



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HIV-1 EM
DOADORES DE SANGUE SOROPOSITIVOS DA FUNDAÇÃO
DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DOAMAZONAS**

LUANA KAREN HOLANDA DA CUNHA

**MANAUS
2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTIINSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

LUANA KAREN HOLANDA DA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HIV-1 EM
DOADORES DE SANGUE SOROPOSITIVOS DA FUNDAÇÃO
DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DOAMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: biotecnologias para saúde.

Orientadora: Prof^ª Dra. Adriana Malheiro

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Simone Kashima Haddad

**MANAUS
2007**

LUANA KAREN HOLANDA DA CUNHA

**CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS DO HIV-1 EM
DOADORES DE SANGUE SOROPOSITIVOS DA FUNDAÇÃO
DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: biotecnologias para saúde.

Apresentada em 16 de novembro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Adriana Malheiro

Prof.^o Dr. José Alexandre Lemos

Prof.^a Dra. Antônia Maria Ramos Franco

*A Deus. Fonte de força para enfrentar
os desafios e alcançar todas as
minhas conquistas.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela constante presença em minha vida.

Aos meus pais Edilene Holanda da Cunha e Valmir Mendes da Cunha pelo esforço que dedicaram a minha formação pessoal e profissional, sempre me incentivando ao caminho dos estudos.

Aos meus irmãos Marcos Paulo, Paulo Roberto e Valmir Junior, que sempre compartilharam comigo momentos de dificuldades e alegrias.

A minha cunhada Lidiane Laborda pela amizade dedicada a mim e a nossa família, e por estar sempre disposta a nos ajudar nos momentos em que precisamos.

A Dra. Adriana Malheiro agradeço pelo apoio, confiança, paciência e aprendizado transmitido durante a orientação deste trabalho

A Dra. Kátia Torres pelo incentivo e apoio para a concretização deste estudo.

A Dra. Simone Kashima pela valiosa co-orientação. Agradeço pela atenção e por tornar possível a realização dos testes moleculares no laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, no qual me recebeu da melhor forma possível.

Aos amigos e colegas do grupo de pesquisa do HEMOAM: Aldenize Cabral, Christiane Usui, Débora Galvão, Fabrícia Celani, Fátia Braga, Joseane Neves, João Paulo, Haryana Rombaldi, Igor Silva, Iza Régia, Laura Patrícia e Rosilane Pacheco. Agradecimentos especiais a Daniel Barros e Tatiane Amabile pela grande amizade e ajuda.

Aos estatísticos do HEMOAM Edson Lira e Felicien Vásquez pelas contribuições nas análises dos resultados.

Aos médicos, técnicos, funcionários, e todos os profissionais envolvidos no processo de captação de doadores de sangue no HEMOAM.

Aos candidatos a doadores de sangue que aceitaram participar e contribuir para a realização desta pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto: Aline Ferreira, Evandra Strazza, Fernanda Bernadelli, Gislane Vilela, Júlio Edward, Larissa Deadame, Rochele Azevedo, Tathiane Maltha. Agradeço por sempre estarem dispostos a colaborar e pela amizade e carinho com que me receberam no laboratório. Agradecimentos especiais a Maria Fernanda e Rodrigo Haddad pela amizade e fundamental ajuda nas análises filogenéticas.

Agradeço também aos demais pesquisadores e funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas Cláudia Topan, Gisele Fernandes, Luciana Evelyn, Marluce Abrantes, Ramilla Alencar, Ronnezza Campos e Valéria Fonseca. Compartilho essa conquista com vocês que sempre me incentivaram, torceram e acreditaram em mim.

Aos meus amigos e colegas de turma do mestrado Cynthia Ferreira, Hugo Valério, Juliana Sarmento e Michele Silva. Agradeço pelos difíceis e bons momentos juntos nesta etapa tão importante para todos nós.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Alacid Santos, Daniela Koshikene, Delson Júnior, Marcelo Neves e Maryellen Iannuzzi. Agradeço pela amizade, apoio e compreensão.

A Universidade Federal do Amazonas e ao Programa de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia.

A Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

Ao Centro Regional de Hemoterapia do HCFMRP-USP.

As instituições FAPEAM e CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é caracterizado por uma ampla diversidade genética. Dois tipos de HIV são reconhecidos atualmente: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1, responsável pela maioria dos casos de aids no mundo, é dividido em três grupos denominados M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*Non-M/Non-O*). Para o grupo M, nove subtipos foram identificados até o momento: A-D, F-H, J, K. Além desses subtipos, o HIV-1 também tem sido classificado em formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs). No Brasil, um complexo padrão de distribuição desses subtipos tem sido descrito em suas diferentes regiões geográficas. Buscando esclarecer a distribuição dos subtipos de HIV-1 predominantes na cidade de Manaus, este estudo teve como objetivo analisar amostras de sangue de indivíduos candidatos a doadores de sangue que apresentaram resultados positivo ou indeterminado para HIV-1, na triagem sistemática para doação de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Na ocasião da coleta, os doadores registraram a sua autorização através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e responderam a um questionário utilizado para investigação de dados epidemiológicos. O DNA proviral extraído das amostras com resultados indeterminado/positivo no *Western Blot* foi submetido a uma Reação em Cadeia da Polimerase em duas etapas (*Nested PCR*) para a confirmação da infecção pelo HIV-1. Os produtos amplificados (regiões *gag*, *pol* e *env*) das 31 amostras reativas por PCR foram seqüenciados e analisados por métodos filogenéticos usando o programa *Phylip*. Todas as amostras indeterminadas para o teste confirmatório apresentaram padrão de amplificação negativo. Das amostras reativas para HIV-I no teste confirmatório e PCR, observou-se predominância do sexo masculino (77,4%) e de doadores de primeira vez (67,7%). Entre os doadores de repetição, 60 % apresentaram soroconversão em até 20 meses. Do total de amostras, identificou-se a predominância do subtipo B (87,1%), seguida do subtipo C (6,5%), F (3,2%) e recombinante BF (3,2%). As seqüências de aminoácidos de 19 isolados foram analisadas para a caracterização da variabilidade genética da região da alça V3. Dentre os isolados do subtipo B, o tetrapeptídeo mais prevalente foi o GPGR (68,4%), seguido pelo variante brasileiro B' GWGR (15,8%). A ocorrência do Subtipo C na região Norte, ainda não foi relatada na literatura. As análises de similaridade dos isolados do subtipo C nesse estudo demonstraram maior semelhança destes com outros isolados brasileiros, em relação a isolados de outras partes do mundo. Nossos resultados contribuem para uma melhor compreensão das características dos isolados do HIV-1 circulantes no Brasil, informações que poderão ser utilizados em benefício do diagnóstico, tratamento, controle da doença e preparação de vacinas.

Palavras chave: HIV-1, Subtipos, PCR, Genotipagem

ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is characterized by a wide genetic diversity. Two types of HIV are recognized at present: HIV-1 and HIV-2. The HIV-1, responsible for most of the cases of AIDS in the world, is divided in three groups denominated M (Major), O (Outlier) and N (Non-M/Non-O), and until this moment nine subtypes of the group M (A-D, F-H, J-K) were already identified. Beyond of those subtypes, the HIV-1 also have been classified in circulating recombinant forms (CRFs) and unique recombinant forms (URFs). In Brazil, a pattern complex of distribution of those subtypes has been described in their different geographical areas. In search of elucidating the predominant subtypes of HIV-1 in the city of Manaus, this study had as objective to analyze blood samples of subjects that presented results positive or indeterminate for HIV, in the systematic selection of blood donors of the Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). In the moment of the collect, the donors registered their authorization by the signature of the free consent and knowledge term and they answered a questionnaire used for epidemic data investigation. DNA proviral extracted of the samples with indeterminate/positive resulted in Western Blot was submitted a Polimerase Chain Reaction in two stages (Nested PCR) for the confirmation of the HIV-I infection. The amplified products (regions *gag*, *pol* and *env*) of the 31 samples reactivate for PCR were automatically sequencing and analyzed phylogenetically by the Phylip program. All of the indeterminate samples for the confirmatory test presented negative amplification pattern. Of the reactivates samples for HIV in the confirmatory test and PCR, it was observed male predominance (77,4%) and in the donors of first time (67,7%). Among the repetition donors, 60% presented seroconversion in up to 20 months. Of the total of samples, was identified the predominance of the subtype B (87,1%), following by the subtype C (6,5%), F (3,2%) and recombinant BF (3,2%). The amino acids sequences of 19 isolated were analyzed for the genetic variability characterization of the region of the loop V3. Among the isolated of the subtype B, the tetrapeptide more prevalente was GPGR (68,4%), following by the Brazilian variant B" GWGR (15,8%). The Subtype C occurrence in the North Region still was not reported in the literature. The analyses of similarity of the isolated of the subtype C in this study demonstrated larger similarity of these with other isolated ones brazilian, in relation to isolated in other parts of the world. Our results can contribute to a better understanding of the characteristics of the lineages of the HIV-1 circulating in Brazil, information that can be used in benefit of the diagnosis, treatment, control of the disease and preparation of vaccines.

Key words: HIV-1, Subtypes, PCR, Genotyping

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da partícula do HIV-1	20
Figura 2	Estrutura genômica do HIV-1.....	21
Figura 3	Distribuição do número de pessoas infectadas pelo HIV no mundo	23
Figura 4	Filogenia do grupo M, baseada nas regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>	25
Figura 5	Fluxograma demonstrativo das etapas envolvidas no desenvolvimento do projeto	34
Figura 6	Análise dos fragmentos amplificados da região <i>env</i> em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo	49
Figura 7	Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, evidenciando um fragmento de 310 bp resultante da amplificação da região do gene da β -globina	50
Figura 8	Análise dos fragmentos amplificados da região <i>gag</i> (a), <i>pol</i> (b) e <i>env</i> (c) em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo	51
Figura 9	Análise filogenética da região <i>gag</i> de 26 isolados do HIV-1, com seqüências protótipos obtidos da literatura	54
Figura 10	Análise filogenética da região <i>pol</i> de 23 isolados do HIV-1, com seqüências protótipos obtidos da literatura	55
Figura 11	Análise filogenética da região <i>env</i> de 28 isolados do HIV-1, com seqüências protótipos obtidos da literatura	56
Figura 12	Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região da alça V3 obtidas com, protótipos do subtipo B	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Frequências dos subtipos virais encontrados para cada região analisada.....	57
Gráfico 2	Análise por <i>Bootscanning</i> das seqüências de nucleotídeos da região <i>pol</i> e <i>env</i> (isolado AM90)	60
Gráfico 3	Análise por <i>Bootscanning</i> das seqüências de nucleotídeos das regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i> (isolado AM107)	61
Gráfico 4	Análise por <i>Bootscanning</i> das seqüências de nucleotídeos das regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i> (isolado AM47)	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos iniciadores para a amplificação das regiões gênicas em estudo.....	37
Tabela 2	Sistema das reações de PCR para a região <i>gag</i>	39
Tabela 3	Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para <i>gag</i> ..	39
Tabela 4	Sistema das reações de PCR para a região <i>pol</i>	39
Tabela 5	Condições de ciclagem das reações de PCR para <i>pol</i>	40
Tabela 6	Sistema das reações de PCR para a região <i>env</i>	40
Tabela 7	Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para <i>env</i> ...	40
Tabela 8	Isolados de HIV-1 utilizados na análise filogenética para as regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>	44
Tabela 9	Formas recombinantes utilizadas na análise filogenética para as regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>	45
Tabela 10	Distribuição das 31 amostras de candidatos a doadores reativos para HIV-1 de acordo com os dados demográficos e epidemiológicos.....	47
Tabela 11	Distribuição da media de idade dos indivíduos reativos para HIV-1 de acordo com o sexo	47
Tabela 12	Distribuição das amostras de doadores de repetição reativos para HIV-1 em relação ao tempo de soroconversão em meses.....	48
Tabela 13	Perfil de bandas detectadas pelo <i>Western Blot</i> para cada região, das 52 amostras com resultados indeterminado e reativo para o confirmatório.	49
Tabela 14	Resultados das amplificações por <i>nested</i> PCR para o controle endógeno (β -globina), regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>	52
Tabela 15	Resultados do seqüenciamento por região gênica.....	58
Tabela 16	Comparação das seqüências de nucleotídeos dos isolados AM090 e AM107 com isolados do sul do país (DQ70, DQ66, DQ63, DQ61, DQ57 E DQ56) e de diferentes origens geográficas (CBR92, CET86, CIN95 e CZA04).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AM	Amazonas
ARV	AIDS-associated retrovirus
B	Branco da reação
bDNA	Branched DNA (DNA Ramificado)
Bp	Pares de base
BSA	Bovine Serum Albumin (Soro de albumina bovina)
C+	Controle positivo
cDNA	Complementary desoxirribonucleic acid (DNA complementar)
CRFs	Circulating recombinant forms (Formas Recombinantes Circulantes)
DNA	Desoxirribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
DP	Desvio Padrão
DST	Doenças Sexualmente Transmissíveis
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoenzimático indireto)
EUA	Estados Unidos da América
°C	Graus Celsius
HEMOAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Vírus da imunodeficiência humana)
HMA	Heteroduplex mobility assay (Ensaio de mobilidade do heteroduplex)
H₂O	Água
HTLVIII	Human T-cell lymphotropic vírus (Vírus T-linfotrópicos humanos tipo III)
ICTV	International Committee Viral Taxonomy
IN	Integrase
Kb	Kilo base

LAV	Lymphadenopathy-associated virus (Vírus associado à linfadenopatia)
LTRs	Long terminal repeats (Longas Sequências Terminais Repetitivas)
M	Marcador
ML	Maximum Likelihood
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mM	Milimolar
min.	Minuto
nm	Nanômetro
NASBA	Nucleic Acid Sequence Based Amplification (Amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos)
NAT	Nucleic Acid-amplification Testing (Amplificação de ácidos nucleicos)
Nº	Número
NJ	Neighbour Joining
OMS	Organização Mundial de Saúde
pmoles	Picomoles
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PPT	Plasma Preparation Tube
PR	Protease Viral
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
RT	Reverse Transcriptase (Transcriptase reversa)
s	Segundos
SU	Proteína externa da superfície
Taq DNA pol	Thermus aquaticus DNA Polymerase
TM	Proteína transmembrana
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (Nações Unidas sobre HIV/Aids)
URFs	Unique recombinant forms (Formas Recombinantes Únicas)
WB	Western Bolt
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 Geral	18
2.2 Específicos	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 Classificação e Morfologia do HIV	19
3.2 Organização genômica do HIV	20
3.3 Epidemiologia do HIV	22
3.4 Variabilidade genética e distribuição geográfica do HIV	24
3.5 Diagnóstico Laboratorial da infecção causada pelo HIV	27
3.6 Determinação dos genótipos do HIV	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Casuística	32
4.2 Abordagem dos pacientes e coleta do material biológico	32
4.3 Isolamento das células para a extração de ácidos nucleicos	33
4.4 Análise das amostras	33
4.4.1 Testes sorológicos	34
4.4.2 Extração do DNA proviral	35
4.4.3 Quantificação do DNA	36
4.4.4 Amplificação por <i>nested</i> PCR.....	37
4.4.4.1 Sistema da reação da PCR para controle da qualidade do DNA	38
4.4.4.2 Sistema de reação da PCR para as regiões <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>	38
4.4.5 Eletroforese em gel de agarose	41
4.4.6 Sequenciamento automático de DNA	41
4.4.6.1 Purificação do Produto de PCR	41
4.4.6.2 Reação de sequenciamento	42
4.4.7 Análises Filogenéticas	43
4.4.7.1 Alinhamento das seqüências de nucleotídeos	43
4.4.7.2 Construção das árvores filogenéticas	43
4.5 Análises dos Dados	45
5. RESULTADOS	46
5.1 Caracterização das Amostras	46

5.2 Soroprevalência da Infecção pelo HIV-1 entre doadores de sangue no HEMOAM	48
5.3 Western Blot para HIV-1	48
5.4 PCR para HIV-1 - Regiões para regiões gag, pol e env	49
5.5 Sequenciamento das regiões gag, pol e env	53
5.6 Análise Filogenética - regiões gag, pol e env	53
5.7 Caracterização da variabilidade genética da região de alça V3 dos isolados pertencentes ao subtipo B	59
5.8 Análise dos isolados pertencentes ao subtipo C	60
5.9 Análise do recombinante B/F	62
6. DISCUSSÃO	64
7. CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICE A	81
APÊNDICE B	82

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida foi identificada em 1981, nos Estados Unidos, a partir da observação dos primeiros casos de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* e Sarcoma de Kaposi entre pacientes homossexuais masculinos, previamente saudáveis (GOTLIEB et al., 1981). O agente etiológico da aids, o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), foi descrito em 1983, com a publicação de um artigo citando o isolamento de um novo retrovírus a partir de um linfonodo de um paciente homossexual com múltiplas linfadenopatias (BARRE-SINOUSSE et al., 1983). Nesse momento, o vírus foi classificado como HTLVIII.

