos, e as seqüências do HIV-2 e do SIVsm também se cruzam nas árvores filogenéticas (Gurtler 1996, Simon et al. 1998, Korber et al. 2000, Hahn et al. 2000, Heuverswyn et al. 2006) (Figura 3).

1.3 Classificação do HIV-1

Os dois tipos de HIV são responsáveis pela infecção. A grande maioria das infecções no mundo é causada pelo vírus HIV-1, o qual foi identificado em 1983 com o isolamento do vírus de um paciente com linfadenopatia persistente (Barré-Sinoussi et al. 1983). O vírus da imunodeficiência tipo 2 (HIV-2) foi primeiramente detectado no oeste Africano onde é freqüente, com casos esporádicos de infecção em Portugal e na Índia, e raros casos relatados nos países ocidentais, na Coréia e nas Filipinas (Barin et al. 1985, Kannangai et al. 1999, Soriano et al. 2000, Kandathil et al. 2005).

Análise filogenética da região *env* do HIV-1 levaram a sua classificação em três grupos genéticos distintos: M (major), O (outlier) e N (non-M, non-O). O grupo N parece ser filogeneticamente equidistante do M e O (Gurtler et al. 1994, Simon et al. 1998). O grupo M é o mais prevalente entre os três grupos e possui nove

subtipos (A-D, F-H, J, K), os quais são originários da África Central. Embora essa classificação tenha sido baseada nas seqüências da região *env*, a mesma foi estendida para todas as regiões do genoma viral.

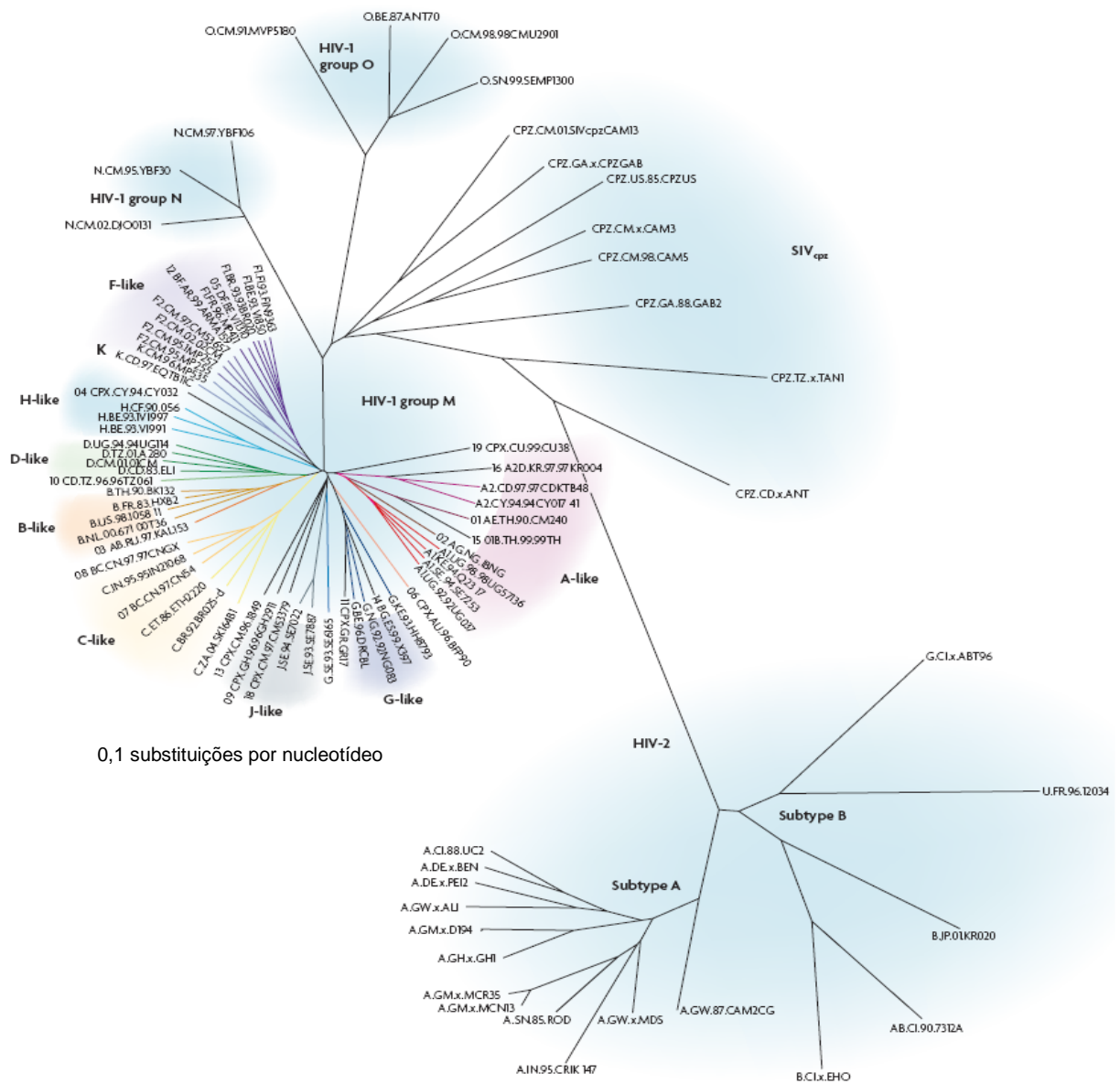


Figura 3. Árvore Filogenética de Lentivírus Humanos e Símios. (Adaptado de Ariën et al. 2007).

Os subtipos A e F são separados em sub-subtipos, A1, A2, A3, A4, e F1, F2 (Thomson et al. 2002, Meloni et al. 2004, Vidal et al. 2006). O subtipo D, devido a sua alta homologia genética com o subtipo B, poderia ser classificado como sub-subtipo B2 (Figura 3) (Geretti 2006).

1.4 Diversidade Genética do HIV-1

Desde o início da AIDS epidêmica há mais de duas décadas, o HIV-1 tem diversificado geneticamente com distribuição geográfica diferente (Spira et al. 2003). Esta variabilidade genômica é atribuída a vários fatores entre eles os principais são: erros de leitura da transcriptase reversa do HIV que não é capaz de fazer a correção, alta taxa de replicação viral e eventos de recombinação viral. Além disso, a adaptabilidade viral e a pressão seletiva como resposta imune e uso de antiretrovirais, contribuem para a variabilidade viral (Ho et al. 1995, Roberts et al. 1988, Hahn et al. 2000, Spira et al. 2003).

Estes mecanismos de diversidade genética geraram os grupos do HIV-1 com os seus subtipos e sub-subtipos. As proteínas do envelope (*env*) do grupo M e O mostram uma variação de 30-50%. Já a distância entre os aminoácidos da região *env* entre os subtipos do grupo M alcança 25-35%, e na região *gag* é de 15% (Thomson et al. 2002, Takebe et al. 2004), pois essa região codifica proteínas do “core”, que formam uma estrutura relativamente inflexível (Wainberg et al. 2004). Os subtipos A1, A2, A3, A4, e F1, F2 (Thomson et al. 2002, Meloni et al. 2004, Vidal et al. 2006) possuem uma diferença de 10-15% na seqüência de nucleotídeos (Wainberg 2004).

O genoma do HIV-1 mostra não somente altos níveis de variabilidade genética entre as diferentes cepas virais, mas também uma significativa variação na seqüência de aminoácidos em um mesmo indivíduo que pode alcançar 20%, constituindo grupos de vírus proximamente relacionados, denominados “quasispécies” (Holland et al. 1992, Gao et al. 2004).

1.5 Formas Recombinantes do HIV-1

A circulação de vários subtipos em uma mesma área geográfica favorece infecções duplas por diferentes subtipos virais que podem ser simultâneas ou seqüenciais. Quando uma infecção dupla ocorre em um único evento de transmissão, essa é designada co-infecção. Por outro lado, a superinfecção se refere às infecções seqüenciais, envolvendo no mínimo dois eventos de transmissão diferentes (Nájera et al. 2002).

Eventos de recombinação viral ocorrem quando dois ou mais subtipos iguais ou diferentes infectam simultaneamente a mesma célula, permitindo o encapsulamento de um RNA transcrito de cada provírus em um vírion heterozigoto. Após a subsequente infecção de uma nova célula, a transcriptase reversa salta entre os distintos transcritos de RNA fazendo a leitura nas duas fitas que gera uma nova seqüência sintetizada de DNA retroviral que é recombinante entre os dois genomas parentais (Goodrich et al. 1990, Hu et al. 1990, Stuhlmann et al. 1992). Aqueles vírus mosaicos são recombinantes pelo fato que pontos de recombinação podem ser identificados entre as regiões genômicas com diferentes associações filogenéticas (Carr et al. 1998, Gao et al. 1998).

A taxa de recombinação do HIV-1 é uma das mais altas de todos os organismos, com uma estimativa de três eventos de recombinação por genoma por ciclo replicativo (Zhuang et al. 2002), excedendo a taxa de mutação por replicação. A descoberta que a maioria das células infectadas alberga dois ou mais diferentes provírus (Jung et al. 2002), e a evidência de dupla infecção (Jost et al. 2002, Koelsch et al. 2003), coloca a etapa de recombinação com uma função central na geração da diversidade do HIV. A recombinação é mais óbvia ocorrer entre grupos do HIV-1 e entre diferentes subtipos, mas é também provável ocorrer

entre membros do mesmo subtipo, embora métodos atuais falhem na identificação de recombinação intra-subtipo. A co-circulação de vírus do mesmo subtipo distintos filogeneticamente tem sido relatada na Etiópia (subtipo C) (Abebe et al. 2000), no Brasil (subtipo B) (Potts et al. 1993), em Cuba (subtipo B) (Cuevas et al. 2002) e em Portugal (subtipo G) (Esteves et al. 2002), que são locais onde a prevalência da recombinação intra-subtipo deveria ser estudada.

A nomenclatura atual usada para designar os recombinantes e os critérios para a sua definição foi adotada em 1999 (Robertson et al. 2000). De acordo com estes critérios, se o vírus recombinante for identificado em no mínimo três indivíduos sem vínculo epidemiológico e caracterizado pelo seqüenciamento do genoma completo, o vírus recombinante é designado Forma Recombinante Circulante (CRF). Dois genomas completos e a seqüência parcial de uma terceira cepa são suficientes desde que a seqüência parcial confirme a estrutura mosaica do CRF (Peters et al. 2000). Há atualmente 40 CRFs reconhecidas, incluindo os subtipos E e I que foram re-classificados como CRFs (Osmanov et al. 2002, Guimarães et al. 2008). CRFs são designadas com números consecutivos de acordo com a ordem de descoberta, seguidos pelos subtipos parentais, ou cpx (de complexo) se houver mais do que dois subtipos parentais (Robertson et al. 2000).

A maioria das CRFs é originária do oeste equatorial da África, assim como os subtipos que as formam (Thomson et al 2002). Algumas CRFs representam as formas genéticas mais prevalentes em algumas áreas: CRF01_AE no sudeste da Ásia, CRF02_AG no oeste e centro-oeste da África, CRF03_AB em Kaliningrado (Rússia), CRF07_BC e CRF08_BC na China e CRF12_BF na Argentina e Uruguai (Osmanov et al. 2002). Na distribuição global dos subtipos do HIV-1, 18% das amostras infectadas correspondem a vírus recombinantes. A forma recombinante

mais prevalente no mundo é a CRF02_AG (representando 31% das infecções no oeste da África) e CRF01_AE (representando 63% das infecções no Sudeste da Ásia e 24% no leste asiático e no Pacífico) (Osmanov et al. 2002).

Além dos CRFs, existem diversas cepas do HIV-1 com estruturas mosaicas únicas que foram identificadas em um único paciente ou em indivíduos com vínculo epidemiológico. Estas formas são conhecidas como Formas Recombinantes Únicas (URFs). Os achados freqüentes de URFs refletem a ocorrência comum de infecções duplas e relatos mostram que a superinfecção em infecções estabelecidas é possível. A documentação de superinfecção por diferentes formas genéticas do HIV-1 indica que a resposta imune induzida por uma forma genética parece não proteger contra a infecção com outra forma genética distinta (Nájera et al. 2002).

Estudos têm revelado a alta prevalência de URFs no oeste, centro-oeste e leste da África (McCutchan et al. 1999, Montavon et al. 2002, Vidal et al. 2000, Carr et al. 2001a, Renjifo et al. 1999, Hoelscher et al. 2001, Dowling et al. 2002, Neilson et al. 1999, Eshleman et al. 2002, Yirrell et al. 2002), na América do Sul (Carr et al. 2001b, Thomson et al. 2000), no Caribe (Cuevas et al. 2002) e na Ásia (Motomura et al. 2000, Yang et al. 2002). A prevalência real de URF é provavelmente subestimada, pois a maioria das análises é feita em segmentos parciais.

1.6 Transmissão do HIV-1

Os principais veículos de transmissão do HIV-1 são o sangue e as secreções genitais dos indivíduos infectados. O vírus também pode ser encontrado em outros fluidos do organismo, como por exemplo, o leite materno

que pode ser uma fonte de transmissão pós-natal para o recém-nascido. Os três principais modos de transmissão do HIV-1 são: sexual, parenteral e perinatal (ONUSIDA 1999, Shrestha et al. 2006).

O valor mínimo para a transmissão heterossexual é de aproximadamente 1500 cópias/mL de carga viral. No estágio bem inicial da infecção a viremia é no mínimo duas vezes menor o que torna questionável que pessoas infectadas poderiam transmitir o HIV através do contato sexual neste estágio (Quin et al. 2000). Diferentemente, é concebível que o plasma coletado de um doador infectado recentemente durante a fase inicial da infecção poderia ser infeccioso quando, por exemplo, em uma doação de 200 a 250 mL de transfusão de componente do plasma fresco congelado ou 50 a 400 mL de concentrado de plaquetas. A infectividade de componentes derivados de células vermelhas do sangue de uma doação feita durante a fase inicial da infecção precedendo o pico da viremia é menos provável devido à quantidade muito menor de plasma (aproximadamente 20 mL) e o estoque prolongado em temperaturas refrigeradas são condições conhecidas que podem reduzir a infectividade do HIV (Busch et al. 1996, Fiebig et al. 2005).

1.7 Ciclo Replicativo do HIV-1

A figura 4 ilustra o ciclo replicativo do HIV-1 incluindo a entrada do vírus HIV na célula do hospedeiro através da interação de domínios variáveis da gp120 à molécula CD4 (receptor primário) presente em macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. Essa interação promove modificações conformacionais na molécula da gp120 que permite a sua ligação aos receptores de quimiocinas (receptores

secundários ou co-receptores) mais notavelmente o CCR5 e o CXCR4. Cepas virais com tropismo para macrófagos e células dendríticas usam o receptor CCR5 (cepas R5), que é responsável pela transmissão do vírus e predomina durante a fase assintomática da doença (Busch et al. 1997) e não induz sincício *in vitro* (cepas NSI). Isto tem sido demonstrado pela quase completa resistência de indivíduos homozigotos para a deleção na posição 32 da região codificadora do

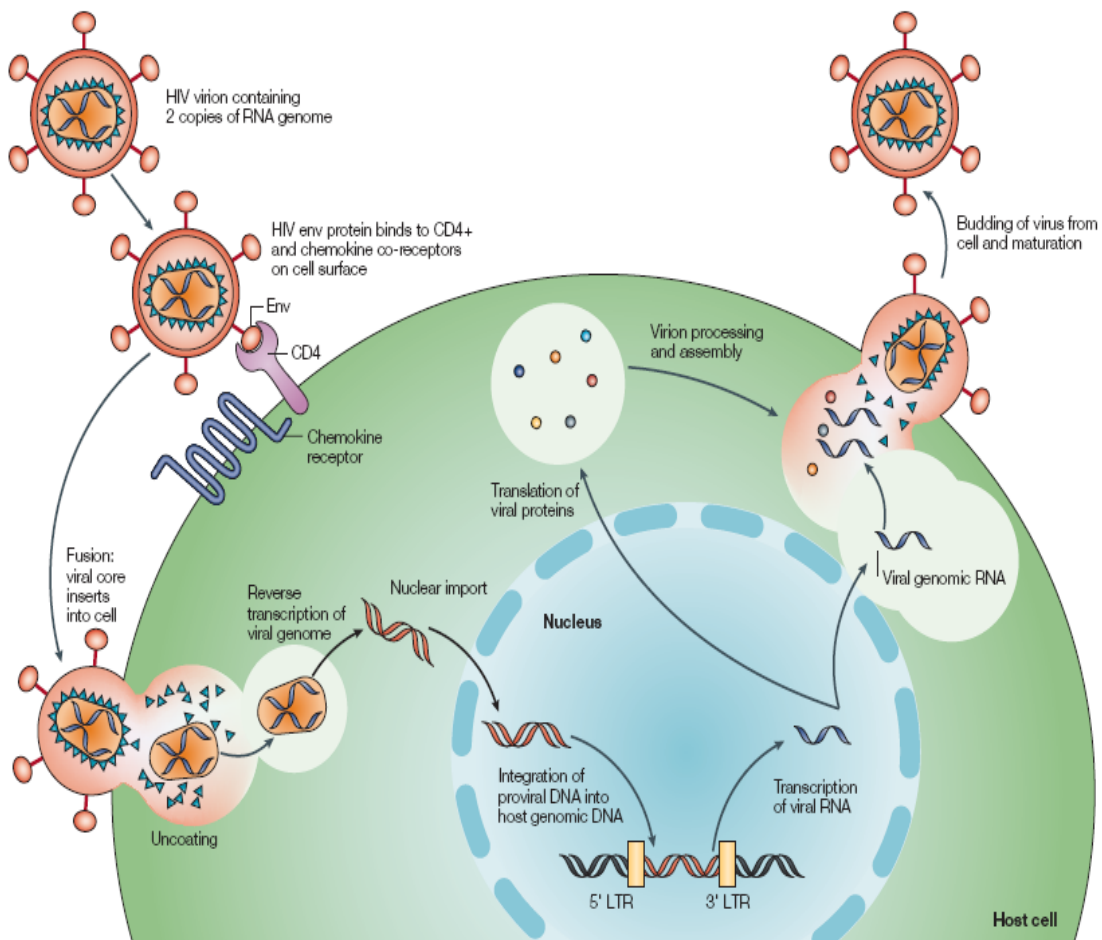


Figura 4. Ciclo replicativo do HIV. (Adaptado de Rambaut et al. 2004).

receptor (denominada de CCR5 Δ 32) (Samson et al. 1996). Atualmente foi descoberta outra variante genética natural da região codificadora do CCR5 que também modula a progressão da doença pelo HIV e a função do receptor. Estudo sobre a influência de fatores genéticos do hospedeiro no risco de transmissão vertical do HIV-1 em Kigali, Ruanda, identificou indivíduos heterozigotos para a

deleção na posição 24 na região codificadora do CCR5 (denominada de hCCR5 Δ 24) (Masqueliera et al. 2007). Cepas que usam o receptor CXCR4 emergem numa fase tardia da infecção. Estas cepas indutoras de sincício (SI) trópicas para células T CD4+ são associadas com alta taxa de declínio de células CD4+ e então progressão mais rápida para a aids (Zhang et al. 1998).

A interação entre a gp120 com o co-receptor leva a inserção da gp41 na bicamada lipídica da célula do hospedeiro, ativando seus peptídeos de fusão que promovem a fusão do envelope viral com a membrana da célula alvo e liberação do cerne viral no citoplasma da célula do hospedeiro (Barré-Sinoussi 1996).

Após a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, o capsídeo é então desencapado em um processo que consiste na liberação do conteúdo do capsídeo no citoplasma, ou seja, o RNA genômico e enzimas virais. Esta etapa é fundamental para a transcrição reversa (Frankel et al. 1998) que promove a síntese de uma cópia de DNA de fita dupla, catalisando as reações de polimerização de DNA a partir da fita de DNA do híbrido RNA-DNA (Vaishnav et al. 1991). Seguindo-se a transcrição reversa, um complexo nucleoprotéico, incluindo a IN, a p17 e o DNA formado, é rapidamente transportado para o núcleo da célula hospedeira em um processo mediado pela Vpr, uma proteína de 96 aminoácidos. A ação desta proteína permite o transporte do complexo nucleoprotéico mesmo na ausência de rompimento mitótico do envelope nuclear (Cohen et al. 1996). A ação da terceira enzima viral, a IN, resulta na integração estável do DNA complementar (cDNA) do genoma viral no DNA cromossômico através de várias etapas como endonuclease, transferência de fita, desintegração e ligação, estabelecendo um provírus e completando assim a fase pré-integrativa (Katz et al. 1994).

Quando os RNAs são transcritos, eles são então transportados para o citoplasma, onde serão então traduzidos, ou constituirão RNA genômico de novas partículas virais em um processo regulado pela proteína Rev (Hope 1997). A tradução citoplasmática dos RNA mensageiros (mRNAs) virais fornece as proteínas Vif, Vpr, Nef, além das poliproteínas gag e gag-pol que serão processadas posteriormente em p17, p24, p7, p6, PR, TR e IN. As proteínas gp120 e gp41, presentes na membrana externa do HIV-1, são formadas a partir da poliproteína env gp160 que, por sua vez é co-expressa com os receptores CD4 no retículo endoplasmático (Vaishnav et al. 1991). A degradação dos receptores CD4 recém sintetizados, necessária ao transporte de env até a membrana celular, é feita pela proteína Vpu (Lanb et al. 1997).

Os vírions são inicialmente montados próximo à membrana celular na forma de partículas imaturas compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais (Gonda et al. 1985). Após, ou durante o processo conhecido como "brotamento", as partículas virais passam por uma modificação morfológica conhecida como maturação (Kaplan et al. 1994). A maturação consiste na clivagem das poliproteínas gag e gag-pol pela PR viral, produzindo enzimas e proteínas estruturais do capsídeo (Gonda et al. 1985). O processamento das poliproteínas no vírion completa o ciclo de replicação do HIV. Os vírions maduros são então capazes de infectar um linfócito adjacente (Vaishnav et al. 1991).

1.8 Patogênese do HIV-1

Os eventos iniciais da infecção primária pelo HIV ainda não foram completamente elucidados. Estudo *in vivo* em primatas infectados com o vírus da imunodeficiência símio (SIV) (Lifson et al. 1997, Nowak et al. 1997) revelaram uma

seqüência de eventos relevantes para a transmissão sexual do HIV, começando com a penetração viral na superfície do epitélio da mucosa, seguida pela depleção de células da submucosa (TCD4+, células dendríticas e macrófagos) e subsequente dispersão viral para os linfonodos drenantes (Pope et al. 2003, Brenchley et al. 2006). O período inicial da infecção pelo HIV é marcado pela viremia indetectável atribuível a seqüestração do HIV na mucosa e tecidos linfáticos (Kahn et al. 1998). Um grande número de células T CD4+ são depletadas rapidamente dentro das primeiras semanas de infecção e estão predominantemente localizadas no trato gastrointestinal. Esta fase dura entre 1 e 4 semanas, baseado no tempo de aparecimento da síndrome retroviral aguda e da viremia do HIV em pacientes com datas conhecidas de exposição (Gaines et al. 1998, Lindback et al. 2000, Fiebig et al. 2005).

O começo da viremia, definido como detecção verificável de partículas virais ou de material genético na circulação sanguínea, indica infectividade do indivíduo exposto com potencial para transmissão secundária (Busch et al. 1997, Ling et al. 2000, Kopko et al. 2001) e permite diagnosticar e confirmar a infecção (Nguyen et al. 2000, Hecht et al. 2002). Da concentração viral quantificável inicial até a concentração viral máxima, leva aproximadamente o mesmo tempo para que ocorra a soroconversão de anticorpo (Little et al. 1999, Fiebig et al. 2003). A viremia mensurável em primatas foi observada entre 5 e 30 dias após a exposição intravaginal experimental (Fiebig et al. 2005).

Após a fase inicial aguda, o indivíduo entra em uma fase de latência clínica, que pode durar até 10 anos, representada por uma progressiva queda no número de linfócitos T CD4+ e manutenção da carga viral num determinado patamar (Geskus et al. 2007).

A ativação imune crônica é uma característica da progressão para a aids. De fato, a ativação policlonal de células B foi uma das primeiras anormalidades imunológicas descritas em indivíduos infectados pelo HIV (Lane et al. 1993). A injúria ao componente imune da superfície da mucosa gastrointestinal, junto com o dano do micro ambiente do epitélio intestinal (Nowak et al. 1997, Kahn et al. 1998, Pope et al. 2003) com sua função antimicrobiana, promovem a passagem de microrganismos da microbiota intestinal, para os outros órgãos, caracterizando a translocação microbiana. A ativação imune sistêmica durante a fase crônica da infecção pelo HIV ocorre com o aumento da translocação de produtos microbianos do lúmen intestinal (Brenchley et al. 2006). Além do aumento da translocação microbiana, ocorre o aumento do *turnover* celular (Hellerstein et al. 1999), da frequência de células T com um fenótipo de células ativadas (Hazenbergh et al. 2000) e dos níveis sorológicos de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Valdez et al. 1997). O grau de ativação indica melhor a progressão da doença do que a carga viral (Giorgi et al. 1999). Como conseqüências deste processo, podem ocorrer infecções oportunistas (infecções bacterianas, toxoplasmose, infecções fúngicas), caquexia, neoplasias (sarcoma de kaposi) e degeneração do sistema nervoso central (Simon et al. 2006).

1.9 Números de Casos de HIV+/aids

Os últimos dados divulgados pela UNAIDS (órgão da ONU de combate à aids) em 2007 informam que dos 33,2 milhões de pessoas que vivem hoje com HIV no mundo, 22,5 milhões (68%) residem na África Subsaariana, 4 milhões (12%) no sul e sudeste da Ásia, 1,6 milhão (4,8%) na América Latina (destes um terço vivem no Brasil), 1,6 milhão (4,8%) no leste Europeu e Ásia Central e 1,3

milhão (3,9%) na América do Norte. O número de novas infecções na África Subsaariana declinou de 2,2 milhões em 2001 para 1,7 milhões em 2007. Mas a África Subsaariana continua a ser a mais afetada em termos globais. O aumento mais acentuado de novas infecções pelo HIV ocorreu no Leste Asiático (77000 novos casos em 2001 para 92000 novos casos em 2007). No Caribe, na América Latina, no Oriente Médio e norte da África, na América do Norte e no Oeste Europeu, os números de novas infecções pelo HIV em 2007 permaneceram aproximadamente estáveis (UNAIDS 2007).

O Brasil é o país mais afetado pela epidemia de HIV/aids na América do Sul, a taxa de prevalência é em torno de 0,6%, segundo o Boletim Epidemiológico de DST/aids publicado em dezembro de 2007. Desde o início da epidemia em 1980, até 30/06/2007, foram notificados 474.273 casos de aids (314.294 são do sexo masculino) – 289.074 no Sudeste, 89.250 no Sul, 53.089 no Nordeste, 26.757 no Centro Oeste e 16.103 no Norte. Nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste, a incidência de aids tende à estabilização. No Norte e Nordeste, a tendência é de crescimento. A região Norte apresenta maior crescimento no número de casos de aids (39,6%). O número passou de 1.459 notificações, em 2002, para 2.037, em 2006. No Nordeste, o número passou de 4.590, em 2002, para 5.189, em 2006 (aumento de 13%). O Sudeste é a região que apresenta maior queda (25%). Foram 21.752 casos registrados em 2002 e 16.306 em 2006. No Sul, o número caiu de 8.577 casos, em 2002, para 7.002 em 2006 (redução de 18,4%). No Centro Oeste, a tendência é de estabilização, com tendência a queda - foram 2.438 casos em 2002 e 2.094 em 2006 (Ministério da Saúde 2007).

Ao longo do tempo, a razão entre os sexos vem diminuindo de forma progressiva. Em 1985, a proporção de infectados do sexo masculino e feminino

era de 15:1. Hoje, a relação é de 1,5 para 1. Na faixa etária de 13 a 19 anos, há inversão na razão de sexo, a partir de 1998. Em ambos os sexos, a maior parte dos casos se concentra na faixa etária de 25 a 49 anos. Porém, nos últimos anos, tem-se verificado aumento percentual de casos na população acima de 50 anos, em ambos os sexos. Na população com mais de 13 anos observa-se crescimento da epidemia em heterossexuais, estabilização entre homossexuais e bissexuais e redução entre usuários de drogas injetáveis (UDI). Em homo/bissexuais jovens, no entanto, a tendência é de crescimento (Ministério da Saúde 2007).

Além disso, observa-se o avanço da epidemia para municípios de pequeno porte (abaixo de 200 mil habitantes), e o aumento do percentual de casos de AIDS em indivíduos de menor escolaridade, indicando a pauperização da epidemia (Ministério da Saúde 2007).

1.10 Técnicas para Caracterização Molecular do HIV-1

Testes rotineiros de monitoramento sorológico permanecem uma primeira etapa essencial de vigilância. O tradicional teste de monitoramento anti-HIV (ELISA), testes suplementares (especialmente o Western blot), e testes para antígenos do HIV podem detectar a maioria das infecções pelo HIV e pode distinguir entre HIV-1 e HIV-2 (Schochetman et al. 1994). No entanto, eles geralmente não distinguem um subtipo do outro.