Ainda em 1983, pesquisadores franceses isolaram um novo retrovírus, identificado como LAV (*lymphadenopathy-associated vírus*). Em 1984, um retrovírus denominado ARV (*AIDS-associated retrovírus*) foi identificado por um grupo de pesquisadores de São Francisco. A análise das seqüências desses vírus, em 1985, demonstrou que eles pertenciam à mesma família de retrovírus e que eram muito similares. Em 1986 os três vírus (HTLVIII, LAV e ARV) foram renomeados pelo International Committee of Viral Taxonomy (ICTV), passando a ser denominados *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (COFFIN et al., 1986).

A identificação da aids e do HIV e suas marcantes conseqüências produziram grande impacto na sociedade atual. O conhecimento que o HIV pode ser transmitido por transfusão sanguínea contribuiu decisivamente para mudanças na hemoterapia, procedendo-se a revisão completa dos critérios e das indicações para o uso racional de sangue e de hemocomponentes (APRILI et al., 2003). O risco de transmissão do HIV por transfusão tem sido reduzido com a introdução de testes moleculares baseados na detecção de ácidos nucleicos e que, portanto,

não dependem da formação de anticorpos necessária nos testes sorológicos.

O HIV é um patógeno de grande variabilidade genética, sendo dividido em tipos e subtipos amplamente distribuídos pelo mundo. O conhecimento sobre a epidemiologia molecular do HIV pode auxiliar no melhor entendimento da relação entre a variabilidade do vírus e suas propriedades principais como: patogenicidade, antigenicidade, transmissibilidade e disseminação, ou mesmo fornecer dados importantes que poderão ser utilizados em benefício do diagnóstico, tratamento, controle da doença e preparação de vacinas (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005). Uma vez caracterizados os genótipos do HIV, torna-se mais fácil o estudo de viabilidade medicamentosa em pacientes infectados, já que é conhecido da literatura que indivíduos infectados com HIV podem responder de forma diferente ao tratamento com drogas anti-retrovirais de acordo com o genótipo viral.

Considerando-se a ausência de estudos sobre epidemiologia molecular do HIV na região Norte, assim como a importância do monitoramento da distribuição e da dinâmica dos diferentes subtipos de HIV, estudos conduzidos no Amazonas podem auxiliar na minimização das disparidades regionais sobre o conhecimento da variabilidade genética do HIV-1, assim como no esclarecimento dos subtipos predominantes na região.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar a prevalência e a distribuição dos subtipos do HIV-1 na população de candidatos a doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), na cidade de Manaus.

2.2 Específicos

- 2.2.1 Determinar a soroprevalência para o HIV-1 na população de candidatos a doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM);
- 2.2.2 Analisar por técnicas de biologia molecular a presença dos genes estruturais do HIV-1 em amostras de doadores de sangue com resultados positivo ou indeterminado pelo teste *Western Blot*;
- 2.2.3 Avaliar a distribuição dos subtipos do HIV-1 por métodos filogenéticos nas amostras de doadores de sangue PCR positivas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Classificação e Morfologia do HIV

O HIV pertence ao gênero *Lentivírus* e a família *Retroviridae*, que compreende os vírus que utilizam a enzima transcriptase reversa para a transcrição do RNA em DNA. Os retrovírus do gênero *Lentivírus*, do latim *lentus* (lentos), receberam essa denominação devido ao curso gradual da doença que causam (DIMMOCK; PRIMROSE, 1994; JANEWAY et al., 2002), podendo persistir e replicar-se por muitos anos antes de causar os sinais clínicos da doença. Esses vírus atacam o sistema imunológico do organismo, levando à depressão da imunidade e conseqüente aparecimento de infecções oportunistas.

Com base em dados da seqüência do genoma viral, estudos demonstram a existência de dois tipos de HIV reconhecidos atualmente: o HIV-1 e o HIV-2. Cada um dos dois tipos divide-se em diferentes subtipos que se distinguem por suas organizações genômicas e relações filogenéticas. O HIV-1, responsável pela maioria das infecções, é dividido em três grandes grupos denominados M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*Non-M/Non-O*) (KANDATHIL et al., 2005).

A morfologia estrutural do HIV é comum à dos demais retrovírus. As partículas virais, denominadas vírions, possuem formato esférico com aproximadamente 110 nm de diâmetro. Os vírions apresentam uma membrana lipídica de camada dupla (envelope), circulando uma matriz protéica (p17) e o nucleocapsídeo viral (FERREIRA; ÁVILA, 1996) (Figura 1).

O envelope contém aproximadamente 72 projeções contendo trímeros ou tetrâmeros de glicoproteínas. A gp120 ou proteína externa da superfície (SU) prende-se ao vírus através de interações com a gp41 ou proteína transmembrana (TM) (TURNER; SUMMERS, 1999),

ambas derivadas do precursor gp160. Cada nucleocapsídeo contém duas cópias de um genoma RNA de fita simples, que é transcrito em DNA na célula infectada e integrado ao genoma da célula hospedeira. Os nucleocapsídeos também contêm proteínas de membrana (p24) e as enzimas virais transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e protease viral (PR) (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

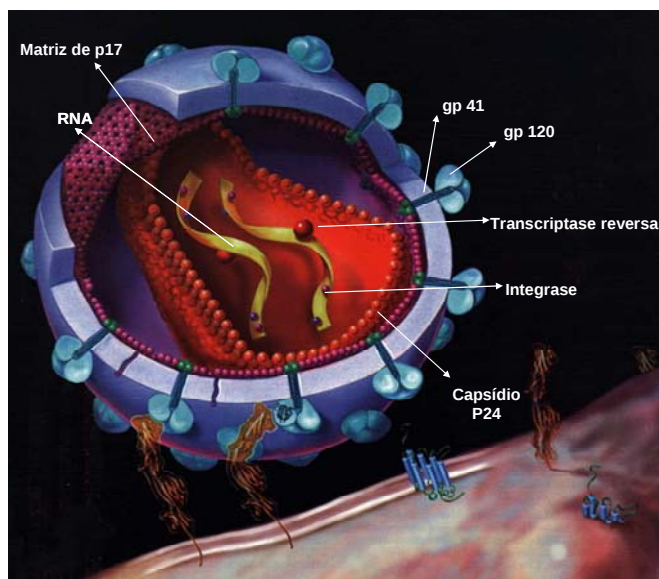


Figura 1. Estrutura da partícula do HIV-1.
Fonte: ABBAS et al., 2005.

3.2 Organização Genômica do HIV

O HIV é caracterizado por um alto grau de variabilidade genética que resulta da alta taxa de erro da transcriptase reversa e ocorrência de eventos de recombinação, juntamente com uma alta taxa de replicação viral no hospedeiro.

O genoma completo do HIV tem aproximadamente 9,8 Kb e consiste em nove genes flanqueados por longas seqüências terminais repetitivas (LTRs) (Figura 2). Os polipeptídeos precursores das proteínas do vírion são codificados pelas três regiões principais do genoma viral: os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, encontrados em todos os retrovírus.

A organização geral do genoma do HIV é também semelhante à dos demais retrovírus, exceto pela maior complexidade devido a um número adicional de genes regulatórios e acessórios (*tat*, *ver*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) cujos produtos regulam a reprodução do vírus de várias maneiras. A diferença genômica entre o HIV-1 e o HIV-2 está na presença do gene *vpx* no HIV-2 (ABBAS et al., 2005; DIMMOCK; PRIMROSE, 1994).



Figura 2. Estrutura genômica do HIV-1.

Fonte: <http://www.aids.harvard.edu/research/discoveries.html>

O gene *gag* é traduzido em uma poliproteína precursora denominada p55Gag que é clivada, pela protease viral, em quatro proteínas menores: a proteína da matriz formada por unidades p17, a proteína do capsídeo formada por unidades p24 e a proteína do nucleocapsídeo formada por unidades p6 e p7.

O gene *pol* codifica uma poliproteína precursora das enzimas virais protease, transcriptase reversa, e integrase. A protease, importante alvo da terapia anti-retroviral, é responsável pela proteólise de Gag e do Gag-Pol, necessária para o ciclo replicativo do vírus. A transcriptase reversa é responsável pela transcrição do RNA em DNA, e a integrase pela integração do cDNA viral no cromossomo celular e, conseqüentemente, pela persistência do vírus na célula.

O gene *env* codifica precursores (gp160) das glicoproteínas do envelope (gp120), com sítios específicos de ligação aos receptores celulares, e glicoproteínas transmembrânicas

(gp41). Estas glicoproteínas possuem papel fundamental nos eventos iniciais da infecção pelo HIV, mediando a ligação do vírus a célula hospedeira e a fusão das membranas viral e celular (FERREIRA; ÁVILA, 1996; JANEWAY et al., 2002).

Na porção externa da glicoproteína do envelope gp120 existe uma região hipervariável denominada alça V3. Essa região possui de 35 a 45 aminoácidos e varia muito entre diferentes linhagens virais. Entretanto, apresenta resíduos de aminoácidos conservados em seu ápice, que compreendem os motivos GPGR ou GPGQ. Vários estudos têm demonstrado a importância biológica da heterogeneidade da alça V3 em diversas funções virais, como na ligação com o receptor CCR5 e CXCR4, e na determinação do tropismo celular (MORGADO et al., 1998 a; MORGADO et al., 2002 b).

3.3 Epidemiologia do HIV

O Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids (UNAIDS) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que 39,5 milhões de pessoas sejam portadores do HIV em todo o mundo. Deste total, 4,3 milhões de pessoas adquiriram o vírus em 2006 e 2,9 milhões de pessoas morreram de aids nesse mesmo ano (UNAIDS/WHO, 2006).



Figura 3: Distribuição do número de pessoas infectadas pelo HIV no mundo.
Fonte: UNAIDS/WHO (2006)

O último Boletim Epidemiológico de aids, publicação do Ministério da Saúde, registrou entre os anos de 1982 a 2006 um total de 433.067 casos de aids no Brasil, totalizando uma taxa de incidência de 18/100.000 habitantes. Somente em 2005 foi registrado um total de 11940 novos casos e 11026 óbitos (BRASIL, 2006).

Segundo dados do Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde, a epidemia tem mostrado uma tendência de estabilização em algumas regiões do país, como é o caso da região Sudeste. Entretanto, o número de casos da doença tem aumentado nas regiões Norte e Centro-Oeste.

No Estado do Amazonas, 3.887 casos de aids foram notificados entre os anos de 1980 a 2006 (BRASIL, 2006). A taxa de incidência de aids para o ano de 2004 foi de 15,7/100 mil habitantes, a segunda maior da região Norte somente menor que a do estado de Roraima. A taxa de mortalidade por aids no estado variou de 1,8/100 mil habitantes, em 1994 a 4,0/100 mil habitantes, em 2004 (BRASIL, 2005). Do total de casos acumulados, 2.616 (88,4%)

pertencem a capital Manaus. Estes dados evidenciam o papel crucial da capital Manaus para o controle e prevenção da epidemia da aids na região Amazônica.

3.4 Variabilidade genética e distribuição geográfica do HIV

Como descrito anteriormente, dois tipos de HIV são reconhecidos atualmente: o HIV-1 e o HIV-2. A grande diversidade do HIV ainda continua aumentando devido aos fenômenos de mutação e recombinação que estão frequentemente levando à emergência de variantes virais divergentes. As formas genéticas virais distintas, relacionadas entre si, são denominadas de quasiespécies. Essa diversidade gera uma resistência natural à ação dos medicamentos e do sistema imune (THOMPSON et al., 2002).

O HIV-1, identificado em 1983, é responsável pela maioria dos casos de AIDS em todo o mundo (KANDATHIL et al., 2005) e é considerado um dos patógenos que apresentam maior variabilidade genética, resultado de sua elevada taxa de mutação. Tal diversidade apresenta muitas implicações em relação à patogenicidade, desenvolvimento de vacinas, diagnóstico e suscetibilidade as drogas anti-retrovirais (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005).

O HIV-2, isolado em 1986, é classificado em oito subtipos (A - H). É predominante no continente africano, mas já foram identificados casos esporádicos de infecção em outros continentes (KANDATHIL et al., 2005; PLANTIER et al., 2004). Os subtipos A e B são os mais circulantes entre a população onde são encontrados, sendo os outros subtipos responsáveis somente por um pequeno número de infecções (KANDATHIL et al., 2005).

O HIV-1 é dividido em três grupos denominados grupo M (*Major*), grupo O (*Outlier*) e grupo N (*Non-M/Non-O*), sendo os dois últimos grupos raramente encontrados (YAGYU et al., 2005). O grupo O é endêmico da República de Camarões e de outros países da África Central. O grupo N, identificado mais recentemente, é restrito a um pequeno número de casos

registrados na República de Camarões.

O grupo M é o mais disseminado pelo mundo, sendo responsável pela maioria dos casos de aids. Até agora já foi possível identificar nove subtipos do grupo M (A-D, F-H, J, K). Em análises filogenéticas baseadas principalmente nas regiões estruturais *gag*, *pol* e *env*, esses subtipos formam grupos equidistantes entre si, sendo os subtipos B e D mais próximos em relação aos outros subtipos (Figura 4). Alguns subtipos são divididos em subsubtipos. O subtipo A é dividido em subsubtipos A1 e A2, e o subtipo F em F1 e F2 (THOMPSON et al., 2002).

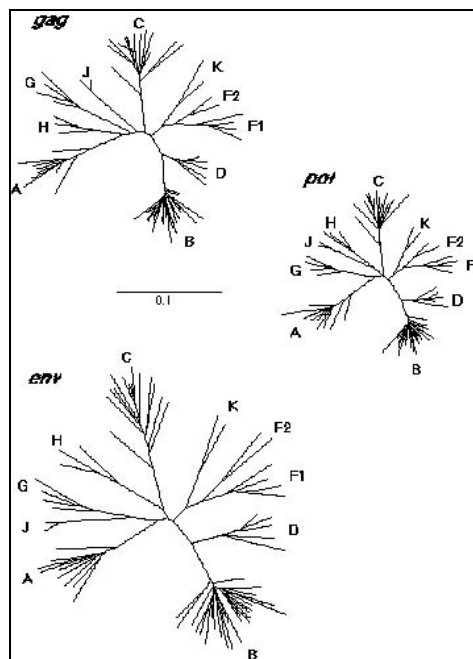


Figura 4: Filogenia do grupo M, baseada nas regiões *gag*, *pol* e *env*.
Fonte: <http://hiv-web.anl.gov/content/hiv-db/REVIEWS>

Além desses subtipos, o HIV-1 também têm sido dividido em muitas formas recombinantes circulantes (CRFs), originadas a partir de recombinações entre diferentes subtipos virais que infectam simultaneamente a mesma célula. Até o momento já foram determinadas 16 CRFs (KANDATHIL et al., 2005). Existem também uma variedade de

formas recombinantes únicas (URFs), identificadas até agora em apenas alguns indivíduos (MCCUTCHAN, 2006).