A aplicação de técnicas baseadas em amplificação de ácidos nucléicos, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem melhorado a detecção e caracterização genética de patógenos infecciosos como o HIV (Ou CY et al. 1988, 1993). Embora avanços significantes tenham sido feitos em tecnologias de seqüenciamento genético, esta é ainda laboriosa e onerosa. O principal desafio

para caracterização em larga-escala do HIV é a seleção de cepas de interesse para subsequente seqüenciamento. Tais técnicas como: sondas genéticas subtipo específicas (Ou CY et al. 1990, 1993), Ensaio da Mobilidade do Heteroduplex (HMA) (Delwart et al. 1993) e a Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP) (Pieniazek et al. 1995) podem prover maneiras mais fáceis para subtipar um número grande de isolados de HIV. No entanto, o seqüenciamento genético é o padrão ouro para a caracterização viral.

Uma vez identificado os genótipos, podem ser usados para avaliar padrões de transmissão na comunidade e vínculos epidemiológicos entre os casos.

1.10.1 Ensaio da Mobilidade do Heteroduplex

O HMA é uma técnica de triagem molecular que permite a identificação do subtipo viral do HIV-1 mediante análise da mobilidade eletroforética de híbridos de DNA em gel de poliacrilamida. Os híbridos são gerados a partir da mistura de seqüências de DNA do HIV-1 de amostras-testes com seqüências de DNA de cepas de referência com subtipos conhecidos. Inicialmente a mistura é aquecida a 94 °C, promovendo a desnaturação das duplas fitas de DNA, seguida de rápido resfriamento, que provoca o reanelamento das fitas. No reanelamento há a formação de “homoduplex”, representados pela recomposição das duplas fitas originais das amostras testes e das cepas de referência. Além disso, são formados “heteroduplex” ou híbridos de DNA pelo anelamento de fitas heterólogas proveniente das amostras testes e das cepas de referência. Quanto maior a homologia genética entre as seqüências de DNA reaneladas, maior a rapidez de migração no gel. Portanto os “homoduplex” exibem maior velocidade de migração eletroforética que os “heteroduplex”. Os “heteroduplex” com maior homologia na

seqüência de nucleotídeos exibem maior mobilidade eletroforética que aqueles geneticamente mais distantes. Assim, analisando-se as mobilidades eletroforéticas dos diferentes híbridos é possível identificar o subtipo do HIV-1 na amostra-teste pela identificação do heteroduplex que obteve a maior mobilidade eletroforética no gel (Delwart et al.1993, Heyndrickx et al. 2000).

1.11 Epidemiologia Molecular do HIV-1

Todos os grupos do HIV-1 são encontrados na África Subsaariana. O grupo M é prevalente em todos os continentes e os grupos N e O são geograficamente restritos a África Central (Simon et al. 1998, Vidal et al. 2000, Yamaguchi et al. 2003). Em escala global os subtipos mais prevalentes do HIV-1 são: C (50,0%), A e A/G (17,0%), e B (10,0%) (Hemelaar et al. 2006). O subtipo A e a forma variante recombinante A/G são os mais prevalentes no oeste e parte central da África. O subtipo B é o mais prevalente na Europa, nas Américas, Austrália e sudeste da Ásia. O subtipo C tem sido responsável por novas epidemias devido a sua propagação incontrolada na Botswana, Zimbábue, Malawi, Zâmbia, Namíbia, Lesoto, África do Sul, Índia, Nepal e China. O subtipo D é prevalente no leste e parte central da África, com alguns casos esporádicos observados no sul e oeste Africano. O recombinante A/E foi encontrado na Tailândia, nas Filipinas, China e África Central. O subtipo F foi identificado na África Central, América do sul e leste Europeu. O subtipo G foi detectado nas mesmas regiões geográficas onde o recombinante A/G é prevalente. Os subtipos H e J foram encontrados somente na África Central. O subtipo K foi encontrado em pacientes na República Democrática do Congo e em Camarões. (Weniger et al. 1994, Thomson et al. 2002, Wainberg et al. 2004, Hemelaar et al. 2006).

As populações migrantes modificam o padrão da distribuição dos subtipos do HIV-1. Os subtipos C e A do HIV-1, assim como as formas recombinantes, são de interesse especial, porque representam os subtipos predominantes na África e Ásia onde o HIV-1 propaga-se mais rapidamente (Wainberg et al. 2004).

No Brasil diversos estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 mostraram a predominância do subtipo B e a presença dos subtipos F (Morgado et al. 1994, 1996, 1998, Bongertz et al. 2000, Stefani et al. 2007, Guimarães et al. 2008), C (Csillag et al. 1994, Soares et al. 2005, Locateli et al. 2007), D (Morgado et al. 1998) e A (Caride et al. 2001), e dos recombinantes B/F e B/C (Sabino et al. 1994, Sá Filho et al. 2006, Santos et al. 2006, Guimarães et al. 2008). Há diferenças na distribuição dos subtipos entre as regiões geográficas. Estudos realizados no Norte e Sudeste verificaram a predominância do subtipo B seguido pelo subtipo F (Weniger et al. 1994, Bongertz et al. 2000, Vicente et al. 2000, Sá Filho et al. 2006, Cabral et al. 2006, Guimarães et al. 2008). O subtipo B também é predominante no Nordeste (Couto-Fernandez et al. 1999, Medeiros et al. 2006, Pedroso et al. 2007, Cavalcanti et al. 2007) e no Centro-Oeste (Stefani et al. 2000, 2007, Vêras et al. 2007) com casos limitados dos subtipos F e C. O subtipo C foi primeiramente detectado no Sul do Brasil em amostras coletadas em Porto Alegre/RS (Csillag et al. 1994). Amostras retrospectivas de 1991 e 1992 foram seqüenciadas pela WHO HIV Network (1994), mostrando que desde 1992 este subtipo já estava no país (Soares et al. 2003). É na região Sul que ocorre o maior número de infecções pelo subtipo C em contraste com o padrão de distribuição dos subtipos de HIV-1 do resto do país (Morgado et al. 2002).

O subtipo B circulante no Brasil difere do clássico subtipo B que apresenta a seqüência GPGR no topo da alça V3 da gp 120 que é prevalente na América do

Norte e na Europa. No Brasil a seqüência mais prevalente é a GWGR e esta variante é denominada B" (Potts et al. 1993). A origem da variante GWGR no Brasil não é clara. Esta variante foi primeiramente relatada em 3 de 29 pacientes no Japão, um dos quais era uma mulher que emigrou da América do Sul. Baseado na migração, esta variante parece estar no Brasil desde o início da epidemia da AIDS no país (Bongertz et al. 2000).

O mapeamento genético molecular do HIV-1 em pacientes da região Centro-Oeste, mais especificamente no estado de Goiás, vem sendo realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). Mediante a utilização do HMA para as regiões de *env* e *gag* do genoma do HIV-1, a diversidade genética do HIV-1 tem sido avaliada em diferentes grupos populacionais incluindo gestantes, pares de mãe/filhos infectados pela via vertical e pacientes co-infectados com diferentes patógenos como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis* e o vírus da hepatite C (Álvares Jr 1999, Ferro MO 2000, Stefani et al 2000, Alcântara 2003, Pereira et al. 2004, Lins 2005, Pereira et al. 2006, Stefani et al 2007). Os resultados destes estudos indicam predominância do subtipo B, seguido pelo subtipo F e isolados com subtipos discordantes B/F em *env* e *gag*. Esses estudos também indicam a introdução e circulação do HIV-1 subtipo C, na região Centro-Oeste do país. Além dos isolados com subtipos discordantes B/F, outros isolados com subtipos discordantes em *env* e *gag* foram detectados: B/D, F/B, B/C (Stefani et al 2000, Alcântara 2003, Pereira et al. 2004, Lins 2005, Stefani et al. 2007).

1.12 Impacto da Diversidade Sobre a Transmissão e Progressão da Doença

O alto nível de variabilidade genética do HIV-1 pode ter implicações para a patogênese do HIV-1, transmissão, diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas. Diferentes subtipos podem apresentar propriedades biológicas distintas que influenciam o tropismo celular e a cinética de replicação viral, levando a diferenças na transmissibilidade e na patogenicidade (Hemelaar et al. 2006).

Alguns estudos têm relatado diferenças nas taxas de progressão a AIDS em indivíduos infectados por diferentes subtipos de HIV-1 (Galai et al. 1997, Kanki et al. 1999, Kaleebu et al. 2002). Resultados contraditórios têm sido também descritos (Alaeus et al. 1999). Em experimentos de competição de crescimento com isolados primários do HIV-1 infectando células mononucleares do sangue periférico, a ordem da capacidade replicativa é: subtipo A, B, D, CRF01_AE > subtipo C > HIV-2 > grupo O (Arien et al. 2005). Essa capacidade replicativa verificada *in vitro* poderia implicar em diferenças na virulência de cada subtipo.

Outras diferenças atribuídas ao vírus, ao hospedeiro, a fatores ambientais, bem como diferenças no desenho do estudo, no tamanho da amostra, no uso de marcadores de progressão e duração do seguimento clínico podem influenciar nos resultados de estudos sobre as particularidades da patogênese de cada forma viral (Hemelaar et al. 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Dados sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 em pacientes da região Centro-Oeste e Norte do país são escassos. Estudo recente realizado com 406 pacientes infectados pelo HIV-1 provenientes dos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul no período de 2001 a 2004, foram analisadas nas regiões *env* e *gag* por HMA. Os resultados indicaram a prevalência do subtipo B nesta região. O subtipo F foi observado em casos esporádicos em Mato Grosso do Sul e em Goiás. O subtipo C “puro” do HIV-1 foi detectado em Goiás e nos outros estados foi detectado na forma discordante B/C (Stefani et al. 2007).

Até o momento não existem relatos sobre a diversidade genética do HIV-1 em pacientes do estado do Tocantins e a casuística de Mato Grosso se restringe a 50 casos descritos.

Os estados do Tocantins e do Mato Grosso são caracterizados por um forte componente migratório que pode favorecer maior diversidade genética do HIV-1. Nesse contexto, esse estudo visa contribuir para o mapeamento genético molecular do HIV-1 nestes estados do Brasil.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o subtipo do HIV-1 em pacientes dos estados do Tocantins e do Mato Grosso na região *gag* do genoma viral.

3.2. Objetivos Específicos

1. Identificar os subtipos do HIV-1 na região *gag* pelo Ensaio da Mobilidade de Heteroduplex (HMA) entre as diferentes categorias de exposição;
2. Descrever o perfil epidemiológico (sexo, idade, categoria de exposição), imunológico (contagem de células TCD4/CD8) e viral (carga viral) dos pacientes.
3. Monitorar a diversidade do HIV-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área Geográfica

4.1.1 Estado do Tocantins

O estado do Tocantins criado a partir da divisão do estado de Goiás (parte norte e central) em 1988 está situado na região Norte, sendo Palmas a capital do estado. A população é composta de nativos e imigrantes de todas as regiões do país (IBGE 2008).

Segundo último boletim do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde aproximadamente 870 casos de aids foram notificados até dezembro de 2005, sendo 61% do sexo masculino. Os municípios do estado que apresentam o maior número de casos de aids acumulados até 2005 foram: Palmas (204), Araguaína (103), Gurupi (72), Porto Nacional (30) e Paraíso do Tocantins (25).

4.1.2 Estado do Mato Grosso

O estado do Mato Grosso resultou da divisão do antigo estado em 1977. Situa-se ao norte e é caracterizado pela economia agropecuária. A diversidade populacional do estado do Mato Grosso, terceiro maior estado do país em área, reflete o extenso número de migrantes do nordeste, sul e sudeste, atraídos por políticas de incentivo governamentais (IBGE 2008).

Conforme o Boletim do Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, Mato Grosso possui 5020 casos de aids notificados até dezembro 2005, 61,3% do sexo

masculino. Os municípios do estado que apresentam o maior número de casos de aids acumulados até 2005 foram: Cuiabá (2.261), Várzea Grande (726), Rondonópolis (509), Cáceres (104) e Sinop (109).

4.2 Recrutamento dos Pacientes e Obtenção de Amostras de Sangue Total

Cento e trinta pacientes infectados pelo HIV-1 de ambos os sexos em uso ou não de antiretrovirais atendidos no Laboratório Central (LACEN) regional de Cuiabá/MT (n=60, coletados em 2005) e Palmas/TO (n=70, coletados entre 2003 e 2006) foram incluídos por demanda espontânea, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). Os pacientes foram entrevistados utilizando formulário padronizado contendo informações sócio-demográficas e epidemiológicas, como idade, sexo, procedência, nível de escolaridade, categoria de exposição e uso de antiretrovirais (Anexo 2). Coletou-se 5 mL de sangue venoso periférico em tubo vacutainer- EDTA (*Becton & Dickinson, San Jose –CA, USA*). As amostras de sangue total e plasma foram codificadas, aliquotadas, congeladas e enviadas sob refrigeração para o Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase do IPTSP/UFG onde foram estocadas em freezer -80 °C.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas/UFG.

4.3. Extração, Purificação e Quantificação do DNA Total

A extração do DNA genômico total foi realizada segundo protocolo do NIH/AIDS *Research and Reference Reagent Program (HMA HIV-1 gag subtyping*

kit protocol version 5). Resumidamente 500 µL de sangue-EDTA foram tratados com solução de lise de hemácias denominada solução A (sucrose 1 M SIGMA, Tris HCl 1 M (*Invitrogen –Life Tech, CA,USA*), MgCl₂ 1 M (SIGMA) e 1 mL de Triton-X 100 (*Invitrogen*), qsp para 100 mL de água ultrapura (Milli-Q - *Milli-Q Academic, Gradient, Biocel Synthesis, USA*)). A mistura foi homogeneizada em vórtex, centrifugada a 4000 rpm por 15 min e o sobrenadante desprezado. Foi adicionado 1 mL de DNazol (*Molecular Research Center Inc. Cincinatti, Ohio, USA*) e incubado por 15 min para promover a lise de células mononucleares periféricas. A essa solução, foi acrescido etanol 100% (*MERCK*), para precipitação do DNA genômico, seguido de resfriamento à temperatura de -80 °C por 1 h e centrifugado a 14000 rpm por 25 min em temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado.

Em seguida, o precipitado de DNA genômico foi lavado por duas vezes (1 mL de etanol 80% - *MERCK*), por centrifugação (14000 rpm por 2 min e 14000 rpm por 5 min) e o sobrenadante desprezado. O DNA genômico foi incubado por 30 min em estufa a 60 °C ou por 12 h à temperatura ambiente e posteriormente solubilizado em 50 µL de água ultrapura Milli-Q.

A quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA genômico foram determinadas pela leitura da absorbância em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (*GeneQuant RNA/DNA Calculator - Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England*) em amostra de DNA diluída (1:20 em água ultrapura). Foi utilizada uma concentração mínima de 1 ng de DNA genômico por reação de amplificação, de acordo com as recomendações do protocolo para HMA (*HMA HIV-1 gag subtyping kit protocol version 5*). As amostras de DNA genômico

contendo o DNA proviral foram armazenadas e estocadas à temperatura de -80 °C.

4.4. Amplificação de Fragmentos do Gene *gag* do DNA Proviral por Reação em Cadeia da Polimerase Tipo “nested”-PCR

“Nested”-PCR, ou PCR em duas etapas foi empregada para gerar fragmentos do gene *gag* em quantidades suficientes para serem submetidas à caracterização genotípica do HIV-1 por HMA (*HMA HIV-1 gag subtyping kit protocol version 5 - NIH/AIDS Research and Reference Reagent Program*).

A primeira etapa de amplificação da região viral *gag* foram utilizados os iniciadores (*primer*) H1P202 a 10pmol (5'-CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT-3') e H1G777 a 10 pmol (5'-TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG-3') (*GIBCO*), que amplificam um fragmento de 1,1 Kb compreendendo a região que codifica desde o aminoácido 16 da p24 até o aminoácido 33 da protease, em relação ao isolado ELI do HIV-1 do grupo M (*Genebank accession number K03454*), segundo o descrito a seguir:

<i>Água Milli-Q</i>	32,1 μ L
<i>Tampão de PCR 10X com MgCl₂ 15 mM</i>	5,0 μ L
<i>Mistura de dNTPs 25 mM</i>	0,4 μ L
<i>H1P202 10 pmol</i>	1,0 μ L
<i>H1G777 10 pmol</i>	1,0 μ L
<i>Taq DNA polimerase 5 U</i>	0,5 μ L
<i>Amostra</i>	10 μ L
<i>Volume final</i>	50 μ L

A segunda etapa de amplificação da região viral *gag* foram utilizados os iniciadores (*primer*) H1Gag1584 a 10 pmol (5'-AAAGATGGATAATCCTGGG-3') e g17 a 10 pmol (5'-TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT-3') (GIBCO), que amplificam um fragmento de cerca de 460 pb correspondente à região que codifica desde o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7, no genoma do isolado ELI do HIV-1 do grupo M (*Genebank accession number K03454*), segundo o descrito a seguir:

Água Milli-Q	63,5 μ L
Tampão de PCR 10X c/ MgCl ₂ 15 mM	16,7 μ L
Mistura de dNTPs 25 mM	0,8 μ L
H1Gag1584 10 pmol	4,0 μ L
g17 10 pmol	4,0 μ L
Taq DNA polimerase 5 U	1,0 μ L
Produto da 1ª etapa de amplificação	10,0 μ L
Volume final	100 μ L

Tanto para a primeira quanto para a segunda etapa da PCR, foram realizados em termociclador (*Perkin Elmer - GeneAmp PCR Systems 2.400, Connecticut, USA*). A primeira etapa de amplificação pela PCR da região *gag* foi realizada utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo a 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72 °C por 90 seg; 1 ciclo a 72 °C por 7 min; 4°C por tempo indeterminado. A segunda etapa da PCR da região *gag* utilizou o programa: 1 ciclo a 94 °C por 2 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 50 °C por 30 seg e 72°C por 60 seg; 1 ciclo a 72 °C por 7 min; 4°C por tempo indeterminado.

4.5 Amplificação das Cepas de Referência do Gene *gag* do HIV-1

Região *gag* de cepas de referência de subtipos conhecidos inseridas em plasmídeos de DNA foram obtidas mediante convênio com o NIH/AIDS *Research and Reference Reagent Program*, USA. As cepas de referência foram amplificadas com os iniciadores empregados na segunda etapa da “nested”-PCR. Desta forma, a etapa de hibridização de DNA para realização da HMA (amostra-teste + cepa de referência) emprega fragmentos de comprimentos semelhantes.

Para a subtipagem do HIV-1 na região do gene *gag* pela HMA utilizamos cepas de referência representando os subtipos genéticos do HIV-1 mais prevalentes no Brasil: B (B1, B2, B3), C (C1, C2), D (D1, D3) e F (F1, F2). Cada subtipo possui pelo menos duas cepas de referência provenientes de isolados diferentes mas pertencentes ao mesmo subtipo.

4.6 Eletroforese em Gel de Agarose 1%

O produto da segunda etapa de amplificação das amostras - testes e das cepas de referência foram aplicados em gel de agarose 1% (*GIBCO*) em uma mistura contendo 5 μ L de material amplificado + 2 μ L do corante marcador da corrida Xileno Cianol 0,2% *USb Corporation*, (sacarose 40%, *SIGMA*) e + 5 μ L de água Milli-Q. Em cada gel foi utilizado um padrão de peso molecular (100 *bp DNA Ladder*, *GIBCO*). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (*Horizon 11-14 and 25-25 Gel Electrophoresis Apparatus*, *GIBCO*) durante 1 h a 100 V (*Bio-RAD Power Pac 300*, USA), em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA, *GIBCO*) com brometo de etídio 0,005% (*GIBCO*), - 50 μ L/L de tampão. O gel foi analisado no transluminador (*FOTO/Prep I Preparative DNA Transilluminator – Fotodyne*;

Hartland, USA) sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda e a visualização de bandas fluorescentes, com peso molecular próximo a 500 bp confirmava a amplificação do fragmento desejado.

4.7 Análise da Mobilidade de Heteroduplex dos Subtipos de HIV-1 do Gene *gag*

A técnica da HMA foi realizada segundo protocolo NIH/AIDS *Research and Reference Reagent Program: HMA HIV-1 gag subtyping kit protocol version 5*. Para geração dos híbridos, juntou-se a solução contendo 5 µL das diferentes cepas de referência na concentração de 10 ng/mL em Tris HCl 10 mM (pH 7,4) e EDTA 0,1 mM (pH 8,0), em seqüência à 5 µL da amostra-teste e 1,2 µL de tampão de anelamento 10X (NaCl 1 M *Art Lab*, Tris HCl 100 mM *Invitrogen* pH 7,8, EDTA 20 mM *SIGMA*). A mistura foi aquecida a 94 °C durante 2 min e imediatamente resfriada em banho de gelo por 10 min. Foi adicionado à mistura 2 µL do corante marcador de corrida (azul de bromofenol 0,1% *GIBCO*) e posteriormente aplicada no gel de poliacrilamida a 5% preparado conforme o descrito a seguir:

<i>Solução Estoque de Acrilamida /Bisacrilamida</i>	8,3 mL
<i>TBE 10X (Tris-Borato-EDTA 10X)</i>	5,0 mL
<i>APS (Persulfato de Amônia)</i>	50 mg
<i>TEMED (N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine)</i>	33 µL
<i>Água Milli-Q qsp</i>	50 mL

A solução estoque de Acrilamida/Bisacrilamida foi preparada a 30% em Acrilamida e 0,8% em Bisacrilamida, em água Milli-Q. O TBE 10X concentrado foi preparado a partir de ácido bórico 5,5%, Tris-base 10,8%, 40 mL de EDTA 0,5M

pH 8,0 e água Milli-Q suficiente para 1000 mL. Para a subtipagem genética na região *gag*, o gel de poliacrilamida foi preparado com uréia 20% (*Invitrogen*). O gel foi polimerizado durante 60 min em placas de vidro de 16 cm de altura x 19,5 cm de largura (placa anterior) e 19 cm de altura x 19,5 cm de largura (posterior), espaçadores de 1,5 mm de espessura e pentes com 20 canaletas.

A eletroforese foi realizada em cuba vertical (*V16-2 Vertical Gel Apparatus, GIBCO*) durante 2,5 h a 250 V (*Bio-RAD Power Pac 300, USA*) em TBE 1X (*HMA HIV-1 gag subtyping kit protocol version 5*) com uma pré-corrída de 15 min a 250 V antes da aplicação das amostras.

O gel foi corado através da imersão em TBE 1X com brometo de etídio 0,005% GIBCO - 50 µL/L, durante 20 min. A mobilidade dos híbridos foi analisada no transluminador (*FOTO/Prep I Preparative DNA Transilluminator – Fotodyne; Hartland, USA*) sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda. Os resultados das corridas eletroforéticas foram registrados em câmera digital (*DC 290 Zoom KODAK Digital Camera, Rochester, NY, USA*), as fotos analisadas pelo programa – *1D Image Analyses Software Windows Limited Edition, version 3.5, NY, USA* e arquivadas no Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase do IPTSP/UFG.

4.8. Análise Estatística

O banco de dados foi e analisado pelo programa EpiInfo 3.4.3 (*CDC Epidemiology Program Office, Atlanta, USA & WHO Global Programme on AIDS, Geneva, Switzerland*) para cálculos de freqüências, médias e medianas das principais variáveis.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo da Diversidade Genética do HIV-1 em Pacientes do Estado do Tocantins

5.1.1 Características da População Estudada (n=70)

A tabela 1 mostra as principais características dos 70 pacientes HIV-1+/aids do estado do Tocantins. A mediana de idade foi de 34 anos (variação 21 – 71 anos) e 60,0% (42/70) era do sexo masculino. O contato heterossexual representou a via predominante de exposição ao HIV-1 relatado por 62,9% (44/70) dos participantes. Usuários de drogas injetáveis representaram 2,9% (2/70) dos casos, 1 paciente relatou transfusão sanguínea e 22,9% (16/70) dos pacientes a via de contaminação é ignorada. A mediana da contagem de células T CD4 foi de 376,5 células/ μ L (variação 17 – 1.181 células/ μ L), e a mediana da carga viral foi de 11.000 cópias/mL (130– 970.000 cópias/mL). Com relação ao nível de escolaridade dos pacientes HIV-1⁺/aids, 53,0% concluíram o ensino fundamental.

A maioria dos pacientes (50/66) declarou residir há mais de 10 anos no estado do Tocantins, 35 deles na capital Palmas, 15 em cidades do entorno (15/50) e 71,2% (42/59) foram diagnosticados depois do ano 2000 (dados não mostrados). Aproximadamente um quarto dos pacientes (16/66) era procedente de diferentes Estados do país: Rio de Janeiro (1 paciente), Bahia (1 paciente), Distrito Federal (1 pacientes), Goiás (3 pacientes), Maranhão (3 pacientes), São Paulo (3 pacientes) e Pará (4 pacientes) (Tabela 2).

Tabela 1 - Características dos Pacientes HIV+/aids do Estado do Tocantins

		%
Sexo (n)		
Masculino	42,0	60,0
Idade (anos)		
Mediana (variação)	34,0 (21,0-71,0)	
<25	7,0	10,1
25-49	58,0	84,1
>49	4,0	5,8
Escolaridade ^a (n)		
Analfabeto	1,0	1,5
Ensino fundamental	35,0	53,0
Ensino médio	20,0	30,3
Ensino superior	10,0	15,2
T CD4⁺ células/μL^b		
Mediana (variação)	376,5 (17,0-1.181,0)	
Carga viral cópias/mL^d		
Mediana (variação)	11.000,0 (130,0-970.000,0)	
AND ^c (n)	28,0	40,6
Categoria de exposição ^e (n)		
Sexual		
Heterossexual	44,0	62,9
Homossexual	4,0	5,7
Bissexual	3,0	4,3
Parenteral		
UDI	2,0	2,9
Transfusão sanguínea	1,0	1,4
Ignorada	16,0	22,9
TARV ^f (n)		
Sim	45,0	75,0
Não	15,0	25,0

^a Escolaridade (n=66)

^b Contagem de células T CD4+ (n=68)

^c Contagem de Carga viral (n=69)

^d AND – Abaixo do Nível de Detecção de 50 cópias/mL

^e Categoria de exposição (n=70)

^f TARV – Tratamento antiretroviral (n=60)

5.1.2 Diversidade Genotípica do HIV-1 na Região do Gene *gag* de Pacientes do Estado do Tocantins

Utilizando-se os pares de iniciadores H1P202/ H1G777 e H1Gag1584/ g17, o produto de PCR na região *gag* foi obtido em 71,4% das amostras (50/70). Dentre as amostras inicialmente não amplificadas (n=20), 14 amostras foram amplificadas com os iniciadores alternativos HGHMA822/ g17, totalizando eficácia de 91,4% na amplificação da região *gag* dos isolados estudados. As seis amostras que não foram amplificadas tinham a carga viral abaixo do nível de detecção pela amplificação e/ou o número de células T CD4+ estava baixo.

Dentre as 64 amostras de HIV-1 analisadas por HMA *gag*, 82,8% (53/64) eram do subtipo B do HIV-1. Outros subtipos do HIV-1 foram também detectados na região de *gag*, tais como: o subtipo F em 7,8% das amostras (5/64), o subtipo C em 4,7% (3/64) e os subtipos B/D em 4,7% (3/64) (Gráfico1). Dois isolados caracterizados como subtipo F são de pacientes procedentes de outros estados. Um do estado de Goiás e o outro do estado de São Paulo. O único paciente procedente da Bahia teve o seu isolado caracterizado como B/D. Os pacientes dos demais estados o HIV-1 foi do subtipo B (Tabela 2).

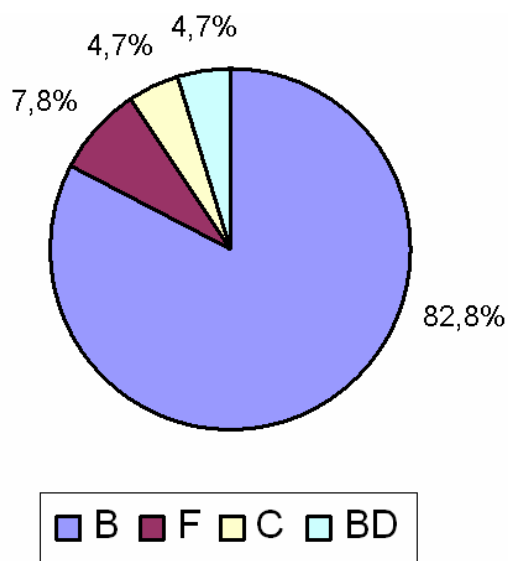


Gráfico 1: Diversidade Genotípica na Região do Gene *gag* do HIV-1 de Pacientes do Estado do Tocantins (n=64).

Tabela 2: Diversidade Genotípica na Região do Gene *gag* do HIV-1 de Pacientes Residentes no Estado do Tocantins Procedentes de Outros Estados

	B	F	C	B/D
Rio de Janeiro	1 (1,5%)	-	-	-
Bahia	-	-	-	1 (1,5%)
Distrito Federal	1 (1,5%)	-	-	-
Goiás ^a	1 (1,5%)	1 (1,5%)	-	-
Maranhão	3 (4,7%)	-	-	-
São Paulo	2 (3,2%)	1 (1,5%)	-	-
Pará ^a	2 (3,2%)	-	-	-

^a As amostras de um paciente de Goiás e de dois pacientes do Pará não amplificaram após a "nested"-PCR com primers alternativos, portanto não foi possível subtipá-las.