As formas mais prevalentes no mundo são C, A, B e CRF02_AG. Na África, possível local de origem da epidemia da aids, são encontrados todos os subtipos do grupo M. O subtipo C é atualmente o subtipo mais prevalente do mundo. É responsável pela maioria das infecções em regiões como África do Sul, Israel, Índia e China. Também tem aumentado o número de indivíduos infectados por esse subtipo em outros países, como Brasil e Rússia. O Subtipo A é predominante na porção central e leste da África, e o subtipo B em algumas partes da Ásia, Caribe, América do Norte, Europa, América do Sul e Oceania. O subtipo D já foi encontrado no leste da África e o F é predominante no Brasil e Romênia.

No Brasil o subtipo B é responsável pela maioria dos casos de infecção por HIV-1 em todas as regiões geográficas do país. Entretanto, um grande número de casos de aids causados por outros subtipos do vírus e formas recombinantes tem sido identificado (GADELHA et al., 2003). No Sudeste, vários estudos têm demonstrado a presença de infecção causada pelos subtipos F, C e recombinante BF. Casos limitados dos subtipos F e C foram observados respectivamente no Nordeste e Centro Oeste do país.

Na região Sul, entretanto, o subtipo C é altamente freqüente, sendo relatada proporção semelhante entre os subtipos C e B (MORGADO et al., 2002; SOARES et al., 2003). Mais recentemente, também já foram identificadas algumas infecções causadas pelo subtipo D nas regiões Norte, Nordeste e Sudeste, o que demonstra um complexo padrão de distribuição dos subtipos nas diferentes regiões geográficas do Brasil.

Em estudo conduzido em Manaus, com 31 amostras de indivíduos infectados por HIV-1, foi observada uma proporção similar entre os subtipos B e F (VICENTE et al., 2000). Entretanto, estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV ainda são escassos na região Norte.

Além dos subtipos descritos anteriormente, existe ainda uma variante do subtipo B, identificada como B'', que difere do subtipo tradicional pela presença do variante GWGR no topo do alça V3 da gp120, em substituição ao motivo GPGR presente nos isolados dos Estados Unidos e Europa. No Brasil, tem sido observada alta prevalência do variante B''. Esse variante possui propriedades genéticas e antigênicas distintas, sendo importante a sua caracterização para estudos de desenvolvimentos de vacinas no país (MORGADO et al., 1998 a; MORGADO et al., 2002 b).

3.5 Diagnóstico Laboratorial da infecção causada pelo HIV

O HIV é transmitido por contato sexual direto, sangue ou hemoderivados contaminados, agulhas contaminadas usadas para administração intravenosa de drogas e da mãe infectada para a criança (via intraparto, perinatal ou pelo leite materno).

Desde o conhecimento que o HIV pode ser transmitido por transfusão sanguínea e a introdução em 1985 de testes sorológicos para HIV na triagem de doadores de sangue, a segurança transfusional tem melhorado de maneira drástica (APRILI et al., 2003), tornando-se uma das maiores preocupações em saúde pública.

Nos últimos anos, diversas ações têm sido desenvolvidas para garantir a qualidade das doações de sangue e segurança para o receptor. O avanço das pesquisas tem levado ao aperfeiçoamento dos exames diagnósticos e das técnicas de doação.

O diagnóstico da infecção pelo HIV pode ser realizado por meio de testes que pesquisem anticorpos específicos, antígenos ou que isolem o vírus. Na prática laboratorial, os testes que pesquisam anticorpos, sorológicos, são os mais utilizados. Para tal, adota-se habitualmente um ensaio imunoenzimático denominado *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), primeira ferramenta disponível para a triagem sorológica. As amostras

reagentes a esse teste devem necessariamente ser submetidas a teste sorológico confirmatório para correta elucidação diagnóstica, devido a probabilidade de ocorrência de resultados falso-positivos.

Os testes confirmatórios mais freqüentemente empregados em bancos de sangue são as reações de *Western Blot* (WB), capazes de detectar anticorpos específicos voltados a diferentes proteínas virais (MACHADO; COSTA, 1999). Resultados indeterminados no teste de WB podem ocorrer em uma proporção considerável de amostras. Indivíduos infectados que se encontram em fase avançada da doença podem não apresentar anticorpos reativos para a proteína p24, um dos principais marcadores da infecção por HIV, sugerindo resultados indeterminados. Alguns indivíduos podem apresentar este padrão indeterminado por um longo período de tempo, sem evidências de infecção por HIV (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

Os testes sorológicos de última geração, atualmente disponíveis, são de alta sensibilidade e especificidade (superiores a 99%). Entretanto, em alguns casos, esses testes não fornecem resultados conclusivos sobre o estado infeccioso de um indivíduo. A transmissão do HIV através das transfusões ocorre quando doadores infectados realizam doações no período de janela imunológica. Esta fase não é detectada por técnicas antígeno/anticorpo, como no método ELISA utilizado na triagem sorológica, mas somente usando técnicas mais sensíveis baseadas em biologia molecular (MICELI et al., 2002).

Além do período de soroconversão, quando os testes confirmatórios podem apresentar resultados indeterminados ou negativos, há também a variação antigênica entre o vírus padrão (vírus protótipo utilizado nos kits) e outras variantes virais (PROIETTI et al., 2000). Nestes casos torna-se necessário a utilização de metodologias com maior sensibilidade e/ou especificidade baseadas em biologia molecular (KORMAN et al., 1999).

Atualmente existem várias técnicas baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos (NAT) utilizadas na prática corrente, como a reação de polimerização enzimática em cadeia

(PCR), amplificação baseada na sequência de ácidos nucleicos (NASBA) e baseadas na amplificação do sinal como o DNA ramificado (bDNA). A implementação de métodos de detecção viral baseados em NAT tem reduzido a probabilidade de transmissão do HIV por transfusão a partir da diminuição do período de janela imunológica para 11 dias (APRILI et al., 2003; NAJIOUIIAH et al., 2004).

Nos últimos anos, diversos países da Europa, além dos Estados Unidos, Austrália e Japão, introduziram a triagem pelo NAT nos bancos de sangue. Nos EUA, novos métodos de rastreamento envolvendo amplificação de ácidos nucleicos para detectar HIV-1 e HCV vêm sendo utilizados desde 1999 (STRAMER et al., 2004). No Brasil, alguns bancos de sangue de São Paulo já implementaram o diagnóstico molecular (LEVI et al., 2007; SCURACCHIO et al., 2007).

3.6 Determinação dos genótipos do HIV

Além da importância para os estudos de epidemiologia molecular, a determinação dos genótipos e/ou subtipos do HIV é também de grande interesse para o desenvolvimento de vacinas eficientes e tratamento anti-retrovirais.

Um grande obstáculo para a eficácia a longo prazo da terapia anti-retroviral para o HIV é a emergência de novas variantes virais, em decorrência das mutações no genoma do vírus que conferem reduzida suscetibilidade ao tratamento (HANNA et al., 2000; PEDUZZI, et al., 2002; STURMER et al., 2002). Alguns estudos têm demonstrado uma clara associação entre os subtipos virais e diferentes perfis de mutações que conferem resistência ao vírus.

Também tem sido sugerido que os diferentes subtipos virais podem influenciar na transmissibilidade e patogenicidade do vírus, sendo alguns subtipos associados com um maior período de sobrevivência de pessoas portadoras do HIV (KANDATHIL et al., 2005).

Atualmente, duas metodologias têm sido utilizadas em larga escala para distinguir os genótipos e/ou subtipos do HIV e para determinar novas linhagens do vírus recentemente isoladas. Tais metodologias são baseadas principalmente na análise das regiões estruturais *gag*, *env* e *pol*. O método considerado padrão ouro é o sequenciamento automático seguido de análise filogenética, que permite a direta classificação dos subtipos virais. Entretanto, essa ainda é uma técnica cara e que não permite uma análise rápida de um grande número de amostras.

Uma outra metodologia disponível é um método denominado *Heteroduplex mobility assay* (HMA). Essa metodologia ainda é limitada quanto à detecção de algumas mutações (HANNA et al., 2000; KOCH et al., 2001) e é útil somente em locais onde há predominância de um único subtipo viral. Em regiões onde circulam múltiplos subtipos, mais de uma região genômica precisa ser analisada, sendo a melhor técnica o sequenciamento de todo o genoma viral.

Mais recentemente, em busca de um método mais rápido e prático de subtipagem viral, têm sido desenvolvidos iniciadores subtipo-específicos para a determinação dos subtipos do HIV apenas por PCR, sem a necessidade de sequenciamento (PLANTIER et al., 2004; WEI et al., 2004; YAGYU et al., 2005).

Inicialmente, por ser o subtipo B o de maior prevalência na Europa ocidental e nos EUA, a maioria das pesquisas foram voltadas para este subtipo viral, resultando em testes diagnósticos, drogas e terapias anti-retrovirais otimizadas para detecção e tratamento de pacientes infectados com o subtipo B.

A emergência e a disseminação dos demais subtipos virais em várias regiões do mundo passaram a ser então um problema para o desempenho de uma série de ensaios comercialmente disponíveis (FONTAINE et al., 2001; MAES et al., 2004), que devem ser capazes de diagnosticar infecções causadas por todos os subtipos virais, incluindo os de

menor prevalência e mais diversos. Desde então, vários trabalhos têm avaliado o desempenho dos diferentes ensaios *in-house* ou disponíveis comercialmente para genotipagem (FONTAINE et al., 2001; JAGODZINSKI et al., 2003; MAES et al., 2004; PEDUZZI et al., 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram selecionadas amostras de sangue de 100 candidatos a doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, na cidade de Manaus-AM, no período de abril de 2006 a março de 2007. Como critério de inclusão, neste estudo foram selecionados candidatos a doação de sangue que apresentaram reatividade para HIV-1 em pelo menos um teste da triagem sorológica. Também fizeram parte da casuística sete doadores que haviam apresentado reatividade para HIV-1 nos anos de 2004 e 2005, e que foram selecionados a partir de uma busca ativa realizada através do sistema HEMOAM.

Foram incluídos apenas os doadores residentes em Manaus, com o objetivo de facilitar o acompanhamento dos mesmos. Os doadores cujos testes de triagem para HIV após repetição em duplicata não apresentaram reatividade foram excluídos do projeto.

4.2 Abordagem dos pacientes e coleta de material biológico

Os doadores que apresentaram resultados da sorologia reativos para HIV foram convocados pelo serviço social para consulta médica e coleta da segunda amostra, conforme preconizado pela Portaria nº 488/98 e rotina do HEMOAM. Nesta ocasião, o doador foi convidado a participar voluntariamente do estudo, registrando a sua autorização através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação (Apêndice A). Neste mesmo momento, foi aplicado um questionário para investigação de dados epidemiológicos (Apêndice B) aos doadores anuentes.

O doador foi então encaminhado para a coleta de nova amostra, que foi realizada pelo corpo técnico do HEMOAM. A partir do sangue total coletado, 15 mL foram destinados para este estudo. As amostras foram coletadas através de punção venosa em dois tubos EDTA (Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA) e um tubo PPT/*Plasma Preparation Tube* (Vacutainer BD, Franklin Lakes, NJ, USA), identificadas e encaminhadas ao laboratório de sorologia, onde foram processadas e cadastradas no sistema de banco de dados do Hemocentro.

4.3 Isolamento das células para extração de ácidos nucleicos

O sangue total foi centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. O plasma separado em microtubos de 1,5 mL e armazenado a -80°C . As células sanguíneas (glóbulos brancos e hemácias) foram separadas em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL e estocadas em freezer -20°C no laboratório de Sorologia do HEMOAM.

4.4 Análise das amostras

Foram analisadas as amostras com resultados considerados reativos em pelo menos um dos testes triagem (ELISA I/II). As amostras obtidas a partir da segunda coleta, resultados *Western Blot* positivo ou indeterminado para HIV, foram utilizadas para a realização das reações de PCR. O produto de PCR das amostras que apresentaram resultado positivo para esse teste foi seqüenciado para a determinação dos subtipos do HIV-1 (Figura 5).

4.4.1 Testes Sorológicos

Os testes de triagem I/II para a detecção de anticorpos anti-HIV foram realizados através de testes ELISA de 3º geração *Axsym HIV I/II gO* (Abbott, Wiesbaden, Alemanha) e HIV combinado Ag/Ac (Murex Biotech, Dartford, UK). O teste confirmatório foi realizado pela técnica de *Western Blot* - HIV Blot 2.2 (Genelabs Diagnostics, Science Park, Singapore). O *Western Blot* detecta anticorpos contra as proteínas do HIV-1, incluindo as do *gag* (p17, p24 e p55), *pol* (p31, p51, e p66) e *env* (gp41, gp120 e gp160). A banda específica de HIV-2 também é detectada.

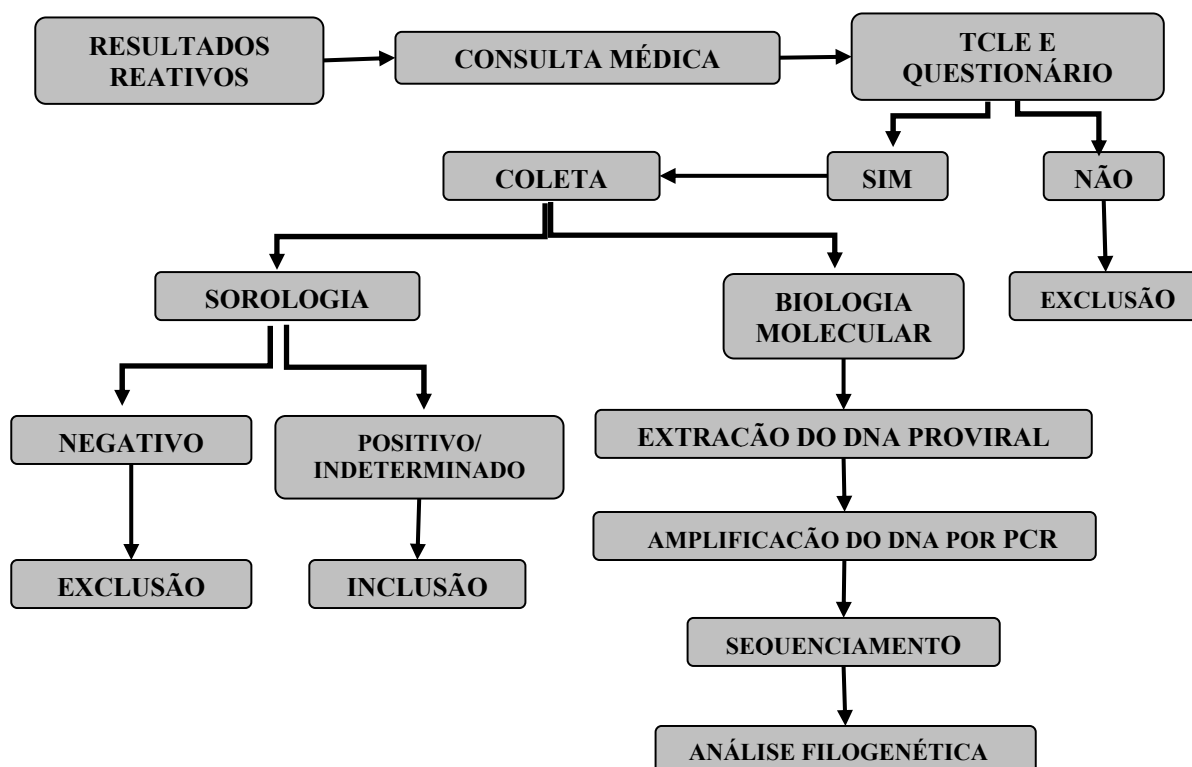


Figura 5: Fluxograma demonstrativo das etapas envolvidas no desenvolvimento do projeto.