A maioria dos pacientes do Tocantins com HIV-1 subtipo B na região *gag* era do sexo masculino (33/53) (Gráfico 2). Dentre os pacientes que relataram a categoria de exposição heterossexual 89,7% (35/39) apresentaram o subtipo B do HIV-1, três pacientes possuíam subtipo C e um o subtipo F. Os pacientes que relataram a categoria de exposição homo/bissexual, 5 eram do subtipo B (3 com

exposição homossexual e 2 bissexual), um do subtipo F (exposição homossexual) e um do subtipo B/D (exposição bissexual) (Gráfico3).

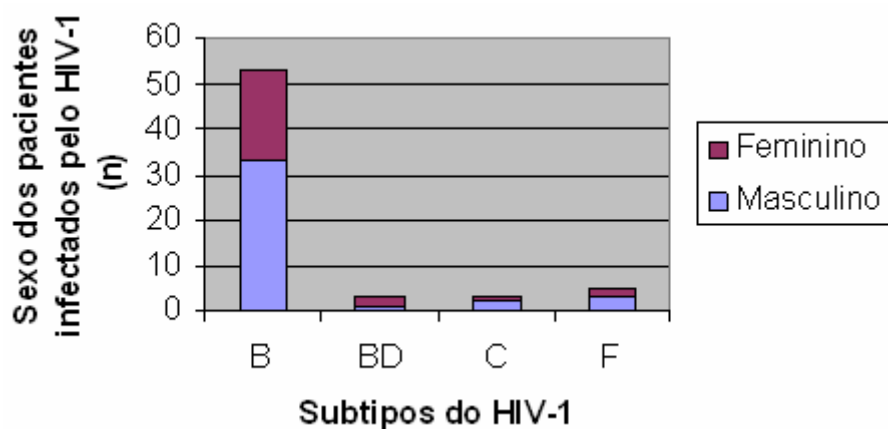


Gráfico 2: Distribuição do Sexo dos Pacientes (TO) de acordo Com os Subtipos do HIV-1.

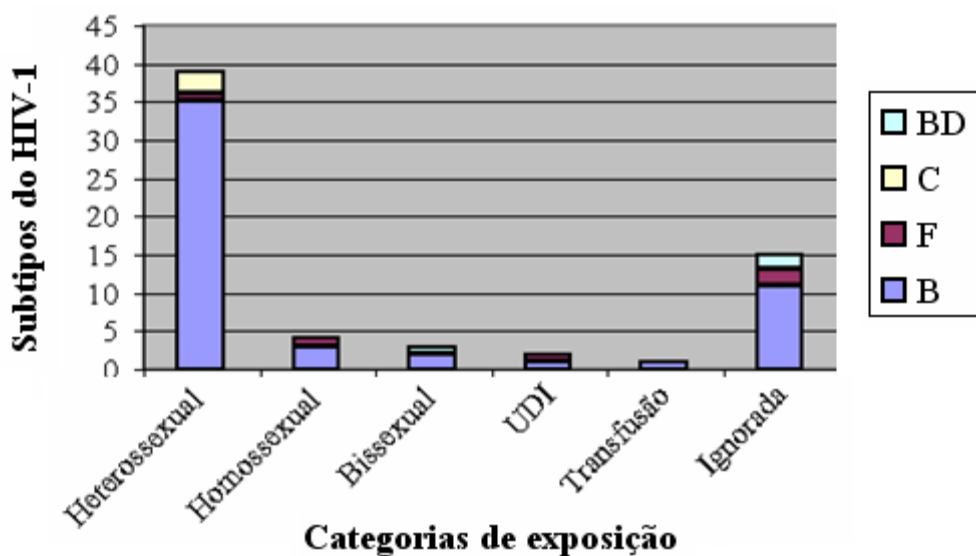


Gráfico 3: Distribuição dos Subtipos do HIV-1 dos Pacientes (TO) de acordo Com a Categoria de Exposição.

5.2 Estudo da diversidade genética do HIV-1 em pacientes do estado do Mato Grosso

5.2.1 Características da População Estudada (n=60)

A tabela 3 apresenta as principais características dos 60 pacientes HIV-1+/aids do estado do Mato Grosso. A mediana de idade foi de 35,5 anos (variação 4 anos – 64 anos) e 48,3% (29/60) era do sexo masculino. O contato heterossexual representou a via predominante de exposição ao HIV-1 (88,3% - 53/60). Um paciente relatou recebimento de transfusão sangüínea, um caso era de transmissão vertical e um paciente mencionou acidente de trabalho. A mediana das contagens de células T CD4 foi de 388 células/ μ L (variação 37 – 958 células/ μ L), e a mediana da carga viral foi de 9.000 cópias/mL (variação 25 – 180.000 cópias/mL). Com relação ao nível de escolaridade dos pacientes HIV-1+/aids, 56,7% concluíram o ensino fundamental.

Aproximadamente 98% (59/60) dos pacientes declarou residir há mais de 10 anos no estado do Mato Grosso, a maioria deles na capital Cuiabá (37/60) em cidades do entorno (22/60) e 73,3% (44/60) recebeu o diagnóstico de infecção pelo HIV-1 após o ano 2000 (dados não mostrados).

Tabela 3 – Características dos Pacientes HIV+/aids do Estado do Mato Grosso

		%
Sexo (n)		
Masculino	29,0	48,3
Idade (anos)		
Mediana (variação)	35,5 (4-64)	
<5	1,0	1,7
25-49	54,0	90,0
>49	5,0	8,3
Escolaridade ^a (n)		
Analfabeto	4,0	6,7
Ensino fundamental	34,0	56,7
Ensino médio	17,0	28,3
Ensino superior	5,0	8,3
T CD4+ células/μL ^b		
Mediana (range)	388,0 (37,0-958,0)	
Carga viral cópias/mL ^d		
Mediana (range)	9.000,0 (25,0-180.000,0)	
AND ^c (n)	32,0	54,2
Categoria de exposição ^e (n)		
Sexual		
Heterossexual	53,0	88,3
Homossexual	3,0	5,0
Parenteral		
Transfusão sangüínea	1,0	1,7
Acidente de trabalho	1,0	1,7
Transmissão vertical	1,0	1,7
Ignorada	1,0	1,7
TARV ^f (n)		
Sim	52,0	86,7
Não	8,0	13,3

^a Escolaridade (n=60)

^b Contagem de células T CD4+ (n=59)

^c Carga viral (n=59)

^d AND – Abaixo do Nível de Detecção de 50 cópias/mL

^e Categoria de exposição (n=60)

^f TARV – Tratamento anti-retroviral (n=60)

5.2.2 Diversidade Genotípica do HIV-1 na Região do Gene *gag* de Pacientes do Mato Grosso

A maioria das amostras foi amplificada (67,16% - 45/60) utilizando-se os pares de iniciadores H1P202/ H1G777 e H1Gag1584/ g17. O produto de PCR foi identificado em gel de agarose. Empregando-se os pares de iniciadores alternativos HGHMA822/g17 observamos o produto de PCR em 9 de 15 amostras não amplificadas totalizando eficácia de 90% na amplificação da região *gag* dos isolados de HIV-1 dos pacientes do Mato Grosso. As seis amostras que não foram amplificadas tinham a carga viral abaixo do nível de detecção pela amplificação e/ou o número de células T CD4+ estava baixo.

A metade (27/54) das amostras subtipadas por HMA *gag* era subtipo B do HIV-1. Outros subtipos do HIV-1 foram também detectados na região de *gag*: os subtipos B/D em 31,5% (17/54), o subtipo C em 11,1% (6/54), o subtipo F em 5,6% (3/54) e os subtipos B/F em uma amostra (Gráfico 4).

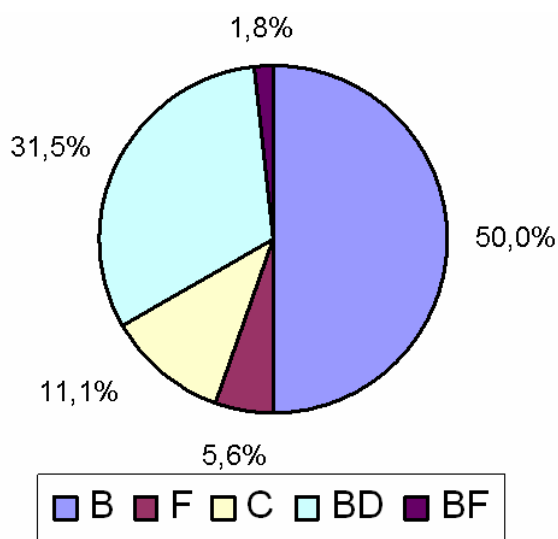


Gráfico 4: Diversidade Genotípica na Região do Gene *gag* do HIV-1 de Pacientes do Estado do Mato Grosso (n=54).

A maioria dos pacientes do Mato Grosso com HIV-1 subtipo B na região *gag* era do sexo masculino (15/27) (Gráfico 5). Todos os subtipos de HIV-1 identificados foram observados entre os pacientes da categoria de exposição sexual – heterossexual: 25/48 – HIV-1 subtipo B, 4 casos de subtipo C, três pacientes com subtipo F. Dezesesseis pacientes dessa categoria apresentaram isolados sugestivos recombinação ente os subtipos B/D (15/16) e 1 caso com HIV-1 subtipo B/F (Gráfico 6).

Os três pacientes que relataram a categoria de exposição sexual – homossexual tiveram suas amostras caracterizadas como subtipo B, C e B/D. O único paciente infectado por transmissão vertical no presente estudo tinha o HIV-1 subtipo B. O isolado de HIV-1 do paciente que relatou contaminação acidental era do subtipo C (Gráfico 6).

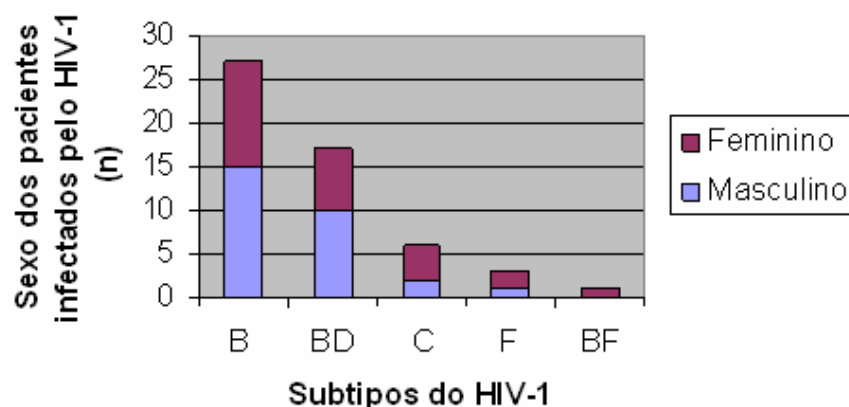


Gráfico 5: Distribuição do Sexo dos Pacientes (MT) de acordo Com os Subtipos do HIV-1.

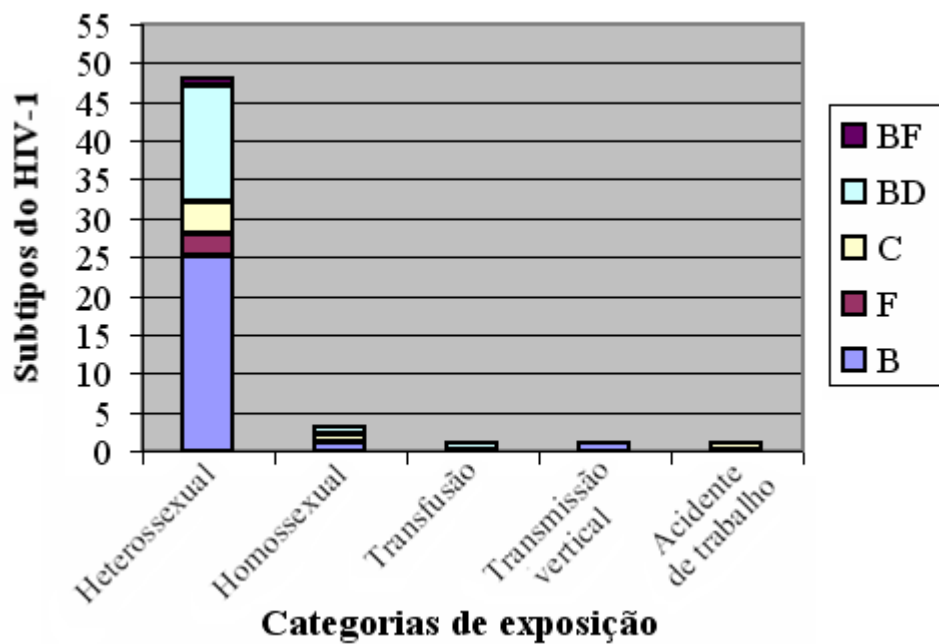


Gráfico 6: Distribuição dos Subtipos do HIV-1 dos Pacientes (MT) de acordo Com a Categoria de Exposição.

6. DISCUSSÃO

A aids no Brasil é uma epidemia multifacetada, que é composta por várias subepidemias, não possuindo um perfil epidemiológico único em todo o território brasileiro, mas um mosaico de subepidemias regionais que são motivadas pelas desigualdades socioeconômicas e por diferenças históricas e culturais (Brito et al. 2000).

Nos estados do Tocantins e Mato Grosso existe uma diversidade populacional devido ao forte componente migratório presente em ambos os estados que contribuiu para a formação de populações heterogêneas. Este fato pode colaborar para a diversidade genética do HIV nestas populações, devido à aglutinação de indivíduos infectados de diferentes locais de origem e que podem apresentar diferentes subtipos do HIV-1. Tocantins foi o estado que apresentou o maior número de pacientes de outros locais de origem, aproximadamente um quarto (16/66). No estado do Mato Grosso apenas um paciente era procedente do estado de Roraima. Este fato pode ser justificado pela formação mais recente do estado do Tocantins.

A partir da década de 90 ocorre uma mudança no perfil epidemiológico da aids no Brasil em que se observou os processos de heterossexualização, feminilização, juvenilização, pauperização e interiorização dos casos de aids (Brito et al. 2004). Alguns estados do Nordeste e Norte (Pernambuco, Ceará, Maranhão, Paraíba e Pará) permaneceram com características do início da epidemia da aids no país até o final da década de 90, por causa do número elevado de pessoas infectadas pela via de exposição homossexual/bissexual (Brito et al. 2000). A análise dos dados coletados através de inquérito epidemiológico, nos mostrou que

os pacientes de ambos os estados (TO e MT) possuem características epidemiológicas semelhantes ao observado na maioria das regiões do país. Nos dois estados destacaram-se a população jovem, a categoria de exposição heterossexual, o nível de escolaridade baixo com o número de mulheres infectadas semelhante ao dos homens.