Todos os procedimentos, bem como os resultados obtidos foram conduzidos e avaliados de acordo com as especificações do fabricante, cumprindo-se o determinado

pela Portaria nº 488/98 do Ministério da Saúde que preconiza que seja realizado o teste de ELISA em duplicata por metodologias de diferentes procedências, e um outro método mais sensível como teste confirmatório de positividade (*Western Blot*).

4.4.2 Extração do DNA proviral

O processo consistiu na extração do DNA proviral a partir do sangue total (parte celular) preservado a -20°C , utilizando-se o *GFX Genomic Blood DNA Purification Kit* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o descongelamento do sedimento celular, foi acrescentado 900 μL do tampão de lise de glóbulos vermelhos (*RBC lysis solution*) a microtubos de 1,5 mL contendo 300 μL de sangue. A mistura foi homogeneizada por inversão manual dos tubos e incubada a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 20 s, sendo desprezado o sobrenadante e adicionados 500 μL da solução de extração, seguido de homogeneização em agitador magnético e incubação por 5 min. a temperatura ambiente. Após a incubação, a mistura foi transferida para uma coluna e centrifugada a 8000 rpm por 1 min., desprezando-se o filtrado. À coluna foram acrescentados 500 μL de solução de extração e centrifugada a 8000 rpm durante 1 min. Descartou-se o filtrado, acrescentou-se 500 μL de solução de lavagem e centrifugou-se novamente a 12000 rpm por 3 min. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 100 μL de água estéril (Milli-Q), seguido de incubação por 1 min. O DNA foi então recuperado a partir de uma centrifugação de 8000 rpm por 1 min. e estocado a -20°C .

Para algumas amostras a extração de DNA não foi eficiente com a utilização do procedimento descrito anteriormente, sendo processadas novas alíquotas com o *Super Quik-Gene-DNA Isolation kit* Promega, Madison, WI, USA). Aos tubos de polipropileno de 15 mL

foram acrescentados de 7 a 10 mL do tampão de lise de glóbulos vermelhos gelado (*RBC Lysis Buffer*) de acordo com o volume de sangue. Em seguida, a mistura foi homogeneizada por 15 min. e centrifugada a 2500 rpm durante 20 min. sendo desprezado o sobrenadante. A lavagem de glóbulos vermelhos foi repetida conforme descrito anteriormente. Ao sedimento lavado, foram adicionados 1,5 mL do tampão de lise de glóbulos brancos (*WBC Lysis Buffer*), seguido de homogeneização em agitador magnético e incubação por 30 min. a 55°C. Após a incubação, foram acrescentados 200 µL de SDS 10% e 500 µl de reagente precipitante de proteínas e submetido a agitação vigorosa por 30 s. Novamente, a mistura foi incubada em banho-maria a 55°C durante 15 min. e centrifugado a 2500 rpm por 20 min. O sobrenadante límpido foi transferido para um novo tubo de 15 mL, com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, e foi adicionado etanol absoluto, na proporção de duas vezes o volume do sobrenadante. Após homogeneização branda, o DNA foi recuperado em microtubos de 1,5 mL e diluído em 200 µL de água estéril (Milli-Q) e estocado a -20°C.

4.4.3 Quantificação do DNA

Após homogeneização e dissolução completa do DNA extraído das amostras, foram realizadas diluições do DNA a 1:200 em água Milli-Q e a leitura da absorbância em espectrofotômetro (*Gene Quant II RNA/DNA Calculator*, Pharmacia Biotech) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O resultado da absorbância a 260 nm obtido foi multiplicado por 10, para a obtenção da concentração do DNA em µg/µl.

4.4.4. Amplificação por *nested* PCR

O produto da extração foi submetido à amplificação molecular por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em ciclador térmico *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Com a finalidade de verificar a integridade do DNA, realizou-se uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores para o controle endógeno que amplifica uma região do gene da β -globina localizado no cromossomo 11 humano.

Para as regiões *gag*, *pol* e *env*, foi utilizada a estratégia de *nested-PCR*, que consiste em duas etapas de amplificação consecutivas. Na primeira etapa de amplificação, utilizou-se um par de iniciadores externos para cada uma das três regiões. O produto da primeira reação foi submetido a uma segunda etapa de amplificação, com um par de iniciadores localizados internamente à sequência de nucleotídeos da primeira amplificação. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores para a amplificação das regiões gênicas em estudo.

REGIÕES	DESCRIÇÃO	SEQUÊNCIAS 5' – 3'
<i>Gag</i>	Externos	H1 G777 TCA CCT AGA ACT TTG AAT GCA TGG G
		H1 P202 CTA ATA CTG TAT CAT CTG CTC CTG T
		C1 GGTCAGCCAAAATTACCCTATA
		C2 GGAAATGTGGAAAGGAAGGACA
	Internos	H11584 AAA GAT GGA TAA TCC TGG G
		G17 TCC ACA TTT CCA ACA GCC CTT TTT
		SK ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGA
		C2 GGAAATGTGGAAAGGAAGGACA
<i>Pol</i>	Externos	K1 CAGAGCCAACAGCCCCACCA
		K2 TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGACA
	Internos	F1 GTTGACTCAGATTGGTTGCAC
		F2 GTATGTCATTGACAGTCCAGC
<i>Env</i>	Externos	ED5 ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
		ED12 AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG
	Internos	ED31 CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG
		ED33 TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC

4.4.4.1 Sistema da reação da PCR para controle da qualidade do DNA

Para β -globina, o sistema da reação de PCR foi composto por: 2,0 μ L de DNA genômico, 2,5 μ L de tampão 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.5), 1,0 μ L de $MgCl_2$ a 50 mM, 3,0 μ L do *pool* de dNTPs (75 mM de cada desoxirribonucleotídeo), 2,0 μ L de cada iniciador a 10 pmoles/ μ L, 0,3 μ L de *Taq* DNA polimerase a 5U/ μ L e 12,2 μ L de H_2O Milli-Q, totalizando um volume final de 25,0 μ L.

A reação foi inicialmente conduzida durante 35 ciclos em ciclador térmico, cada ciclo sob as seguintes condições: 94°C durante 1 min.; 55°C durante 1 min. e 72°C durante 1 min. Ao término dos 35 ciclos, o produto de amplificação foi mantido durante 10 min. a 72°C. Após este intervalo as amostras foram mantidas a 4°C.

4.4.4.2 Sistema da reação da PCR para as regiões *gag*, *pol* e *env*

O sistema e as condições de ciclagem para as reações de PCR para as três regiões analisadas foram compostos de acordo com o descrito nas tabelas abaixo. O volume de DNA e de alguns reagentes utilizados variou entre algumas amostras e, conseqüentemente variou o volume de H_2O para completar o volume final da reação.

Tabela 2. Sistema das reações de PCR para a região *gag*.

Primeira reação		Segunda reação	
Reagentes	Quant. (μL)	Reagentes	Quant. (μL)
H ₂ O	9,7 - 12,7	H ₂ O	31,5
Tampão/BSA	5,0	Tampão/BSA	5,0
dNTP 75 mM	3,0	dNTP 75 mM	4,0
iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/μL	1,0	iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/μL	2,0
iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/μL	1,0	iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/μL	2,0
Taq DNA pol 5U/L	0,3	Taq DNA pol 5U/L	0,5
DNA	2,0-5,0	Produto da 1ª reação	5,0
Volume total	25,0	Volume total	50,0

Tabela 3. Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para *gag*.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	2 min.	-
94°C	30 s	-
55-60°C	30 s	35
72°C	1 min. e 30 s	-
72°C	10 min.	-
4°C	∞	-

Tabela 4. Sistema das reações de PCR para a região *pol*.

Primeira reação		Segunda reação	
Reagentes	Quant. (μL)	Reagentes	Quant. (μL)
H ₂ O	7,7 - 10,8	H ₂ O	29,5 – 35,2
Tampão/BSA	5,0	Tampão/BSA	5,0
dNTP 75 mM	2,0-3,0	dNTP 50-100 mM	2,5-4,0
Iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/μL	1,0-2,0	iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/μL	1,0 - 3,0
Iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/μL	1,0-2,0	iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/μL	1,0 - 3,0
Taq DNA pol 5U/L	0,2-0,3	Taq DNA pol 5U/L	0,3-0,5
DNA	3,0-5,0	Produto da 1ª reação	5,0
Volume total	25,0	Volume total	50,0

Tabela 5. Condições de ciclagem das reações de PCR para *pol*.

Primeira reação			Segunda reação		
Temperatura	Tempo	Nº de ciclos	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	3 min.	-	94°C	3 min.	-
94°C	30 s	35	94°C	1 min.	35
55°C	30-55 s		55°C	30-55 s	
72°C	2 min.		72°C	1 min.	
72°C	10 min.	-	72°C	10 min.	-
4°C	∞	-	4°C	∞	-

Tabela 6. Sistema das reações de PCR para a região *env*.

Primeira reação		Segunda reação	
Reagentes	Quant. (µL)	Reagentes	Quant. (µL)
H ₂ O	11,7	H ₂ O	30,5
Tampão/BSA	5,0	Tampão/BSA	5,0
dNTP 75 mM	3,0	dNTP 125 mM	5,0
Iniciador <i>forward</i> 10 pmoles/µL	1,0	iniciador <i>forward</i> 5 pmoles/µL	2,0
Iniciador <i>reverse</i> 10 pmoles/µL	1,0	Iniciador <i>reverse</i> 5 pmoles/µL	2,0
Taq DNA pol 5U/L	0,3	Taq DNA pol 5U/L	0,5
DNA	3,0	Produto da 1ª reação	5,0
Volume total	25,0	Volume total	50,0

Tabela 7. Condições de ciclagem da primeira e segunda reação de PCR para *env*.

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
94°C	1 min.	3
55°C	1 min.	
72°C	1 min.	
94°C	15 s	35
55°C	45 s	
72°C	1 min.	
72°C	10 min.	-
4°C	∞	-

4.4.5 Eletroforese em gel de agarose

Após as reações, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em TBE 1X (Tris-borato-EDTA), corado com o brometo de etídio (1µg/mL), e visualizados com incidência de luz ultravioleta e fotografados em equipamento da Pharmacia Biotech, Image Master VDS FTI-5000.

4.4.6 Sequenciamento automático de DNA

4.4.6.1 Purificação do Produto de PCR

Todos os produtos amplificados por PCR, diagnosticados como positivos para a infecção pelo HIV-1, foram purificados pelo kit *Wizard PCR Preps DNA Purification System* (Promega, Madison, WI, USA) conforme especificações do fabricante. Em um microtubo de 1,5µL contendo 45 µL da amostra amplificada, acrescentou-se 100 µL de tampão de purificação. Após homogeneização em agitador magnético, acrescentou-se 1mL de resina e transferiu-se todo o volume para uma coluna de purificação (seringas de 5mL). A solução que passou pela coluna, contida no tubo suporte, foi descartada. Nesta mesma coluna, adicionou-se 2 mL de isopropanol 80%. Após a passagem de todo o volume de isopropanol pela coluna, trocou-se o tubo suporte desta por um microtubo de 1,5 mL limpo e centrifugou-se a 12000 rpm durante 2 min.. Adicionou-se 20 µL de H₂O Milli-Q no centro da coluna e centrifugou-se por 20 s a 12000 rpm. O produto centrifugado constituiu-se no material purificado desejado. Do volume de 20 µL eluído, retirou-se 5 µL para a análise por meio de eletroforese em gel de agarose e armazenou-se o restante a – 20° C.

4.4.6.2 Reação de sequenciamento

Os produtos amplificados e purificados foram sequenciados através do método enzimático de terminação da cadeia, inicialmente descrito por Sanger et al. (1977), utilizando-se o kit *Dynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). O protocolo de reação foi conduzido conforme especificações do fabricante, adicionando-se de 1,0-3,0 μL do produto do PCR, 1,0 μL dos iniciadores internos a 5 pmoles/ μL para cada região, 4,0 μL da solução de sequenciamento Big Dye terminator e H_2O Milli-Q para completar o volume final de 10 μL .

Os tubos contendo todos os reagentes foram levados ao termociclador, onde a reação foi inicialmente conduzida a 95°C durante 1 min., seguida de 25 ciclos, cada ciclo sob as seguintes condições: 95°C durante 20 s, 50°C durante 20 s e 60°C durante 1 min.; e após este intervalo as amostras foram mantidas a 4°C.

Após o término desta reação foi realizada a precipitação da reação de sequenciamento. Ao produto da reação foi adicionado 1 μL de acetato de amônio 7,5 mM e 27,5 μL de etanol absoluto, seguido de homogeneização em agitador magnético e incubação em gelo por 20 min. Após a incubação, a placa foi centrifugada a 3250 rpm durante 30 min.. Desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μL de etanol 70%. Centrifugou-se a 3250 rpm durante 10 min. e desprezou-se o sobrenadante, seguindo-se de nova centrifugação com a placa invertida. Adicionou-se 10 μL de *loading buffer* (formamida à 70% e EDTA 1mM) em cada poço. Após homogeneização em agitador magnético, centrifugou-se a placa rapidamente para a retirada de bolhas.

Em seguida as amostras foram submetidas ao sequenciador automático MegaBACE

1000 (*Amersham Biociences*), através de eletroforese capilar em gel de poliacrilamida. Para injeção utilizou-se 2 KV por 80 s e a corrida processou-se a 9 KV por 150 min. Os eletroferogramas obtidos foram analisados por meio do *software* MegaBACE Sequence Analyser.

4.4.7 Análises filogenéticas

4.4.7.1 Alinhamento das seqüências de nucleotídeos

Os eletroferogramas foram analisados usando-se o programa ChromasPro versão 1.41 e as seqüências consenso obtidas pela formação de *contigs* no mesmo programa, permitindo a obtenção das seqüências de nucleotídeos dos isolados virais, o que resultou em um alinhamento múltiplo das seqüências no programa BioEdit. Em seguida, as seqüências em estudo foram alinhadas juntamente com as seqüências de nucleotídeos de protótipos do HIV-1 existentes no banco de dados *HIV Database Los Alamos* (site: <http://www.hiv.lanl.gov>).

Os números de acesso dos protótipos do *HIV Database* utilizados nas análises de nucleotídeos estão descritos nas Tabelas 8 e 9.

4.4.7.2 Construção das árvores filogenéticas

A partir das seqüências alinhadas e editadas, juntamente com os protótipos, as árvores filogenéticas foram construídas usando o programa *Phylip (PHYLogeny Inference Package)* versão 3.5, usando os modelos de *Neighbour Joining* (NJ) (SATO; NEI, 1987) e *Maximum Likelihood* (ML).

A confiabilidade (avaliação estatística) das árvores de NJ foi realizada pelo método de

bootstrap, usando 1.000 replicatas. As árvores foram visualizadas no programa *TreeView* versão 1.4. e editadas no programa *CorelDraw* versão 10.

Tabela 8. Isolados de HIV-1 utilizados na análise filogenética para as regiões *gag*, *pol* e *env*. (Adaptado de LEITNER et al., 2005).

SUBTIPO	ISOLADO	N. DE ACESSO	ORIGEM	AUTOR
A1	92UG037.1	U51190	Uganda	Gao, F. J Virol 70:7013–29(1996)
A1	Q23	AF004885	Kênia	Poss, M. J Virol 72:8240–51(1998)
A1	SE7253	AF069670	Suécia ;Somalia	Carr, J.K. AIDS 13:1819–26(1999)
A1	UG57136	AF484509	Uganda	Harris M.E. ARHR 18:1281–90(2002)
A2	CDKTB48	AF286238	DRC	Gao, F. ARHR 17:675–88(2001)
A2	CY017	AF286237	Chipre	Gao, F. ARHR 17:675–88(2001)
B	HXB2	K03455	França	Wong-Staal, F. Nature 313:277–284 (1985)
B	BK132	AY173951	Tailândia	Hierholzer, J. ARHR 18:1339–50(2002)
B	671	AY423387	Holanda	Geels, M.J. J Virol 77:12430–40(2003)
B	1058	AY331295	Estados Unidos	Bernardin, F. J Virol 79:11523–8(2005)
C	ETH2220	U46016	Etiópia	Salminen, M.O. ARHR 12:1329–39(1996)
C	92BR025.8	U52953	Brasil	Gao, F. J Virol 70:1651–57(1996)
C	IN21068	AF067155	Índia	Lole, K.S. J Virol 73:152–60(1999)
C	SK164B1	AY772699	Africa do Sul	Kiepiela, P. Nature 432:769–75(2004)
D	ELI	K03454	DRC	Alizon, M. Cell 46:63–74(1986)
D	94UG114.1	U88824	Uganda	Gao, F. J Virol 72:5680–98(1998)
D	4412HAL	AY371157	Camarões	Kijak, G.H. ARHR 20:521–30(2004)
D	A280	AY253311	Tanzânia	Herbinger, K-H. ARHR 20:895–901(2004)
F1	93BR020-1	AF005494	Brasil	Gao, F. J Virol 72:5680–98(1998)
F1	VI850	AF077336	Bélgica ;DRC	Laukkanen, T. Virology 269:95–104 (2000)
F1	FIN9363	AF075703	Finlândia	Laukkanen, T. Virology 269:95–104 (2000)
F1	MP411	AJ249238	França	Triques K. ARHR 16:139–151(2000)
F2	MP255	AJ249236	Camarões	Triques K. ARHR 16:139–151(2000)
F2	MP257	AJ249237	Camerões	Triques K. ARHR 16:139–151(2000)
F2	0016BBY	AY371158	Camerões	Kijak, G.H. ARHR 20:521–30(2004)
F2	CM53657	AF377956	Camerões	Carr, J.K. Virology 286:168–81(2001)
G	SE6165	AF061642	Suécia ;DRC Finlândia ;	Carr, J.K. Virology247:22–31 (1998)
G	HH8793.1.1	AF061640	Kênia	Carr, J.K. Virology247:22–31 (1998)
G	DRCBL	AF084936	Bélgica; DRC	Debyser Z. ARHR 14:453–9 (1998)
G	NG083	U88826	Nigéria	Gao, F. J Virol 72:5680–98(1998)
H	056.1	AF005496	África Central.	Gao, F. J Virol 72:5680–98(1998)
H	VI991	AF190127	Bélgica ; DRC	Janssens, W. AIDS 14:1533–43(2000)
H	VI997	AF190128	Bélgica; DRC	Janssens, W. AIDS 14:1533–43(2000)
J	SE9280.9	AF082394	Suécia; DRC	Laukkanen, T. ARHR 15:293–97(1999)
J	SE9173.3	AF082395	Suécia ; DRC	Laukkanen, T. ARHR 15:293–97(1999)
K	EQTBI1C	AJ249235	DRC	Triques K. ARHR 16:139-51(2000)
K	MP535	AJ249239	Camerões	Triques K. ARHR 16:139-51(2000)

Tabela 9. Formas recombinantes utilizadas na análise filogenética para as regiões *gag*, *pol* e *env* (Adaptado de LEITNER et al., 2005).

CRF	SUBTIPOS	ISOLADOS	N. DE ACESSO	ORIGEM	REFERENCIA
1	AE	CM240	U54771	Tailândia	Carr, J.K. J Virol 70:5935–43 (1996)
2	AG	IBNG	L39106	Nigéria	Howard, T.M. ARHR 10:1755-57 (1994)
3	AB	KAL153	AF193276	Rússia	Salminen, M.O., Unpublished (1998)
4	AGHKU	CY032.3	AF049337	Chipre; Grécia	Gao, F. J Virol 72:10234–41 (1998)
5	DF	VI310	AF193253	Bélgica; DRC	Laukkanen, T. Virology 269:95-104 (2000)
6	AGJK	BFP90	AF064699	Austrália	Oelrichs, R.B. ARHR 14:1495–500 (1998)
7	BC	CN54	AX149771	China	Guan, Q. J. Clin. Microbiol. 42:4261-7 (2004)
8	BC	GX-6F	AY008715	China	Piyasirisilp, S. J Virol 74:11286–95 (2000)
9	96GH2911	AY093605		Gana	McCutchan, F.E. ARHR 20:819–26 (2004)
10	CD	TZBF061	AF289548	Tanzânia	Koulinska, I.N. ARHR 17:423–31 (2001)
11	A01GJ	GR17	AF179368	Grécia ;DRC	Paraskevis, D. ARHR 16:845–55 (2000)
12	BF	ARMA159	AF385936	Argentina	Carr, J.K. AIDS 15:F41–7 (2001)
13	A01GJU	96CM-1849	AF460972	Camerões	Wilbe, K. ARHR 18:849–56 (2002)
14	BG	X397	AF423756	Espanha	Delgado, E. JAIDS 29:536–43 (2002)
15	01B	99TH.MU2079	AF516184	Tailândia	Viputtigul, K. ARHR 18:1235–7 (2002)
16	A2D	KISII5009	AF457060	Kênia	Dowling, W.E. AIDS 16:1809–20 (2002)
18		CU14	AY586540	Cuba	Thomson, M. AIDS 19:1155–63 (2005)
19		CU38	AY588970	Cuba	Cuevas, M.T. AIDS 16:1643–53 (2005)

Todos os programas utilizados para as análises filogenéticas neste trabalho encontram-se disponíveis na *homepage*: <http://evolution.genetics.washington.edu>.

4.5 Análise dos dados

Os dados obtidos durante todo o desenvolvimento do projeto foram armazenados em um banco de dados do programa Epi Info 2005 Versão 3.3.2, que também foi usado como ferramenta para as análises estatísticas.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das Amostras

No período de abril de 2006 a março de 2007, foram coletadas no HEMOAM amostras de sangue de 100 candidatos a doadores de sangue que apresentaram reatividade para HIV-1 em pelo menos um dos testes da triagem sorológica. Foram coletadas também sete amostras de candidatos a doadores de sangue que apresentaram reatividade para HIV-1 nos anos de 2004 e 2005. Deste total de 107 amostras, 35 amostras apresentaram resultado negativo na segunda triagem sorológica, 14 apresentaram resultado negativo para o *Western Blot*, 21 apresentaram resultado indeterminado, 31 amostras resultado com padrão positivo e 6 não obtiveram resultado para o confirmatório devido a ausência da coleta da segunda amostra e realização deste teste. Na tabela 10, estão resumidas as características dos 31 candidatos a doadores reativos para o *Western Blot* analisados neste trabalho.

Do total de candidatos a doadores estudados, verificou-se predominância de indivíduos do sexo masculino ($n=24/77,4\%$). A faixa etária global do grupo de doadores situou-se em torno de 32 anos de idade (19-61), não havendo diferença significativa entre as médias de idade de homens e mulheres (Tabela 11).

Entre os fatores de risco analisados, transfusão sanguínea, uso de drogas injetáveis, presença de tatuagens ou *piercings*, múltiplos parceiros e realização de cirurgia, o que apresentou maior frequência ($n=13/41,9\%$) foi o fator cirurgia, seguida de múltiplos parceiros ($n=12/38,7\%$).

Tabela 10: Distribuição das 31 amostras de candidatos a doadores reativos para HIV-1 de acordo com os dados demográficos e epidemiológicos

Variáveis	n	%
Sexo		
Masculino	24	77,4
Feminino	7	22,6
Idade		
Média ± DP	32,0 ± 11,05	
Mediana	26,0	
Amplitude	19 - 61	
Característica da doação		
Primeira doação	21	67,7
Doação repetida	10	32,3
Usuário de Bebidas alcóolicas		
Sim	17	54,8
Não	14	45,2
Fatores de risco		
Transfusão	2	6,5
Drogas injetáveis	4	12,9
Tatuagens/ <i>Piercing</i>	5	16,1
Múltiplos parceiros	12	38,7
Cirurgia	13	41,9

Tabela 11: Distribuição da média de idade dos indivíduos reativos para HIV-1 de acordo com o sexo.

Sexo	n	Média	Desvio Padrão	Mediana	Amplitude
Masculino	24	31,7	11,6	25,5	19 – 61
Feminino	7	33,1	9,6	35,0	23 – 49

p = 0,762 (Teste t - Student)

Entre os dez doadores de repetição observados, seis (60%) soroconverteram em até 20 meses (Tabela 12). Para o cálculo de soroconversão foram consideradas a data da última doação liberada e a data da tentativa de doação que apresentou reatividade para HIV-1.

Tabela 12: Distribuição das amostras de doadores de repetição reativos para HIV-1 em relação ao tempo de soroconversão em meses.

Tempo de Soroconversão (meses)	n	%
0 a 20	6	60,0
21 a 40	1	10,0
41 a 60	1	10,0
61 a 80	1	10,0
Acima de 100	1	10,0

5.2 Soroprevalência da infecção pelo HIV-1 entre doadores de sangue no HEMOAM

Para análise da soroprevalência da infecção pelo HIV-1 na cidade de Manaus, a partir do banco de dados do HEMOAM foi obtido um total de 37.098 doadores de sangue no período de janeiro de 2006 a março de 2007. Nesse período foram observados 27 casos soropositivos confirmados pelo método de PCR realizado neste trabalho, e considerando-se os doadores que não retornaram para a coleta da segunda amostra, determinou-se uma soroprevalência estimada de 0,08 % desta infecção.

5.3 *Western Blot* para HIV 1

As amostras com resultados indeterminado e reativo no teste confirmatório foram analisadas de acordo com o perfil de bandas detectadas para cada região gênica (Tabela 13). Entre as amostras com padrão indeterminado para *Western Blot*, todas apresentaram reatividade para a p24, e apenas uma para p17. Entre as amostras reativas, a p55 foi a que apresentou menor frequência (n = 17).

Tabela 13: Perfil de bandas detectadas pelo *Western Blot* para cada região, das 52 amostras com resultados indeterminado e reativo para o confirmatório.

Regiões	Bandas	Reativos		Indeterminados	
		n	%	n	%
<i>Gag</i>	p17	28	96,6	1	3,4
	p24	31	59,6	21	40,4
	p55	17	100	0	0,0
	p31	25	100	0	0,0
<i>Pol</i>	p51	25	100	0	0,0
	p66	26	100	0	0,0
	gp41	28	100	0	0,0
<i>Env</i>	gp120	31	100	0	0,0
	gp160	31	100	0	0,0

Todas as amostras com padrão indeterminado foram submetidas ao diagnóstico molecular por PCR para HIV-1 (região *env*), mostrando resultados com padrão de amplificação negativo (Figura 6).

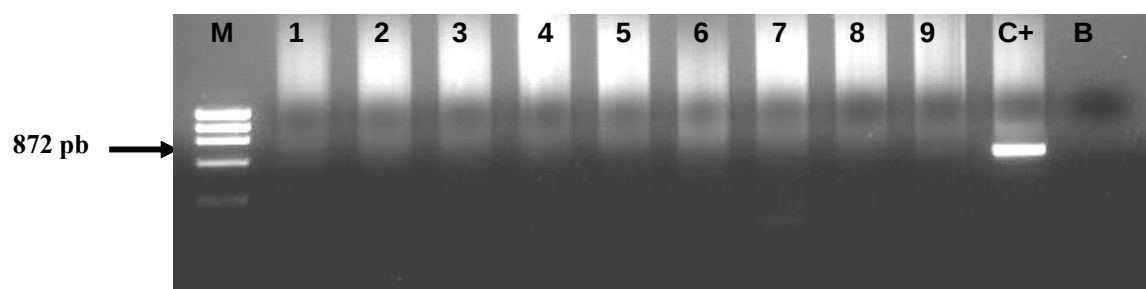


Figura 6: Análise dos fragmentos amplificados da região *env* em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular; 1 a 9: amostras dos candidatos a doadores; C+: controle positivo; B: branco da reação.

5.4 PCR para HIV-1 – Regiões *gag*, *pol* e *env*

Todas as amostras positivas para o teste confirmatório foram submetidas à amplificação por *nested* PCR para as regiões *env*, *gag* e *pol*, utilizando os iniciadores

descritos na Tabela 1 do item 4.4.4 em Material e Métodos. Com a finalidade de verificar a integridade do DNA, realizou-se também uma reação de PCR utilizando-se os iniciadores que amplificam uma região do gene da β -globina (controle endógeno) localizado no cromossomo 11 humano, obtendo-se um fragmento de 310 bp para cada amostra (Figura 7).

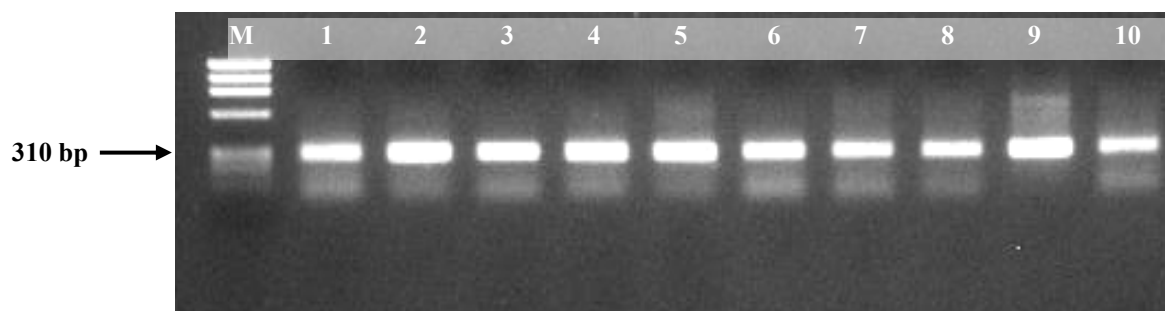


Figura 7: Perfil eletroforético em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, evidenciando um fragmento de 310 bp resultante da amplificação da região do gene da β -globina M: marcador de peso molecular; 1 a 10: amostras dos candidatos a doadores.

A formação de uma única banda de 603 bp para a região *gag*, 872 bp para a região *pol* e 603 bp para a região *env*, indicam a amplificação do fragmento específico para cada uma das regiões testadas. Na Figura 8, as amostras que apresentaram a banda específica nas regiões analisadas foram consideradas como resultados positivos para a reação de PCR. A Tabela 14 demonstra os resultados de amplificações obtidos para as três regiões.