A maior prevalência do subtipo B no Brasil como um todo, indica um “efeito fundador” deste subtipo, sugerindo que o subtipo B provavelmente foi o primeiro subtipo a ser introduzido no país e a partir daí foi amplamente disseminado pelas vias sexual, perinatal e parenteral (Morgado et al. 1994, Galvão-Castro et al. 1996, Morgado et al. 1998, Bongertz et al. 2000, Vicente et al. 2000, Morgado et al. 2002, Brindeiro et al. 2003, Couto - Fernandez et al. 2006). O subtipo B é prevalente em estados do interior do Brasil, como Mato Grosso e Tocantins, onde a epidemia é mais recente do que a dos estados portuários (exemplo São Paulo e Rio de Janeiro), caracterizando um processo de interiorização do HIV-1.

Os resultados desse estudo conduzido em indivíduos infectados no Mato Grosso e Tocantins indicando a prevalência do subtipo B são compatíveis com os dados dos estudos de diversidade genética do HIV-1 nos estados do Centro-Oeste e Norte do país (Álvares Júnior 1999, Vicente et al. 2000, Stefani et al. 2000, Alcântara 2003, Pereira et al. 2004, Pereira et al. 2006, Stefani et al. 2007, Vêras et al. 2007). O subtipo B do HIV-1 foi detectado no estado do Mato Grosso na metade das amostras. Este resultado é concordante com o estudo publicado sobre a diversidade genética do HIV-1 em que 50 amostras isoladas do Mato Grosso em 2001 que foram analisadas por técnica de triagem molecular e mais de 70% apresentaram subtipo B nas regiões *env* e *gag* (Stefani et al. 2007).

A diminuição da porcentagem do HIV-1 subtipo B no Estado do Mato Grosso no presente estudo, quando comparado com os resultados de Stefani et al. em 2007, pode ser provavelmente explicada pelo fato de termos detectado no presente estudo um terço de amostras que apresentaram simultaneamente os subtipos B e D na região *gag*. Os subtipos B e D são geneticamente tão semelhantes que não é possível diferenciá-los com segurança pelo HMA, somente o seqüenciamento das amostras revelará com certeza o subtipo de HIV-1 nessa região do genoma. Devido a essa alta homologia genética entre os subtipos B e D, alguns autores classificam o subtipo D como sub-subtipo B2 (Geretti 2006, Thomson et al. 2002). Outros estudos de triagem molecular do HIV-1 conduzidos na região do Centro-Oeste indicaram que o subtipo D é pouco prevalente nesta região (Alcântara 2003, Cerqueira et al. 2004, Pereira et al. 2004, Lins 2005). Entre os isolados analisados por Stefani et al. (2007) não foi observado nenhum isolado que apresentasse o subtipo D nas regiões *env* e *gag*. O subtipo D do HIV-1 foi detectado em uma menor proporção em pacientes no sudeste do país. Estudos moleculares de seqüenciamento indicam que o subtipo D do Brasil apresenta uma estreita relação filogenética com o subtipo D que circula em pacientes na África do Sul (Couto -Fernandez et al. 2006). Diante do exposto, não é possível excluir a possibilidade de que os isolados B/D observados sejam na verdade HIV-1 do subtipo B.

Nos outros estados do Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso do Sul) e nas regiões vizinhas aos estados estudados (Norte e Nordeste) a prevalência de subtipos do HIV-1 é semelhante à encontrada nesse estudo. Em Goiás e em Mato Grosso do Sul mais de 70% das amostras foram caracterizadas genotipicamente como subtipo B, quando foram analisadas 271 amostras coletadas em Goiânia no

período de 2001 a 2004 e 85 amostras coletadas em Campo Grande no ano de 2004 (Stefani et al. 2007). Outra análise feita em isolados do estado de Goiás, em diferentes subgrupos populacionais: em pares de mães HIV-1+ e filhos infectados por transmissão vertical, crianças/adolescentes HIV-1+ e em pacientes HIV-1+/aids co-infectados com *Mycobacterium leprae*, mostraram a predominância do subtipo B, seguidos de isolados de HIV-1 com subtipos discordantes B/F (Alcântara 2003, Pereira et al. 2004, Lins 2005). Cerqueira et al. em 2004 realizaram seqüenciamento automatizado dos genes da TR e PR, em 45 amostras provenientes de pacientes do Distrito Federal. A maioria dessas amostras se agrupou filogeneticamente com seqüências do subtipo B (96%) e 4% apresentaram o padrão recombinante B/F. Estudo publicado três anos depois com 41 isolados de pacientes infectados pelo HIV-1 residentes em Brasília, nos quais foram seqüenciadas as regiões *env* e *pol*, mostrou números praticamente idênticos em que 95,1% eram subtipo B e 4,9% eram recombinante B/F (Véras et al. 2007).

As informações sobre a diversidade genética do HIV-1 no Nordeste do Brasil são escassas. Em 2003 Gadelha et al. avaliaram a diversidade do HIV-1 em 149 pacientes do Ceará por HMA *env* e *gag*. Os resultados indicaram predominância do subtipo B (94%), seguida pelo subtipo F (2,7%) e B/F (2,7%). Em Pernambuco, Medeiros et al. (2006), publicaram estudo com 84 isolados seqüenciados na região *pol* do vírus: 72,6% eram subtipo B, 22,6% subtipo F, 3,6% subtipo B/F e uma amostra subtipo C. No estado do Maranhão, que faz divisa com o estado do Tocantins, não existem estudos conhecidos. Mas no estado da Bahia, que também faz divisa com o estado do Tocantins, Couto-Fernandez e et al. realizaram um estudo pioneiro em usuários de drogas injetáveis

de Salvador/BA que detectou na região *env* o subtipo B (89,5%), o subtipo F (3%) e HIV-1 B/F (7,5%). Entre os pacientes que relataram via de exposição sexual (77,4% homossexuais), 95% apresentaram HIV-1 do subtipo B, 3,4% HIV-1 BF e 1,6% HIV-1 subtipos B/C/E (Couto-Fernandez et al. 1999). Um estudo mais recente, realizado por Pedroso et al. (2007), seqüenciou a região *pol* do vírus de 140 amostras coletadas entre 2000 e 2004 em Salvador/Ba, onde 84% eram subtipo B, 8% subtipo F e 2,5% subtipo C (encontrado pela primeira vez no estado da Bahia).

Poucos estudos descrevem a epidemiologia molecular do HIV-1 na região norte. Estudo realizado em isolados de 31 pacientes de Manaus/AM, seqüenciadas na região C2V3 do envelope indicou circulação dos subtipos B (38,7%), subtipo F (12,9%) e recombinantes B/F (35,5%) (Vicente et al. 2000).

A predominância do subtipo B do HIV-1 no Mato Grosso e Tocantins, também foi observada em outros estudos de diversidade genética do HIV-1 na Bolívia que faz fronteira com o estado do Mato Grosso. O HIV-1 subtipo B também predomina em outros países da América do Sul, como Peru e Equador (Hierholzer et al. 2002).

O subtipo F foi encontrado na região *gag* do vírus HIV-1 em pacientes dos estados do Tocantins e do Mato Grosso. Dois pacientes residentes atualmente em Tocantins com vírus HIV-1 caracterizado como subtipo F procedem de outros estados do país. Um paciente procede de São Paulo e o outro de Goiás. Em ambos os estados de origem dos pacientes, o subtipo F é encontrado como forma recombinante com o subtipo B, sendo a segunda forma genética mais importante nesses estados (Sá Filho et al. 2006, Stefani et al. 2007).

Estudos prévios realizados no Sul e Sudeste brasileiro indicaram o subtipo F como a segunda variante do HIV-1, mais prevalente no país (Morgado et al. 1994, Galvão-Castro et al. 1996, Morgado et al. 1998, Vicente et al. 2000, Morgado et al. 2002, Gadelha et al. 2003). Esses estudos iniciais que apontavam o subtipo F, como o segundo subtipo mais prevalente, foram baseados na análise de uma ou duas regiões do genoma do HIV-1 (*env*, *gag* ou *pol*) (Morgado et al. 1994, Galvão-Castro et al. 1996, Morgado et al. 1998). O nosso estudo também avaliou uma única região do genoma e mostrou que apenas no estado do Tocantins o subtipo F foi encontrado como o segundo subtipo mais prevalente.

Estudos mais recentes de genoma completo ou quase completo do HIV-1 subtipo F indicam alto percentual de formas recombinantes BF (Brígido et al. 2005, Sá Filho et al. 2006, Sanabani et al. 2006, Guimarães et al. 2008). Um estudo recente realizado com 11 amostras recombinantes BF provenientes da cidade de Santos/SP relatou a presença de dois novos CRFs denominados CRF28_BF, circulante na região de Santos, e CRF29_BF detectada em pacientes da cidade de Santos, São Paulo e Rio de Janeiro (Sá Filho et al. 2006). Em pacientes infectados pelo HIV-1 do estado do Rio de Janeiro, outros dois CRFs envolvendo os subtipos B e F foram recém descritos: CRF39_BF e CRF40_BF (Guimarães et al. 2008). Portanto a análise em apenas uma região do genoma viral pode ter subestimado a diversidade genética do HIV-1 em nossa amostragem.

Em outros países da América do Sul (Argentina, Uruguai, Bolívia, Equador e Peru) observaram-se resultados semelhantes quando limitados à análise de uma única região do genoma do HIV-1. Na Argentina e no Uruguai o recombinante BF mais prevalente (CRF12_BF) apresenta uma pequena porcentagem de seqüência nucleotídica do subtipo B inserido na seqüência nucleotídica do subtipo F. Essa

característica pode levar a identificação do subtipo F pelo HMA, uma vez que esta técnica não é capaz de detectar pequenas diferenças nucleotídicas identificadas pelo seqüenciamento. Nos recombinantes BF no Sudeste brasileiro (CRF28_BF e CRF29_BF) a seqüência de nucleotídeos na região *env* e, em aproximadamente 50% da seqüência de nucleotídeos da região *gag* do genoma viral possui similaridade com o subtipo B. Os outros 50% da região *gag* e a região *pol* pertencem ao subtipo F. Não podemos descartar a possibilidade do subtipo F do HIV-1 encontrado no nosso estudo ser uma forma recombinante se outras regiões genômicas forem analisadas.

Apesar do subtipo F ainda ser freqüente nos países da costa Atlântica da América do Sul como Argentina e Uruguai, este se apresenta como forma recombinante. O HIV-1 recombinante envolvendo o subtipo F são os vírus mais prevalentes nesses países. À proporção que seguimos na direção dos países andinos, como Bolívia, Peru e Equador, observamos a diminuição gradativa e significativa destes recombinantes (Hierholzer et al. 2002). Bolívia é um país considerado intermediário quanto ao número de isolados caracterizados como recombinante BF, considerando-se o número elevado de recombinantes na Argentina e Uruguai e pequeno no Peru e Equador. Nos países andinos a epidemia é causada primariamente pelo subtipo B (Hierholzer et al. 2002).

O percentual de amostras HIV-1 subtipo C no Mato Grosso no presente estudo foi mais elevado (11,1%) que o observado nas amostras coletadas em 2001 (2%). No Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul) o percentual de HIV-1 subtipo C varia de 1,2% a 2% das amostras subtipadas (Stefani et al. 2007). Já na amostragem do estado do Tocantins, observamos a presença do subtipo C em 4,7% dos isolados. Este é o primeiro trabalho

conhecido que detectou o subtipo C no norte do país, mediante o número escasso de estudos nesta região.

A epidemia do HIV-1 subtipo C no Brasil é concentrada no Sul (Soares et al. 2005, Locateli et al. 2007), porém sua disseminação para outros estados brasileiros e países vizinhos tem sido relatada (Brindeiro et al. 2003, Carrion et al. 2004). Análises de amostras de HIV-1 coletadas entre 1992 a 2001, em vários estados brasileiros mostraram que o subtipo C vem se disseminando mais rapidamente do que o subtipo B no Brasil.

Nas amostras coletadas em 2001 no Mato Grosso, o subtipo C foi o quarto subtipo mais prevalente nos isolados e foi detectado na forma recombinante com o subtipo B (B/C) pela análise das regiões virais *env* e *gag* (Stefani et al. 2007). No presente estudo o subtipo C foi mais prevalente que o subtipo F. Esses dados sugerem que o HIV-1 subtipo C está se disseminando no interior do país, particularmente no Estado do Mato Grosso, como exemplo da sua prevalência no Sul do país. Esta capacidade de disseminação mais rápida do subtipo C no Brasil é justificada por sua maior variabilidade em relação ao subtipo C da África do Sul. Isso ocorre pelo fato do tratamento com os antiretrovirais causar uma pressão seletiva em todas as cepas circulantes no Brasil e particularmente nas regiões Sul e Sudeste do país onde há uma maior disponibilidade de tratamento (Salemi et al. 2005).

O HIV-1 subtipo C foi primeiramente descrito no Centro-Oeste do Brasil em 2000, em uma gestante proveniente da região Sul do Brasil (Stefani et al. 2000). Um estudo publicado em 2007 sobre a diversidade genética do HIV-1 no Centro-Oeste confirma a introdução e dispersão do subtipo C em direção a região norte do país (Stefani et al. 2007). Nenhum dos pacientes recrutados no Mato Grosso e

no Tocantins relatou uma ligação direta com a região Sul, mas é possível que fluxos migratórios e o contato com populações vindas do Sul possam ter contribuído para a introdução deste subtipo no Norte do Brasil.

Em um percentual reduzido das amostras foi possível determinar o subtipo na região *env* pelo HMA. Mas dificuldades técnicas impediram a subtipagem nesta região para a maioria das amostras. O protocolo utilizado para a realização do HMA *env* foi padronizado por Mullins et al. em 1995. Submetemos os isolados a vários *primers* diferentes sem sucesso. Realizamos alterações no protocolo na tentativa de otimizar a PCR, mas não obtivemos resultados positivos. A região *env* do vírus HIV-1 possui uma maior variabilidade genética do que as outras regiões. A distância entre os aminoácidos da região *env* entre os subtipos do grupo M alcança 25-35%, enquanto na região *gag* é em torno de 15% (Thomson et al. 2002, Takebe et al. 2004), devido esta região codificar proteínas do core, que formam uma estrutura relativamente inflexível (Wainberg et al. 2004). As amostras que não foram subtipadas na região *gag* podem ter sido proveniente de pacientes com carga viral baixa, contagem de linfócitos CD4+ reduzidos, subtipo viral muito divergente e a presença de fatores inibidores de amplificação que podem comprometer a eficiência da técnica HMA (Mullins 1995, Lins 2005).