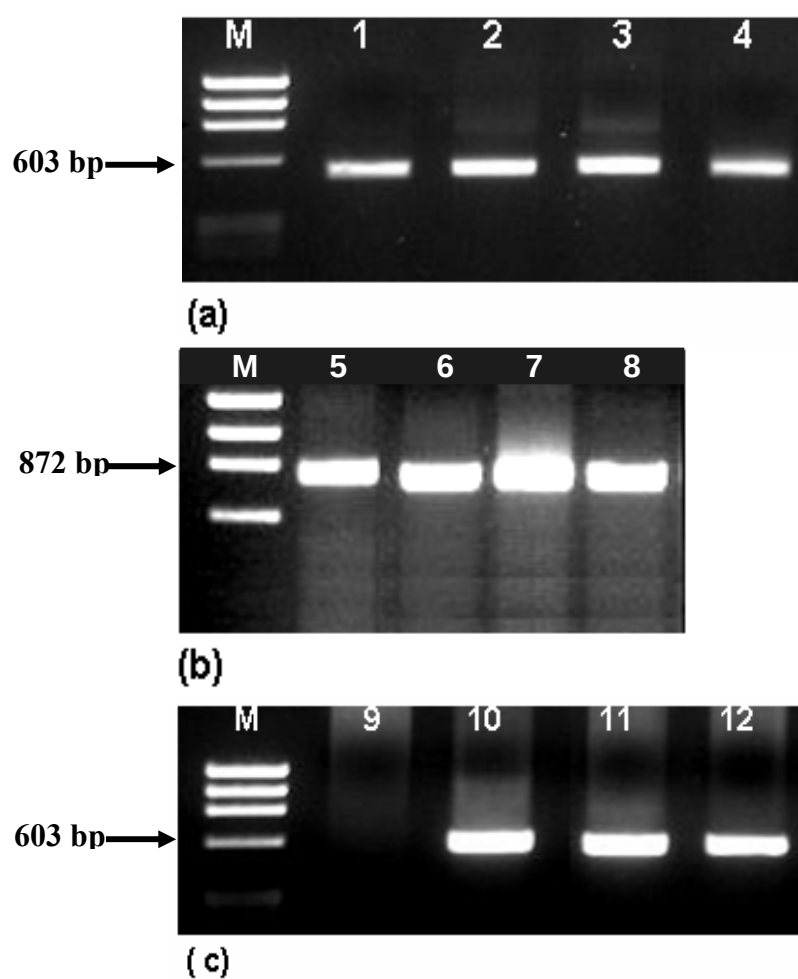


Figura 8: Análise dos fragmentos amplificados da região *gag* (a), *pol* (b) e *env* (c) em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídeo. M: marcador de peso molecular; 1 a 12: amostras dos candidatos doadores.

Tabela 14: Resultado das amplificações por *nested* PCR para o controle endógeno (β -globina), regiões *gag*, *pol* e *env*.

AMOSTRAS	PCR HIV-1			
	β -globina	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>Env</i>
AM18	x	x	x	X
AM24	x	x*	x*	X
AM30	x	x	x*	X
AM35	x	x	x	X
AM44	x	x	x	-
AM45	x	x	x	X
AM46	x	x	x	x *
AM47	x	x	x	X
AM52	x	x	x	X
AM54	x	x	x	X
AM73	x	x	x	X
AM77	x	x	x	X
AM82	x	x	x*	X
AM84	x	x	x	X
AM86	x	x	x	X
AM87	x	x	x	X
AM89	x	x*	x	X
AM90	x	-	x	X
AM91	x	x	-	X
AM95	x	x	x	X
AM96	x	-	x*	X
AM97	x	x	x	X
AM98	x	-	x*	X
AM99	x	x	x	X
AM100	x	x	x	X
AM101	x	x	x	x*
AM102	x	x	x	X
AM104	x	x	x*	X
AM105	x	x	x	X
AM106	x	x	x*	X
AM107	x	x	x	x

x: amostras amplificadas;

*: amostras amplificadas que não foram obtidas as seqüências de nucleotídeos.

5.5 Sequenciamento das regiões *gag*, *pol* e *env*

As amostras amplificadas para as regiões *gag*, *pol* e *env* foram submetidas à purificação para a remoção de resíduos da reação de PCR e em seguida, ao sequenciamento direto dos fragmentos utilizando-se os iniciadores internos da reação de PCR para as três regiões.

Os eletroferogramas foram analisados usando-se o programa *ChromasPro* (versão 1.34) e as seqüências-consenso obtidas pela formação de *contigs* no mesmo programa, compostas por aproximadamente 460, 700 e 500 nucleotídeos para a região *gag*, *pol* e *env* respectivamente. No total, foram obtidas 26 seqüências para a região *gag*, 23 para *pol* e 28 para *env*.

5.6 Análise Filogenética – regiões *gag*, *pol* e *env*

Foi realizado o alinhamento múltiplo das seqüências obtidas para as regiões *gag*, *pol*, e *env*, incluindo 57 seqüências provenientes de isolados de HIV de diversas localidades e representantes de todos os subtipos e recombinantes descritos no Banco de dados *HIV Database Los Alamos*.

A partir dos dados de alinhamento múltiplo dos nucleotídeos das regiões *gag*, *pol* e *env* foi construída uma árvore filogenética para cada região pelo programa *Phylip*, utilizando-se o método de *Neighbour-joining* (NJ) e *Maximum Likelihood* (ML) para a inferência filogenética. Nas figuras 9, 10 e 11 podem ser observadas as árvores geradas por NJ com os valores de *bootstrap* consideráveis (acima de 50%) sobre os principais ramos da árvore.

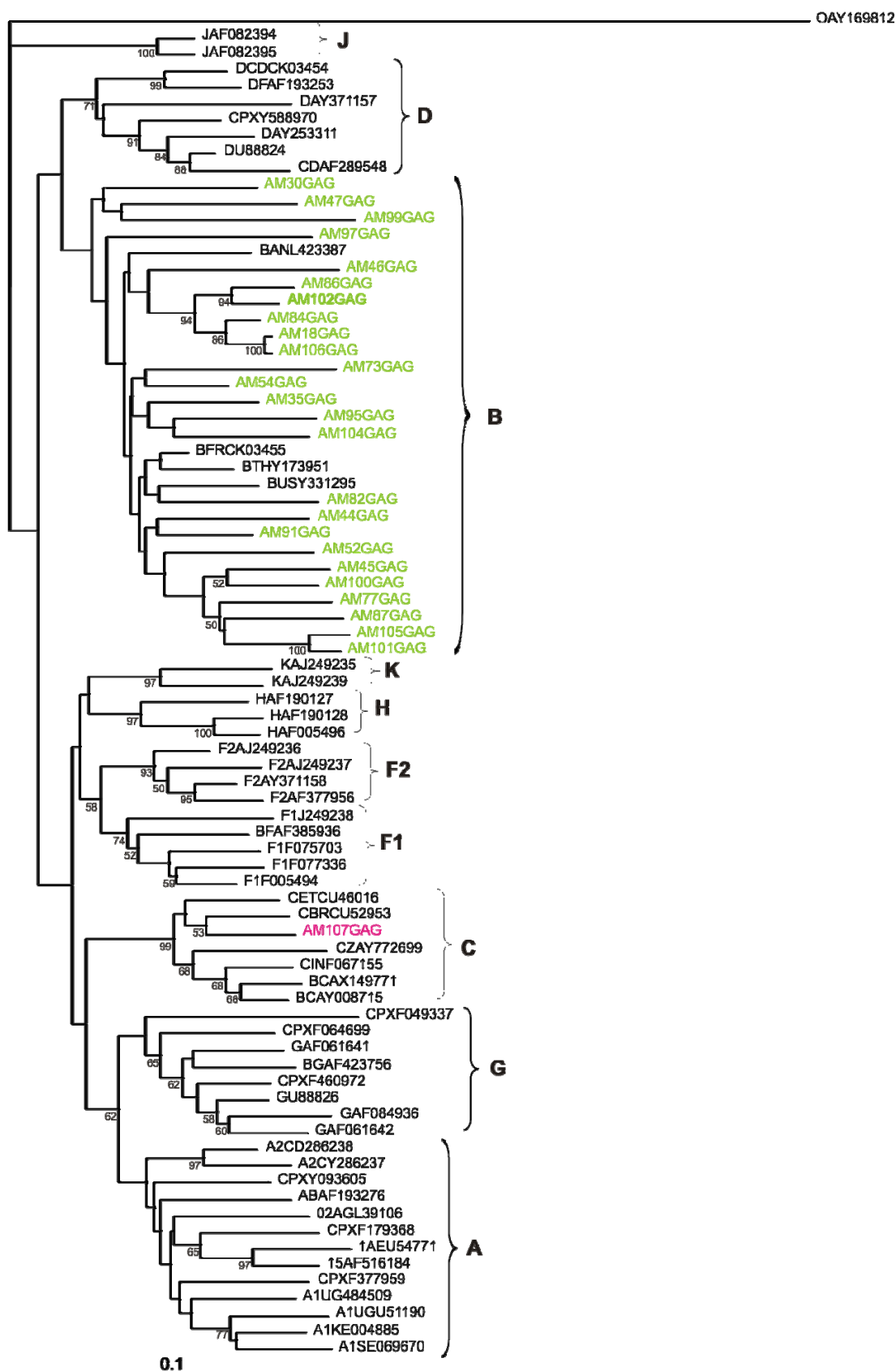


Figura 9: Análise filogenética da região *gag* de 26 isolados do HIV-1, com seqüências protótipos obtidos da literatura. Os valores de *bootstrap* em percentagem (acima de 50% e usando 1000 replicatas) estão representados nos ramos para cada seqüência. Foi usado o isolado OAY169812 como *outgroup*. Os isolados brasileiros estão destacados em cores.

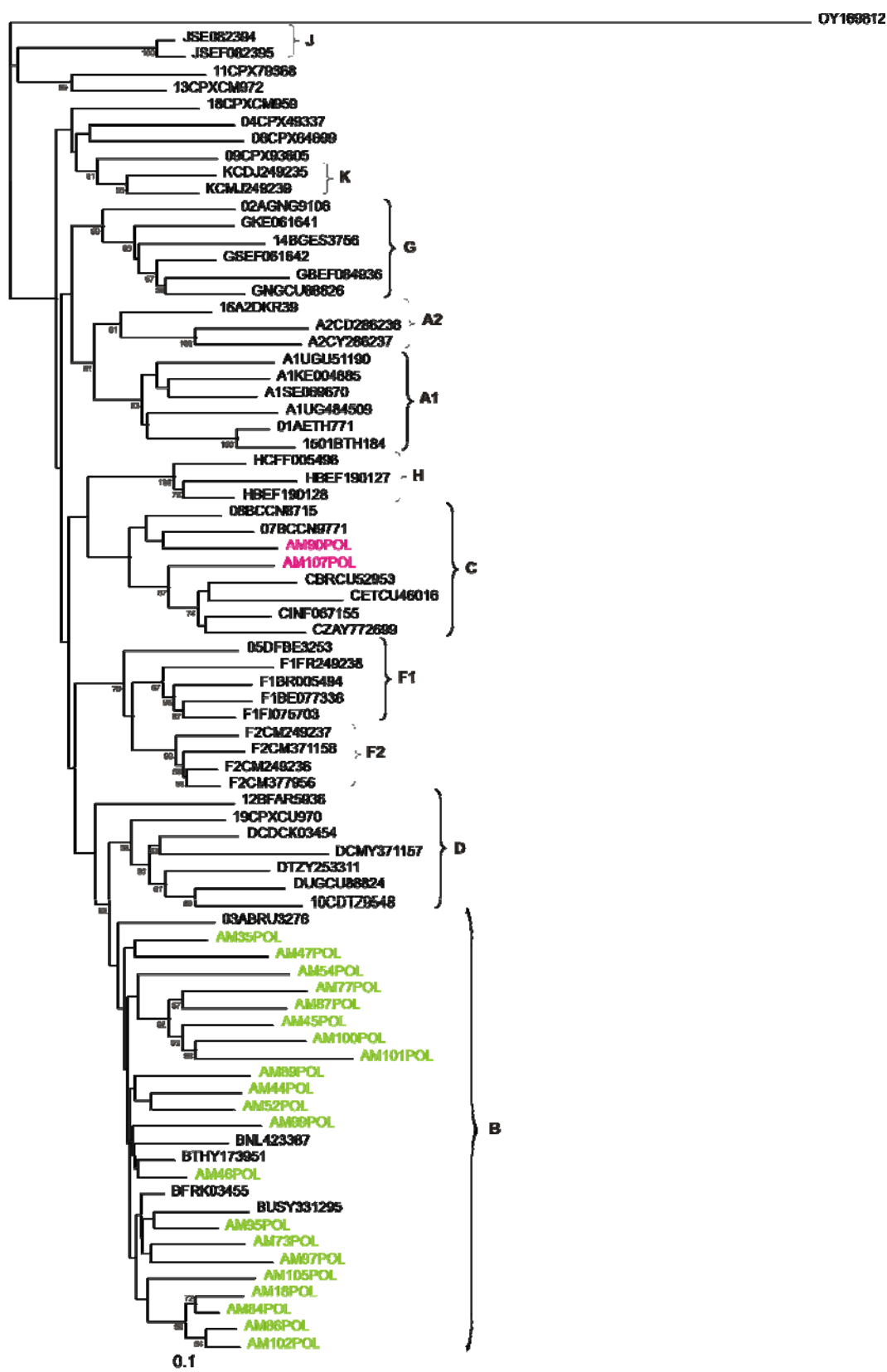


Figura 10: Análise filogenética da região *pol* de 23 isolados do HIV-1, com seqüências protótipos obtidos da literatura. Os valores de *bootstrap* em porcentagem (acima de 50% e usando 1000 replicatas) estão representados nos ramos para cada seqüência. Foi usado o isolado OAY169812 como outgroup. Os isolados brasileiros estão destacados em cores.