Empregamos o HMA, técnica implementada pela UNAIDS em diversos países em desenvolvimento, como os países da América do Sul. O HMA é uma técnica de triagem molecular de menor custo, considerada sensível e confiável para o monitoramento do HIV-1. Embora o “padrão ouro” para estudos de diversidade genética seja o seqüenciamento automatizado, o alto custo desta técnica pode limitar sua ampla utilização em países em desenvolvimento (Delwart et al. 1993, Heyndrickx et al. 2000). Vários estudos têm mostrado alto grau de

concordância entre os resultados do HMA e seqüenciamento (UNAIDS 1997a e b, Heyndrickx et al. 2000, Sawadogo et al. 2003). Portanto, os nossos resultados, obtidos no Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase do IPTSP/UFG, com a técnica de triagem molecular do HIV-1 HMA *gag*, contribuem para o entendimento da variabilidade genética do HIV-1 na região Centro-Oeste e Norte do Brasil.

7. CONCLUSÕES

1. A utilização da técnica HMA *gag* permitiu realizar a triagem molecular do HIV-1 em amostras de HIV-1 dos estados do Tocantins e Mato Grosso, contribuindo para o mapeamento genético molecular do HIV-1, na região do Centro – Oeste e Norte do Brasil;

2. O subtipo B do HIV-1 foi predominante nas amostras testadas (TO: 82,8%, MT: 50,0%) entre homens, mulheres e em todas as categorias de exposição;

3. O subtipo F do HIV-1 foi a segunda forma mais predominante no estado do Tocantins;

4. Primeiro estudo conhecido a detectar o subtipo C no estado do Tocantins e como a terceira forma do HIV-1 mais predominante.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

Abebe A, Pollakis G, Fontanet AL, Fisseha B, Tegbaru B, Kliphuis A, Tesfaye G, Negassa H, Cornelissen M, Goudsmit J, Rinke de Wit TF 2000. Identification of a genetic subcluster of HIV type 1 subtype C (C) widespread in Ethiopia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1909–1914.

Alaeus A, Lidman K, Bjorkman A, Giesecke J, Albert J 1999. Similar rate of disease progression among individuals infected with HIV-1 genetic subtypes A-D. *AIDS* 13: 901–907.

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

IBGE 2008. <<http://www.ibge.gov.br/cidades>>. Acesso em: março/2008.

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

Ariën KK, Abraha A, Quiñones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, Arts EJ 2005. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 79:8979–8990.

¹-Referências Bibliográficas de acordo com as normas da revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Barin F, M'Boup S, Denis F, Kanki P, Allan JS, Lee TH, Essex M 1985. Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 2 : 1387-1389.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220 : 868-871.

Barre-Sinoussi F 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348 (9019):31-35.

Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LF, Caseiro M, Chequer PJ, Couto-Fernandez JC, Ferreira PC, Galvao-Castro B, Greco D, Guimaraes ML, Linhares de Carvalho MI, Morgado MG, Oliveira CA, Osmanov S, Ramos CA, Rossini M, Sabino E, Tanuri A, Ueda M 2000. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 184-193.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12(12):1365-1371.

Brígido LF, Franco HM, Custódio RM, Oliveira CA, P Ferreira JL, Eira M, Bergel F, Araújo F, Carvalheiro JR, Rodrigues R 2005. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21(7):673-682.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A, Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-1069.

Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2000. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 207-217.

Busch MP, Operskalski EA, Mosley JW, Lee TH, Henrard D, Herman S, Sachs DH, Harris M, Huang W, Stram DO 1996. Factors influencing human immunodeficiency virus type 1 transmission by blood transfusion. Transfusion Safety Study Group. *J Infect Dis* 174: 26–33.

Busch MP, Satten GA 1997. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am J Med* 102(5B):117-126.

Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EFL, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, Dietze R, Morgado MG, Ribeiro-Rodrigues R 2006. Human immunodeficiency virus

type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswald Cruz* 101(8): 881-885.

Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, de Sá CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A 2001. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F e A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients falling HAART. *Virology* 275: 107-115.

Carr JK, Salminen MO, Albert J, Sanders-Buell E, Gotte D, Birx DL, McCutchan FE 1998. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* 247:22–31.

Carr JK, Torimiro JN, Wolfe ND, Eitel MN, Kim B, Sanders-Buell E, Jagodzinski LL, Gotte D, Burke DS, Birx DL, McCutchan FE 2001a. The AG recombinant IbNG and novel strains of group M HIV-1 are common in Cameroon. *Virology* 286:168–181.

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

Carrion G, Eyzaguirre L, Montano SM, Laguna-Torres V, Serra M, Aguayo N, Avila MM, Ruchansky D, Pando MA, Vinales J, Perez J, Barboza A, Chauca G, Romero A, Galeano A, Blair PJ, Weissenbacher M, Birx DL, Sanchez JL, Olson JG, Carr JK

2004. Documentation of subtype C HIV Type 1 strains in Argentina, Paraguay, and Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(9):1022-5.

Cavalcanti AMS, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S 2007. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(7):785-792.

Centers for Disease Control and Prevention 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men—New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 30:305–8.

Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR 2004. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 877-882.

Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214:219-235.

Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, Galvão-Castro B 1999. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22: 288-289.

Couto-Fernandez JC, Morgado MG, Bongertz V, Tanuri A, Andrade T, Brites C, Galvao-Castro B 1999. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22: 288-293.

Couto-Fernandez JC, Silva WAE, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG 2006. Phylogenetic Analysis of Brazilian HIV Type 1 Subtype D Strains: Tracing the Origin of this Subtype in Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses* 22 (2): 207-211.

Csillag C 1994. HIV-1 subtype C in Brazil. *Lancet* 344: 1354.

Cuevas MT, Ruibal I, Villahermosa ML, Díaz H, Delgado E, Parga EV, Pérez-Alvarez L, de Armas MB, Cuevas L, Medrano L, Noa E, Osmanov S, Nájera R, Thomson MM 2002. High HIV-1 genetic diversity in Cuba. *AIDS* 16:1643–1653.

Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H, Mullins JI 1993. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262:1257-1261.

Dowling WE, Kim B, Mason CJ, Wasunna KM, Alam U, Elson L, Birx DL, Robb ML, McCutchan FE, Carr JK 2002. Forty-one near full-length HIV-1 sequences from Kenya reveal an epidemic of subtype A and A-containing recombinants. *AIDS* 16:1809–1820.

Eshleman SH, Gonzales MJ, Becker-Pergola G, Cunningham SC, Guay LA, Jackson JB, Shafer RW 2002. Identification of Ugandan HIV type 1 variants with unique patterns of recombination in pol involving subtypes A and D. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:507-511.

Esteves A, Parreira R, Venenno T, Franco M, Piedade J, Germano De Sousa J, Canas-Ferreira WF 2002. Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:313–325.

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

Fiebig EW, Wright DJ, Rawal BD, Garrett PE, Schumacher RT, Peddada L, Heldebrant C, Smith R, Conrad A, Kleinman SH, Busch MP 2003. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS* 17:1871–1879.

Fiebig EW, Heldebrant CM, Smith RIF, Conrad AJ, Delwart EL, Busch MP 2005. Intermittent Low-Level Viremia in Very Early Primary HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 39: 133–137.

Frankel AD, Young JAT 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev Biochem* 67: 1-25.

Freed EO 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6):13-33.

Gadelha SR, Shindo N, Cruz JN, Morgado MG, Galvao-Castro B 2003. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 461-463.

Gaines H, von Sydow M, Pehrson PO 1988. Clinical picture of primary HIV infection presenting as a glandular-fever-like illness. *BMJ* 297: 1363–1368.

Galai N, Kalinkovich A, Burstein R, Vlahor D, Bentwich R 1997. African HIV-1 subtype C and rate of progression among Ethiopian immigrants in Israel. *Lancet* 349:180–1.

Galvao-Castro B, Couto-Fernandez JC, Mello MA, Linhares-de-Carvalho MI, Castello Branco LR, Bongertz V, Ferreira PC, Morgado M, Sabino E, Tanuri A 1996. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 335-338.

Gao F, Robertson DL, Carruthers CD, Morrison SG, Jian B, Chen Y, Barre-Sinoussi F, Girard M, Srinivasan A, Abimiku AG, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH 1998. A comprehensive panel of near-full-length clones and reference sequences for non-subtype B isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72:5680–5698.

Gao F, Chen Y, Levy DN, Conway JÁ, Kepler TB, Hui H 2004. Unselected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 genome are mostly nonsynonymous and often deleterious. *J Virol* 78(5):2426-33.

Geretti AM 2006. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis* 19(1):1-7.

Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, Delfraissy F, Meyer L 2007. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology* 4:6574.

Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 179: 859–870.

Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227(4683):173-177.

Goodrich DW, Duesberg PH 1990. Retroviral recombination during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2050–2056.

Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG 2008. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 22(3):433-435.

Gürtler LG, Hauser PH, Eberle J, von Brunn A, Knapp S, Zekeng L, Tsague JM, Kaptue L 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Camerron. *J Virol* 68 : 1581-1585.

Gurtler L 1996. Difficulties and strategies of HIV diagnosis. *Lancet* 348 : 176-179.

Hahn BH, Shaw GM, De Codk KM, Sharp PM 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287 : 607-614.

Hazenber MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, Miedema F, Hamann D 2000. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95: 249–255.

Hecht FM, Busch MP, Rawal B, Webb M, Rosenberg E, Swanson M, Chesney M, Anderson J, Levy J, Kahn JO 2002. Use of laboratory tests and clinical symptoms for identification of primary HIV infection. *AIDS* 16: 1119–1129.

Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM 1999. Directly

measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 5:83–89.

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20(16):W13-23.

Heuverswyn FV, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, Loul S, Butel C, Liegeois F, Bienvenue Y, Ngolle EM, Sharp PM, Shaw GM, Delaporte E, Hahn BH, Peeters M 2006. SIV infection in wild gorillas. *Nature* 444:164.

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

Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, Carrillo MG, Russi JC, Vinales J, Alava A, Acosta ME, Gianella A, Andrade R, Sanchez JL, Carrion G, Sanchez JL, Russell K, Robb M, Bix D, McCutchan F, Carr JK 2002. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(18):1339-50.

Ho DD 1995. HIV-1 dynamics *in vivo*. *J Biol Regul Homesot Agents* 9 : 76-77.

Hoelscher M, Kim B, Maboko L, Mhalu F, von Sonnenburg F, Birx DL, McCutchan FE; UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization 2001. High proportion of unrelated HIV-1 intersubtype recombinants in the Mbeya region of southwest Tanzania. *AIDS* 15:1461–1470.

Holland JJ, De La Torre JC, Steinhauer DA 1992. RNA virus populations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 176: 1-20.

Hope TJ 1997. Viral RNA export. *Chem Biol* 4(5): 335-344.

Hu WS, Temin HM 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250:1227–1233.

Huert T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Robson S 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345 : 356-359.

ICTVdB – *The Universal Virus Database*, version 4. 2006 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>> Acesso em: março/2008.

Jost S, Bernard MC, Kaiser L, Yerly S, Hirschel B, Samri A, Autran B, Goh LE, Perrin L 2002. A patient with HIV-1 superinfection. *N Engl J Med* 347: 731–736.

Jung A, Maier R, Vartanian JP, Bocharov G, Jung V, Fischer U, Meese E, Wain-Hobson S, Meyerhans A 2002. Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature* 418: 144.

Kahn JO, Walker BD 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339:33–39.

Kaleebu P, French N, Mahe C, Yirrell D, Watera C, Lyagoba F, Nakiyingi J, Rutebemberwa A, Morgan D, Weber J, Gilks C, Whitworth J 2002. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. *J Infect Dis* 185:1244–1250.

Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharam G. Molecular epidemiology of HIV 2005. *Indian J Med Res* 121: 333-344.

Kanki PJ, Hamel DJ, Sankalé JL, Hsieh C, Thior I, Barin F, Woodcock SA, Guèye-Ndiaye A, Zhang E, Montano M, Siby T, Marlink R, NDoye I, Essex ME, MBoup S 1999. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* 179:68–3.

Kannangai R, Ramalingam S, Castillo RC, Babu PG, John TJ, Sridharan G, Schwartz DH 1999. HIV-2 status in southern India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93: 30-31.

Kaplan AH, Manchester M, Swanstrom R 1994. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. *J Virol* 68(10):6782-6786.

Katz RA, Skalka AM 1994. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:133-137.

Koelsch KK, Smith DM, Little SJ, Ignacio CC, Macaranas TR, Brown AJ, Petropoulos CJ, Richman DD, Wong JK 2003. Clade B HIV-1 superinfection with wildtype virus after primary infection with drug-resistant clade B virus. *AIDS* 17: F11–F16.

Kopko PM, Fernando LP, Bonney EN, Freeman JL, Holland PV 2001. HIV transmissions from a window-period platelet donation. *Am J Clin Pathol* 116:562–566.

Korber B, Muldoon, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288: 1789-1796.

Lanb RA, Pinto LH 1997. Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles? *Virology* 229(1):1-11.

Lane HC, Masur H, Edgar LC, Whalen G, Rook AH, Fauci AS 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 309: 453–458.

Lifson JD, Nowak MA, Goldstein S, Rossio JL, Kinter A, Vasquez G, Wiltrout TA, Brown C, Schneider D, Wahl L, Lloyd AL, Williams J, Elkins WR, Fauci AS, Hirsch VM 1997. The extent of early viral replication is a critical determinant of the natural history of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 71(12):9508–9514.

Lindbäck S, Thorstensson R, Karlsson AC, von Sydow M, Flamholc L, Blaxhult A, Sönnnerborg A, Biberfeld G, Gaines H 2000. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS* 14:2333–2339.

Ling AE, Robbins KE, Brown TM, Dunmire V, Thoe SY, Wong SY, Leo YS, Teo D, Gallarda J, Phelps B, Chamberland ME, Busch MP, Folks TM, Kalish ML 2000. Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with preseroconversion blood components during the infectious window period. *JAMA* 284:210–214.

Lins JBA, Pereira GAS, Albuquerque M, Costa NMX, Stefani MMA. 2005. Molecular screening of HIV-1 genetic diversity among children/adolescents and mothers. *VI Simpósio Brasileiro de Pesquisa em HIV/aids* TL 66 p52.

Little SJ, McLean AR, Spina CA, Richman DD, Havlir DV 1999. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med* 190:841–850.

Locateli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcântara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, Rodrigues R, Grisard EC, Pinto AR 2007. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol* 79(10):1455-1463.