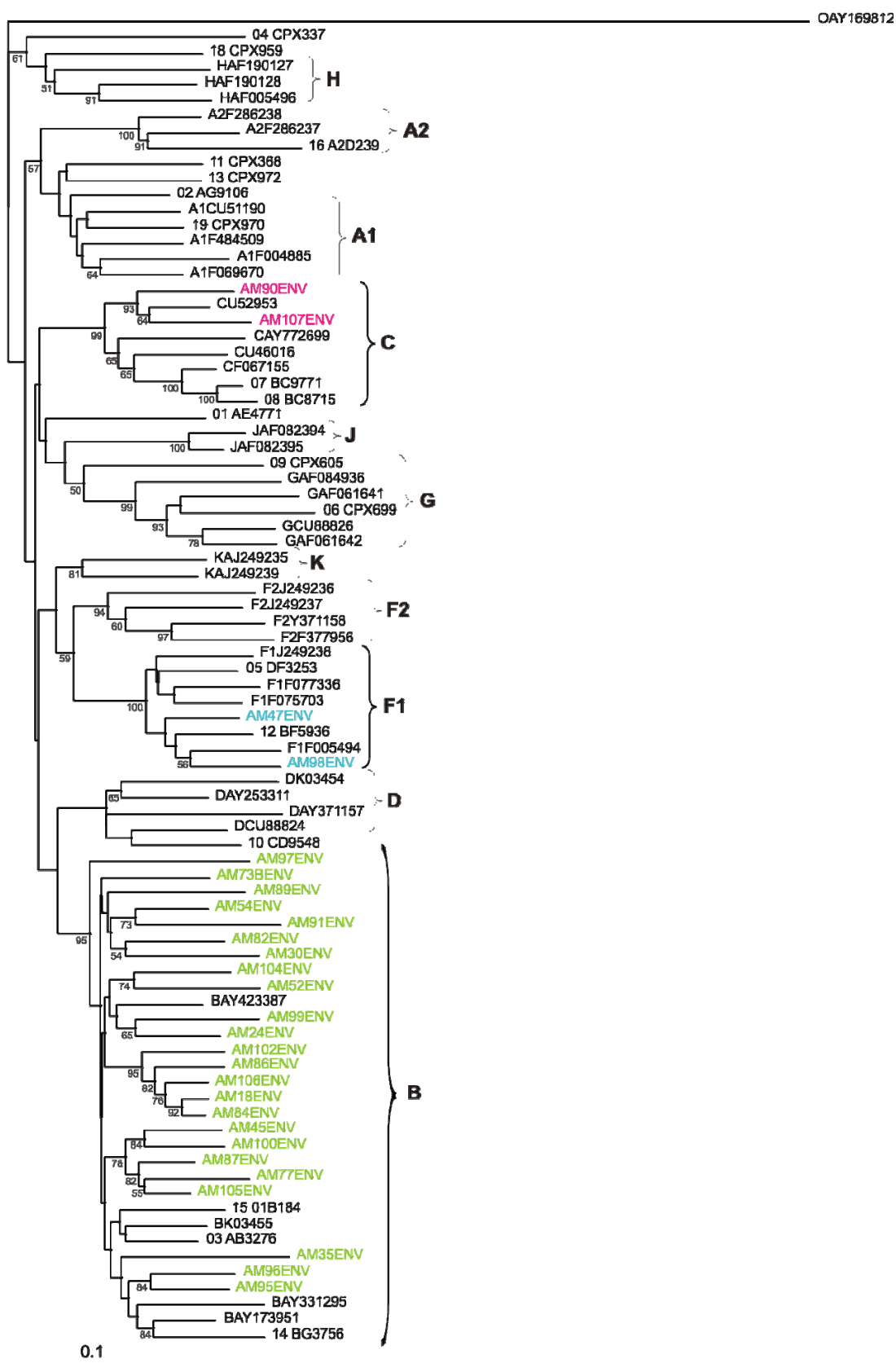


Figura 11: Análise filogenética da região *env* de 28 isolados do HIV-1, com seqüências protótipos obtidos da literatura. Os valores de *bootstrap* em porcentagem (acima de 50% e usando 1000 replicatas) estão representados nos ramos para cada seqüência. Foi usado o isolado OAY169812 como outgroup. Os isolados brasileiros estão destacados em cores.

Observa-se que as árvores filogenéticas geradas para cada uma das três regiões analisadas se separam em clusters distintos, que compreendem os isolados dos subtipos A (sub-subtipos A1 e A2) B, C, D, F (sub-subtipos F1 e F2) G, H, J e K.

A análise filogenética para a região *gag* demonstrou a predominância do subtipo B (96,2 %) dentre as 26 seqüências obtidas para essa região, sendo uma (3,8 %) pertencente ao subtipo C. Para a região *pol*, das 23 amostras analisadas, 21 (91,3 %) pertencem a subtipo B e duas (8,7%) pertencem ao subtipo C. Das 28 amostras analisadas para a região *env*, 24 (85,7 %) são pertencentes ao subtipo B, duas (7,1 %) pertencem ao subtipo C e duas (7,1 %) ao subtipo F (Gráfico 1).

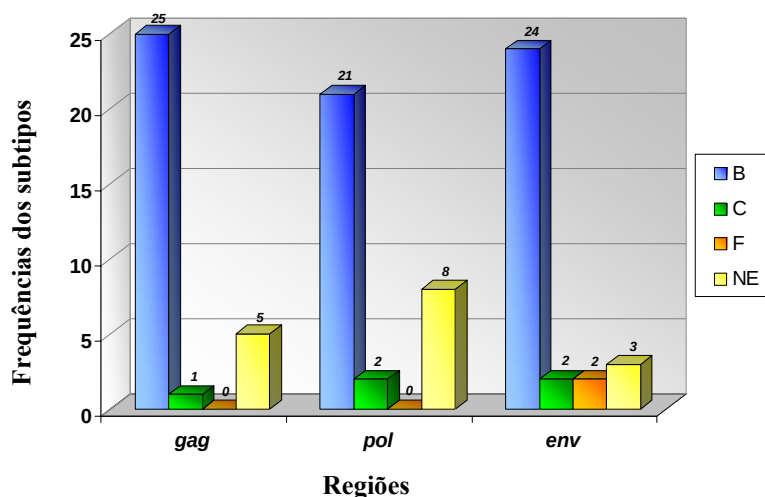


Gráfico 1: Frequências dos subtipos virais encontrados para cada região analisada.
NE : seqüências não encontradas.

No total de 31 amostras analisadas, foram obtidas seqüências para as regiões *env*, *gag* e *pol* de 18 amostras. Destas, 17 mostraram subtipos concordantes para as três regiões: 16 subtipo B e 1 subtipo C. Uma amostra apresentou subtipos discordantes (subtipo B em *gag* e *pol*, e subtipo F em *env*), sugerindo a presença de um forma recombinante. Para 10 amostras, foi possível a obtenção de seqüências para duas regiões; nove foram concordantes para o

subtipo B e uma para o subtipo C. Três amostras foram subtipadas apenas para a região *env*, sendo uma subtipo F e duas subtipo B (Tabela 15).

Tabela 15: Resultados do sequenciamento por região gênica.

AMOSTRAS	REGIÕES		
	<i>gag</i>	<i>pol</i>	<i>env</i>
AM18	B	B	B
AM24	-	-	B
AM30	B	-	B
AM35	B	B	B
AM44	B	B	-
AM45	B	B	B
AM46	B	B	-
AM47	B	B	F
AM52	B	B	B
AM54	B	B	B
AM73	B	B	B
AM77	B	B	B
AM82	B	-	B
AM84	B	B	B
AM86	B	B	B
AM87	B	B	B
AM89	-	B	B
AM90	-	C	C
AM91	B	-	B
AM95	B	B	B
AM96	-	-	B
AM97	B	B	B
AM98	-	-	F
AM99	B	B	B
AM100	B	B	B
AM101	B	B	-
AM102	B	B	B
AM104	B	-	B
AM105	B	B	B
AM106	B	-	B
AM107	C	C	C

5.7 Caracterização da variabilidade genética da região da alça V3 dos isolados pertencentes ao subtipo B

A partir do alinhamento das seqüências obtidas para a região *env* foi possível a dedução das seqüências de aminoácidos de 19 isolados do subtipo B, para a caracterização da variabilidade genética da alça V3. Entre estes isolados, o tetrapeptídeo do alça V3 mais prevalente foi o GPGR (68,4%), seguido pelo variante brasileiro B” GWGR (15,8%). Também foram encontradas em apenas uma amostra as variações GPGK, GFGR e AWGR (Figura 12).

	10	20	30
			
B423387HO	CTRPNNNTRKSIHI	GPGR	AFYATGEIIGDIRQAH
B173951TA	Y...R.TM	GPGR	VY.T.....R...
B331295US	.I.....R.TM	GPGR	VY.T..Q.....
AM35ENV	G..M	GPGR	...T...V.N.....
AM54ENV	M	GWGR	T.....
AM104ENV	G...	GPGR	D.VV.....
AM18ENV	P.	GPGR	D...K...Y.
AM73BENV	G.Q.	GPGR	TL.....
AM77ENV	...S...R...	GPGR	TL.-.D...N.....
AM82ENV	...S.....	GFGR	.L.T.D-V..N.....
AM84ENV	P.	GPGR	G.....
AM86ENV	KR...L	GPGR	A.....Y.
AM87ENV	N.	GPGR	..F.A.....
AM97ENV	R..PL	GPGR	.L...D...K...
AM99ENV	...G.....L	GWGR	N.....
AM102ENV	P.	GPGR	
AM105ENV	...LS...R...M	GPGR	TL.T-.K.....
AM24ENV	...S.....QM	GWGR	...V.....
AM89ENV	G...	GPGR	S.....
AM91ENV	...S.....PM	AWGR	T....D.....
AM106ENV	R..N.	GPGR	A.....Y.
AM52ENV	SL	GPGR	D.....R...

Figura 12: Alinhamento das seqüências de aminoácidos da região da alça V3 obtidas com três protótipos do subtipo B. Em destaque a região do topo da alça V3, em laranja está representado o motivo GPGR e em verde o motivo GWGR (“B”). Os pontos representam os aminoácidos idênticos e os traços representam as deleções.

5.8 Análise dos isolados pertencentes ao subtipo C

As amostras pertencentes ao subtipo C foram analisadas pelo método de *Bootscanning* para avaliar possíveis eventos de recombinação. Para esta análise, foram concatenadas as sequências das regiões *pol* e *env* da amostra AM90, e as sequências de *gag*, *env* e *pol* da amostra AM107. Estas foram alinhadas juntamente com as sequências completas dos isolados de diferentes países utilizados como protótipos neste trabalho. O Gráfico 2 demonstra que o isolado AM90 não apresenta similaridade com os outros isolados que não os pertencentes ao subtipo C. Para o isolado AM107, observa-se um possível ponto de recombinação na região *gag* (Gráfico 3).

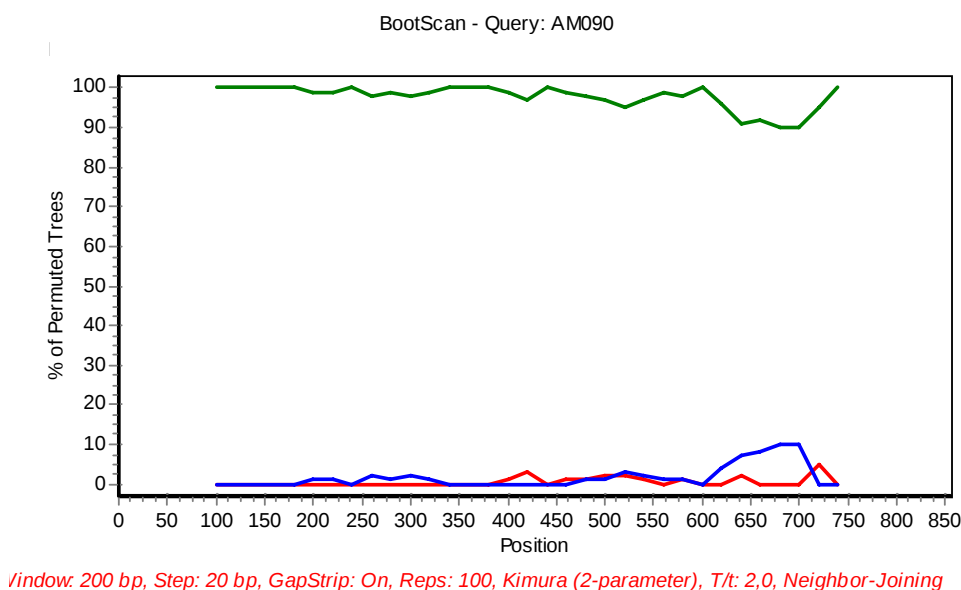
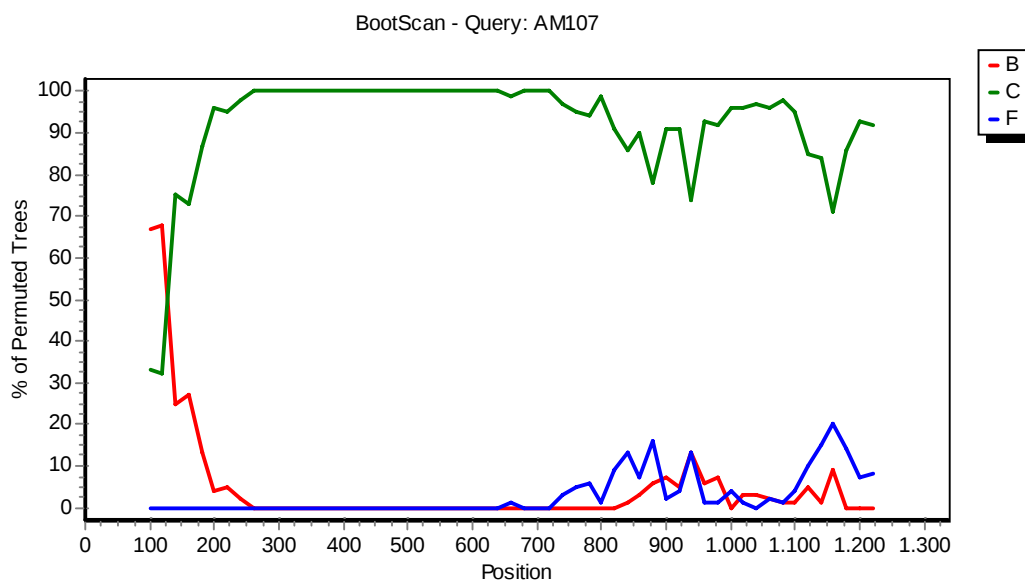


Gráfico 2: Análise por *Bootsanning* das sequências de nucleotídeos da região *pol* e *env* (isolado AM90). O eixo horizontal representa o número de nucleotídeos analisados e o eixo vertical representa a porcentagem de árvores permutadas que suportam um determinado subtipo.



Window: 200 bp, Step: 20 bp, GapStrip: On, Reps: 100, Kimura (2-parameter), T/t: 2,0, Neighbor-Joining

Gráfico 3: Análise por *Bootscreening* das seqüências de nucleotídeos das regiões *gag*, *pol* e *env* (isolado AM107). O eixo horizontal representa o número de nucleotídeos analisados e o eixo vertical representa a porcentagem de árvores permutadas que suportam um determinado subtipo.

Para observar a similaridade entre as seqüências pertencentes ao subtipo C encontradas neste trabalho e outras já descritas anteriormente, estas foram alinhadas juntamente com seis seqüências isoladas da região Sul do país (regiões *gag* e *env*) por Monteiro et al. (2007) e quatro seqüências de diferentes países utilizadas como protótipos (*gag*, *pol* e *env*). As percentagens de similaridade, calculadas por meio de uma matriz de identidade para cada região, estão demonstradas na Tabela 16. Os isolados de Manaus apresentam maior similaridade quando comparados com os isolados do Brasil em relação aos isolados dos demais países.

Tabela 16: Comparação das seqüências de nucleotídeos dos isolados AM090 e AM107 com isolados do sul do país (DQ70, DQ66, DQ63, DQ61, DQ57 E DQ56) e de diferentes origens geográficas (CBR92, CET86, CIN95 e CZA04).

	AM090		<i>gag</i>	AM107	
	<i>env</i>	<i>pol</i>		<i>env</i>	<i>pol</i>
DQ70	88,7	-	95,0	86,6	-
DQ66	91,3	-	95,0	88,0	-
DQ63	91,1	-	93,6	89,0	-
DQ61	88,3	-	93,8	87,2	-
DQ57	88,4	-	95,7	88,2	-
DQ56	87,9	-	94,0	86,4	-
CBR92	91,1	94,3	94,7	90,2	94,4
CET86	87,3	91,2	92,8	86,0	92,3
CIN95	88,7	92,9	91,4	87,0	94,0
CZA04	84,7	92,0	91,7	83,1	92,6

5. 9 Análise do recombinante B/F

Pelo método de *Bootscanning* também foi analisado o isolado recombinante B/F AM47. Foram concatenadas as seqüências das regiões *gag*, *pol* e *env* deste isolado, que foram alinhadas juntamente com as seqüências completas dos protótipos pertencentes aos outros subtipos. O Gráfico 4 demonstra que o isolado AM47 apresenta maior similaridade com os isolados do subtipo B nas regiões *gag* e *pol*, e maior similaridade com isolados do subtipo F na região *env*, apresentando ponto de recombinação entre as regiões *pol* e *env*.