Masqueliera C, Servaisa JY, Rusanganwab E, Romana F, Havugab E, Servaisa J, Tuyizereb S, Omesb C, Karasib JC, Coruteilleb O, Karitad E, Allend S, Schmita JC, Arendt V 2007. A novel 24-base pair deletion in the coding region of CCR5 in an African population. *AIDS* 21:111–122

McCutchan FE, Carr JK, Bajani M, Sanders-Buell E, Harry TO, Stoeckli TC, Robbins KE, Gashau W, Nasidi A, Janssens W, Kalish ML 1999. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. *Virology* 254:226–234.

Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AM, Albuquerque MF 2006. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(8):845-849.

Meloni ST, Kim B, Sankalé JL, Hamel DJ, Tovanabutra S, Mboup S, McCutchan FE, Kanki PJ 2004. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol Nov* 78(22):12438-45.

Ministério da Saúde 2007. *AIDS Boletim Epidemiológico, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS*. Ano IV nº 1 p 4-10.

Montavon C, Toure-Kane C, Nkengasong JN, Vergne L, Hertogs K, Mboup S, Delaporte E, Peeters M 2002. CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29:522–530.

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

Morgado MG, Guimarães ML, Neves Jr I, Costa CI, Santos VGV, Linhares-de-Carvalho MI, Galvão-Castro B, Bongertz V 1996. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 339-342.

Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CBG, Neves Jr I, Costa CI, Santos VGV, Linhares-de-Carvalho MI, Galvão-Castro B, Bongertz V, The Hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group 1998. High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *J AIDS Hum Retroviruses* 18: 488-494.

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

Motomura K, Kusagawa S, Kato K, Nohtomi K, Lwin HH, Tun KM, Thwe M, Oo KY, Lwin S, Kyaw O, Zaw M, Nagai Y, Takebe Y 2000. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1831–1843.

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

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

Neilson JR, John GC, Carr JK, Lewis P, Kreiss JK, Jackson S, Nduati RW, Mbori-Ngacha D, Panteleeff DD, Bodrug S, Giachetti C, Bott MA, Richardson BA, Bwayo J, Ndinya-Achola J, Overbaugh J 1999. Subtypes of human immunodeficiency virus type 1 and disease stage among women in Nairobi, Kenya. *J Virol* 73:4393–4403.

Nguyen KA, Busch MP 2000. Evolving strategies for diagnosing human immunodeficiency virus infection. *Am J Med* 109:595–597.

Nowak MA, Lloyd AL, Vasquez GM, Wiltrout TA, Wahl LM, Bischofberger N, Williams J, Kinter A, Fauci AS, Hirsch VM, Lifson JD 1997. Viral dynamics of primary viremia and antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 71:7518–7525.

ONUSIDA 1999. *O SIDA E A INFECÇÃO POR VÍRUS HIV: Informação para os Funcionários das Nações Unidas e Suas Famílias*. ONUSIDA, Genebra – Suíça.

Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparaza J, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterization 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquired Immune Defic Syndr* 29 : 184-90.

Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G 1988. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 239:295-297.

Ou CY, McDonough SH, Cabanas D, Ryder TB, Harper M, Moore J, Schochetman G 1990. Rapid and quantitative detection of enzymatically amplified HIV-1 DNA using chemiluminescent oligonucleotide probes. *Aids Res Hum Retroviruses* 6:1323-1329.

Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, Luo CC, Kalish ML, Auwanit W, Yamazaki S, Gayle HD, Young NL, Schochetman G 1993. Independent introduction of two

major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet* 341:1171-1174.

Pedroso C, Queiroz ATL, Alcântara LC, Drexler JF, Diaz RS, Wey N, Brites Carlos 2007. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1 infected adults and children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45(7): 251-252.

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

Pereira GAS, Stefani MM, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira EM, Carneiro MA, Martins RM 2006. Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Hepatitis C Virus co Infection and Viral Subtypes at an HIV Testing Center in Brazil. *J Med Virol* 78(6): 719-723.

Peters M, Sharp PM 2000. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 14 (Suppl 3): S129-S140.

Pieniazek D, Janini LM, Ramos A, Tanuri A, Schechter M, Peralta JM, Vicente AC, Pieniazek NK, Schochetman G, Rayfield MA 1995. HIV-1 patients may harbor viruses of different phylogenetic subtypes: implications for the evolution of the HIV/AIDS pandemic. *Emerging Infect Dis* 1:86-88.

Pope M, Haase AT 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 9:847–852.

Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaro R, Suleiman J, Ferreira O 1993. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS* 7:1191–1197.

Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, Meehan MO, Lutalo T, Gray RH 2000. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* 342:921–929.

Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Reviews Genetics* 5: 52-61

Renjifo B, Gilbert P, Chaplin B, Vannberg F, Mwakagile D, Msamanga G, Hunter D, Fawzi W, Essex M 1999. Emerging recombinant human immunodeficiency viruses: uneven representation of the envelope V3 region. *AIDS* 13:1613–1621.

Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242 : 1171-1173.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S,

Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288:55–56.

Robinson HL 2002. New Hope for an AIDS Vaccine. *Nat Reviews Immunology* 2: 239-250.

Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM 2006. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(1):1-13.

Sabino E, Shpaer E, Morgado MG, Kober BT, Diaz RS, Bongertz V, Cavalcante S, Galvão-Castro B, Mullins JI, Mayer A 1994. Identification of a HIV-1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. *J Virol* 68: 6340-6346.

Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, Vandamme AM, Tanuri A, Cassol S, Fitch WM 2005. Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol* 60(5):598-605.

Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722–725.

Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC 2006. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 6(5):368-377.

Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, Silveira J, Sabino EC, Tanuri A, Soares MA 2006. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 20(16):2011-2019

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

Schochetman G, George JR 1994. *AIDS Testing: A Comprehensive Guide to Technical, Medical, Social, Legal, and Management Issues*. 2nd ed. New York, NY: Springer-Verlag NY Inc.

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. *Sistema Nacional de Vigilância em Saúde – Relatório de situação/Tocantins*. 2007; Série C, 3ª edição: 8.

Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. *Sistema Nacional de Vigilância em Saúde – Relatório de situação/Mato Grosso*. 2007; Série C, 3ª edição : 18.

Shrestha S, Strathdee SA, Galai N, Oleksyk T, Fallin MD, Mehta S, Schaid D, Vlahov D, O'Brien SJ, Smith MW 2006. Behavioral Risk Exposure and Host Genetics of Susceptibility to HIV-1 Infection. *J Infect Dis* 193(1):16-26.

Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vézinet F 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med* 4: 1032-1037.

Simon V, Ho DD, Karim QA 2006. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *The Lancet* 368 (5):489-504

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

Soares EA, Martínez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA 2005. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 19 Suppl 4:S81-86.

Soriano V, Gomes P, Heneine W, Holguín A, Doruana M, Antunes R, Mansinho K, Switzer WM, Araujo C, Shanmugam V, Lourenço H, González-Lahoz J, Antunes F 2000. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol* 61 : 111-116.

Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 51 : 229-40.

Stefani MM, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvão-Castro B 2000. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 205-07.

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, Maya NC, Mussi AH 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 39(3):205-209.

Stuhlmann H, Berg P 1992. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J Virol* 66 : 2378–2388.

Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K 2004. Molecular epidemiology of HIV: tracking AIDS pandemic. *Pediatr Int* 46: 236-44.

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

Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance fo vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2: 461-71.

UNAIDS/WHO 1997a. Implications of HIV variability for transmission: scientific and policy issues. Expert Group of the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. *AIDS* 11: 1-15.

UNAIDS/WHO 1997b. HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. Workshop report from the European Commission (DG XII, INCO-DC) and the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. *AIDS* 11: 17-36.

UNAIDS/WHO. *AIDS epidemic update December 2007*. Disponível em: <<http://www.unaids.org>> Acesso em 01 de dez. de 2007.

Vaishnav YN, Wong-Staal F 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* 60:577-630.

Valdez H, Lederman MM 1997. Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS Clin Rev* 1998:187–228.

Vanden Haesevelde MM, Peeters M, Jannes G, Janssens W, van der Groen G, Sharp PM, Saman E 1996. Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured dhimpanazee. *Virology* 221: 346-350.

Véras NM, Véras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM, Martins CR 2007. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(12):1481-1490.

Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, Hu D, Rayfield MA, Bretas G, Tanuri A 2000. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 327-331.

Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E 2000. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 74:10498–10507.

Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M 2006. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *AIDS Res Hum Retrov* 22(2): 182-187.

Wainberg MA 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* 18 (suppl 3): S63-S68.

Weniger BG, Takebe Y, Ou CY, Yamazaki S 1994. The molecular epidemiology of HIV in Asia. *AIDS* 8 (suppl. 2): S13-S18.

Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393(6686):705-711.

Yamaguchi J, Bodelle P, Kaptué L, Zekeng L, Gürtler LG, Devare SG, Brennan CA 2003. Near full-length genomes of 15 HIV type 1 group O isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 979-88.

Yang R, Xia X, Kusagawa S, Zhang C, Ben K, Takebe Y 2002. On-going generation of multiple forms of HIV-1 intersubtype recombinants in the Yunnan Province of China. *AIDS* 16:1401–1407.

Yirrell DL, Kaleebu P, Morgan D, Watera C, Magambo B, Lyagoba F, Whitworth J 2002. Inter- and intra-genic intersubtype HIV-1 recombination in rural and semi-urban Uganda. *AIDS* 16:279–286.

Zhang L, He T, Huang Y, Chen Z, Guo Y, Wu S, Kunstman KJ, Brown RC, Phair JP, Neumann AU, Ho DD, Wolinsky SM 1998. Chemokine coreceptor usage by

diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72: 9301–9312.

Zhuang J, Jetzt AE, Sun G, Yu H, Klarmann G, Ron Y, Preston BD, Dougherty JP 2002. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. *J Virol* 76: 11273–11282.

9. ANEXOS

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA,
PARASITOLOGIA E PATOLOGIA**



Rua 235 s/n Setor Universitário CEP 74605050

Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase - Laboratórios n° 326, 327 e 335.

Telefones: (62) 32096111 32096106

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar como voluntário em uma investigação sobre infecção pelo HIV/AIDS. Você será informado sobre todas as etapas da investigação. Caso você aceite participar da investigação, assine ao final deste documento. Caso não queira participar, você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo no seu tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento.

Informações sobre a Pesquisa

Título do Projeto: **CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO HIV-1 NO BRASIL**

Responsável: Dra Mariane Martins de Araújo Stefani – Instituto de Patologia Tropical e Saúde

Pública / Universidade Federal de Goiás

Descrição da Pesquisa

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é responsável pela aids e pode ser transmitido pelo sangue pela relação sexual e de mãe para filho durante a gravidez e amamentação. O HIV-1 apresenta diversas variantes genéticas que podem influenciar nos testes para o diagnóstico sorológico e nos testes de carga viral. Além disso, o conhecimento destas variantes é muito importante para o desenvolvimento de vacinas anti-HIV.

Procedimento da Pesquisa

Se você concordar em participar desse estudo, nós iremos fazer perguntas sobre fatores que podem levar a maior risco para infecção pelo HIV e coletar uma única amostra de sangue que apresenta um risco mínimo à saúde.

Tudo o que soubermos sobre você através do estudo (resultados de exames, entrevista) será confidencial. A sua identidade jamais será revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado de nenhuma maneira.

Os resultados sobre o tipo de HIV-1 que causou sua infecção serão repassados ao laboratório onde você faz seus exames de carga viral e contagem de CD4 ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento. Se você tem alguma dúvida relacionada ao estudo neste momento ou durante a investigação, você poderá contactar o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Imunologia da AIDS, Prof Dra Mariane Martins de Araújo telefone 0XX62 3209 6111 que estará disponível para esclarecer suas dúvidas.

Participação

A sua participação é voluntária, você pode recusar e retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo na realização dos exames de rotina de acompanhamento ou no tratamento da infecção pelo HIV.

A sua participação voluntária não irá além da coleta de sangue e entrevista, não havendo, portanto, nenhum tipo de risco à sua saúde e integridade física, não cabendo, pois, qualquer tipo de indenização por danos, pois estes não existem.

Confidencialidade

Todos os dados da pesquisa serão confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos. Nenhum nome ou resultado individual será divulgado, permanecendo em sigilo. O paciente terá acesso aos resultados a qualquer tempo.

Consentimento

Eu, _____,
RG/CPF nº. _____ concordo em participar deste estudo. Certifico que fui informado sobre o estudo, estou ciente que minha participação é voluntária, que responderei a um questionário e serei submetido a uma única coleta de sangue. Sei que posso desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem ter nenhum tipo de prejuízo no meu tratamento/assistência ou acompanhamento. Concordo, inclusive, com a possível publicação dos resultados dessa pesquisa em forma de resumos e/ou artigos científicos em revistas, pois sei que os pacientes serão identificados por códigos. Informo que aceito participar/ou que o menor de 18 anos sob minha responsabilidade participe da investigação.

Assinatura do participante ou responsável pelo menor

Assinatura do entrevistador

Data: ____/____/____

Assinatura do Pesquisador

Testemunhas não vinculadas as equipe de pesquisadores:

Assistimos a informação sobre o estudo, solicitação do consentimento e o aceite do voluntário em participar

Nome _____ Assinatura _____

Nome _____ Assinatura _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
 INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
 DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA,
 PARASITOLOGIA E PATOLOGIA



Rua 235 s/n Setor Universitário CEP 74605050
 Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase - Laboratórios n° 326, 327 e 335.
 Telefones: (62) 32096111 32096106

QUESTIONÁRIO SOBRE FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HIV

Nome do paciente:..... N° REG:.....

End:.....

.....

Telefone:..... Outro contato:.....

Idade:..... anos Sexo: () F () M Profissão:.....

Escolaridade:.....

Ano e Local de diagnóstico pela infecção pelo HIV:.....

Local de residência nos últimos dez anos:.....

Tipo de exposição: () parceiro sexual contaminado/aids
 () usuário de drogas injetáveis
 () transfusão de sangue
 () outro () homossexual () bissexual

SÓ PARA MULHERES

Tem filhos? () Não () Sim Quantos?..... Qual tipo de parto?.....

Teve aborto? () Não () Sim Quantos?..... () Antes ou () Após 3 meses de
 gravidez

Tem algum filho com HIV/aids? () Não () Sim Quantos?.....Qual idade?.....

SÓ PARA CRIANÇAS:

Tipo de exposição: () mãe com aids () pai com aids
() transfusão sanguínea () hemofilia

FAZ TRATAMENTO PARA A AIDS? () Não () Sim

Qual?.....

Último resultado da carga viral:.....

Último resultado da contagem CD4/CD8:.....

Observações:.....

.....
.....
.....
.....
.....

Assinatura do Responsável pelo Questionário

Data/...../.....