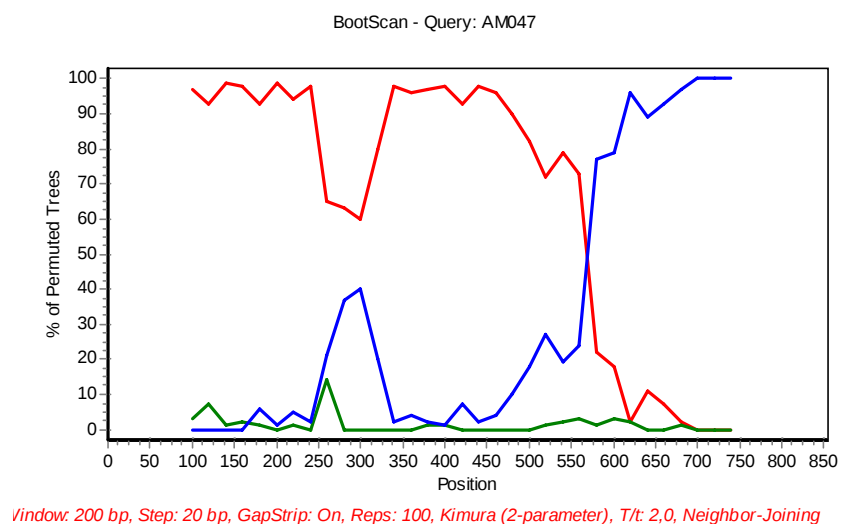


Gráfico 4: Análise por *Bootscanning* das seqüências de nucleotídeos das regiões *gag*, *pol* e *env* do (isolado AM47). O eixo horizontal representa o número de nucleotídeos analisados e o eixo vertical representa a porcentagem de árvores permutadas que suportam um determinado subtipo.

6 DISCUSSÃO

No Brasil, dados recentes sobre a prevalência de sorologia positiva para HIV entre doadores de sangue ainda são escassos, mas a partir dos casos notificados ao Ministério da Saúde e alguns estudos anteriormente publicados pode ser observada uma redução nos casos de contaminação por transfusão sanguínea na década de noventa (BRASIL, 2006).

Em nosso trabalho, a prevalência de doadores com triagem positiva para HIV-1 na população analisada foi de 0,08%. Gonçalves et al. (2006) relataram soroprevalência de 0,33 % entre doadores de sangue de Goiás. Em investigações realizadas em outras regiões do Brasil e do mundo tem sido encontrada uma prevalência em torno de 0,20% (CHANDER; PAHWA, 2003; GENDLER; PASCuccio, 2007; NETO et al, 2002).

A partir do banco de dados do HEMOAM, foi obtido um total de 121.468 doadores nos últimos seis anos (2000 a 2006). Desse total, 95 casos foram confirmados pelo *Western Blot*, o que representa uma soroprevalência de 0,07 % entre doadores de sangue. Este dado é concordante com os encontrados em nosso trabalho, no período de janeiro de 2006 a março de 2007, cuja prevalência foi de 0,08 % como citado anteriormente.

Entre os candidatos a doadores analisados, a maior frequência foi de indivíduos do sexo masculino (n=24/77,4%), assim como a faixa etária global do grupo de doadores, situada em torno de 32 anos de idade (19-61), seguindo a tendência observada no Brasil entre doadores em bancos de sangue (GONÇALVES et al., 2006; NETO et al, 2002). Em relação aos fatores de risco, múltiplos parceiros e cirurgia foram os mais frequentes, com porcentagens de 38,7% e 41,9% respectivamente.

A frequência de doadores de primeira vez verificada foi maior que a de doadores de repetição. Como tem sido observado por outros autores (GONÇALVES et al., 2006), isto

acontece porque as pessoas que doam sangue regularmente constituem um grupo de baixo risco de contaminação, visto que estas são avaliadas todas as vezes que vão ao banco de sangue. Os candidatos a doadores que obtiveram resultado positivo anteriormente são considerados inaptos para doar novamente. Além disso, sabe-se que algumas pessoas com alto risco de contaminação por HIV usam a doação de sangue como um meio para obter testagem para este vírus, o que contribui para a maior prevalência de soropositividade entre aqueles que doam sangue pela primeira vez.

Verificamos que entre os doadores analisados, dez doadores eram de repetição. A maioria destes (60%) soroconverteu em até 20 meses, como demonstrado na Tabela 12 do item 5.1 dos nossos resultados. Este fato nos leva a pensar que a utilização de metodologias com maior sensibilidade e/ou especificidade baseadas em biologia molecular poderia minimizar os riscos oferecidos por transfusão de sangue a partir da diminuição do período de janela imunológica, que se torna a principal fonte de contaminação por transfusão.

Considerando as amostras com padrão indeterminado para *Western Blot*, todas apresentaram reatividade para a p24. Fato este que nos chama atenção, uma vez que a presença de anticorpos contra esta proteína poderia ser indicativo de soroconversão. Desta forma, as amostras com padrão indeterminado para o *Western Blot* foram submetidas ao diagnóstico molecular por PCR para HIV-1 (região *env*) e todas mostraram resultados com padrão de amplificação negativo. Este resultado sugere que possa existir uma reatividade cruzada de anticorpos contra outras proteínas com a p24 e demonstra a importância do diagnóstico molecular para a elucidação de casos inconclusivos no teste confirmatório, considerando ainda que alguns indivíduos podem apresentar este padrão indeterminado por um longo período de tempo, sem evidências de infecção por HIV (FERREIRA; ÁVILA, 1996).

Vale a pena ressaltar que não é aconselhável se excluir totalmente a possibilidade de

um baixo grau de infecção nas amostras com resultados inconclusivos na sorologia e negativos para a PCR. Nesses casos, sugere-se o acompanhamento e repetição dos testes sorológicos e moleculares para a determinação com maior segurança da infecção entre estes doadores.

Todas as amostras positivas para o teste confirmatório foram submetidas à amplificação por *nested* PCR para as regiões *env*, *gag* e *pol*, utilizando-se os iniciadores descritos na Tabela 1 em Material e Métodos e utilizados em estudos anteriores (STEFANI et al., 2007). Para as três regiões analisadas, algumas amostras não apresentaram produto de amplificação. Entretanto, todas amplificaram para o gene da β -globina (controle endógeno).

Como relatado por alguns trabalhos (LAETHEM et al., 1998; LY et al., 2001; REZENDE et al., 2002), as amostras que não amplificaram podem sugerir a presença de linhagens virais divergentes ou baixo número de células que possuem o genoma proviral do HIV, representando um pequeno número de produto amplificado. Uma outra explicação seria a presença de mutações nas regiões onde se ligam os iniciadores, fato que poderia impedir a formação dos produtos de amplificação.

De acordo com Cunningham et al. (2003), uma das limitações da PCR na identificação do HIV é a variação do genoma, e o percentual de detecção do DNA-HIV pela PCR em indivíduos reativos pode variar sensivelmente dependendo dos iniciadores utilizados na reação. Isso nos leva a pensar que a aplicação da PCR deve sempre ser acompanhada da sorologia para uma melhor avaliação do diagnóstico para HIV.

Com o objetivo de caracterizar os subtipos e possíveis recombinantes circulantes na população estudada, escolheu-se amplificar as três regiões gênicas estruturais (*gag*, *pol* e *env*) recomendadas para estudos filogenéticos e que vem sendo utilizadas com sucesso para este fim (MONTEIRO et al., 2007).

O sequenciamento de uma única região viral não permite a detecção de recombinantes,

o que ressalta a importância da análise de outras regiões virais para melhorar a sensibilidade de detecção de potenciais mosaicos genômicos, considerando que alta frequência de recombinantes entre a população de indivíduos infectados por HIV no Brasil já foi descrita por vários pesquisadores (CABRAL et al., 2006; STEFANI et al., 2007).

Neste estudo, foi avaliada a frequência dos subtipos de 31 candidatos a doadores que retornaram ao HEMOAM. Do total de amostras analisadas, foram obtidas 26 seqüências para a região *gag*, 23 para *pol* e 28 para *env*. A partir da análise filogenética dessas seqüências foi encontrada predominância do subtipo B entre estes isolados, semelhante ao encontrado em estudos prévios realizados em outros Estados brasileiros.

Em Brasília, Cerqueira et al. (2004) encontraram 96% de isolados pertencentes ao subtipo B e 4% pertencentes ao subtipo F, por meio da análise de seqüências da protease e transcriptase reversa. Em amostras coletadas nos Estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, a prevalência dos subtipos encontrados por Stefani et al. (2007) foi de 69.9% B, 1.7% F, 1% C e 14.5% recombinantes (B/F, B/D, B/C, e C/D) com base na análise das regiões *gag* e *env*. Em estudos conduzidos na região Sudeste, Cabral et al. (2006) demonstraram porcentagens de 75.2% B, 9.3% F, 3.1% C e 12.4% B/F no Espírito Santo, analisando as regiões *gag* e *env*. Proietti et al. (1999) encontraram 90% B e 10 % F em Minas Gerais, baseando-se somente na análise da região *env*. No Estado do Ceará, Gadelha et al. (2003) observou 81,2 %B, 2,7 % F e BF.

A cidade de Manaus é situada no Amazonas, Estado que faz fronteira com Venezuela, Colômbia e Peru. Nesses países, também foi observada a predominância do subtipo B entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 (BOUCHARD et al., 2007; HIERHOLZER et al., 2002; SANCHEZ et al., 2006).

Vicente et al. (2000), em estudo conduzido com indivíduos infectados por HIV-1 residentes no Amazonas, observaram por meio da análise das regiões *gag*, *pol* e *env*,

proporção semelhante entre os subtipos B e F (51,6% e 48,4% respectivamente). Estes resultados diferem dos encontrados em nosso trabalho e nos estudos realizados em outras regiões do país.

Dentre os isolados pertencentes ao subtipo B, pode-se observar variações intra-subtipos genéticas e antigênicas da alça V3 a partir da dedução das seqüências de aminoácidos de 19 amostras. O tetrapeptídio mais prevalente foi o motivo GPGR (68,4%), comum nas linhagens norte-americanas e européias, seguido pelo variante brasileiro B'' GWGR (15,8%). O variante GWGR já havia sido relatado entre isolados do Amazonas por Vicente et al. (2000). A prevalência da variante B'' encontrada em nosso estudo difere das verificadas em pesquisas anteriores, que varia de 28% a 57% dependendo da origem geográfica dos isolados (CABRAL et al., 2006; GADELHA et al., 2003; MORGADO et al., 1998).

Também foram encontradas as seqüências GPGK, GFGR e AWGR. Em estudos conduzidos na região Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais), Bongertz et al. (2000) encontraram uma prevalência de 10,5 % para cada uma das variantes GFGR e GPGS. Covas et al. (1998) também observaram a ocorrência dos motivos GFGR, GLGR E GPGK em isolados de São Paulo. Não existem muitos estudos sobre as implicações dessas variantes sobre a epidemia do HIV/Aids no Brasil. Portanto, mais estudos são necessários para melhor entendimento do papel da heterogeneidade da alça V3 encontrado no país.

Como descrito anteriormente, vários trabalhos demonstram predominância do subtipo B, seguida do subtipo F, e casos esporádicos de subtipos C, e D no Brasil. Na região Sul, entretanto, o subtipo C é altamente freqüente. Em estudo conduzido em Porto Alegre (SOARES et al., 2003) foi relatada proporção semelhante entre os subtipos C (40%) e B (45 %), e 3% de recombinantes (B/F e B/D). Desta forma, observa-se um complexo padrão de distribuição dos subtipos nas diferentes regiões geográficas do Brasil, com uma expansão do

subtipo C no sentido Sul-Norte do país.

Entre os isolados deste trabalho, um foi identificado como recombinante BF ($B_{gag, pol}/F_{env}$). A presença do subtipo F já foi observada na Colômbia (EYZAGUIRRE et al., 2006) e o recombinante BF já foi descrito na Venezuela (BOUCHARD et al., 2007). No Brasil também já foi observada a presença desse subtipo e recombinante BF, inclusive na região Norte (VICENTE et al., 2002). Na análise feita pelo método *bootscanning*, pode ser melhor observado que este isolado apresenta maior similaridade com os isolados do subtipo B nas regiões *gag* e *pol*, e maior similaridade com isolados do subtipo F na região *env*, coma presença de um ponto de recombinação. Na análise filogenética para a região *env*, este isolado ficou agrupado no mesmo cluster do recombinante BF isolado na Argentina e do subtipo F1 isolado no Brasil.

Uma das amostras foi identificada como pertencente ao subtipo F para a região *env*, não sendo possível a análise filogenética para as outras regiões. Desta forma, não se pode afirmar que este isolado trata-se de um F puro ou de um recombinante. Entretanto, este também ficou agrupado no mesmo cluster que o recombinante BF isolado na Argentina, do subtipo F1 isolado no Brasil e do recombinante isolado neste trabalho.

Em nosso trabalho, dois isolados foram identificados como pertencentes ao subtipo C. A presença desse subtipo na região Norte ainda não foi relatada na literatura. Considerando o estudo realizado no Amazonas (VICENTE et al., 2000) com amostras coletadas entre novembro de 1996 a março de 1997, pode-se sugerir que o subtipo C foi introduzido na região recentemente e posteriormente aos subtipos B e F.

O primeiro subtipo C no Brasil foi descrito no ano de 1990, antes disso apenas o subtipo B havia sido identificado (SOARES et al., 2003). Os indivíduos infectados pelo subtipo C analisados neste trabalho são doadores de primeira vez, o que significa que fizeram apenas uma tentativa de doação no HEMOAM. Dessa forma, não é possível estimar o período

de soroconversão destes candidatos a doadores. O que se pode afirmar é que um dos doadores está infectado desde o ano de 2004 e o outro desde o ano de 2006 (data da tentativa de doação). Estes indivíduos não estão entre os grupos de fatores de risco mais frequentes encontrados neste trabalho, que foram comportamento sexual de risco (múltiplos parceiros) e realização de cirurgia.

O subtipo C é atualmente o subtipo mais prevalente do mundo, responsável por mais da metade das infecções por HIV. É responsável pela maioria das infecções em regiões como África do Sul, Israel, Índia e China. Observa-se um aumento no número de indivíduos infectados por esse subtipo nos países mais desenvolvidos. Em alguns países, como no Brasil, esse subtipo é causador de infecções locais, sendo o mais prevalente na região sul do país, como citado anteriormente. A presença desse subtipo em Estados como Rio de Janeiro e São Paulo, sugere o aumento e/ou disseminação desse subtipo em outras regiões brasileiras (SOARES et al., 2003). Nossos resultados confirmam o crescimento do subtipo C em outras regiões, assim como a introdução deste subtipo na região Norte.

Na Venezuela, já foi descrita a introdução do subtipo C e recombinante BC. O indivíduo com o subtipo C foi infectado na África do Sul e o com recombinante BC possuía um comportamento sexual de risco e histórico de viagens para Portugal e África do Sul (CASTRO et al., 2003 a; CASTRO et al., 2005 b).

O Amazonas abriga a Zona Franca de Manaus, que é responsável por uma alta circulação de pessoas envolvidas com mercado de exportação e importação. A BR-174 interliga o Amazonas a Venezuela, a partir de Manaus. O Porto de Manaus está localizado na área central da cidade e atende toda a região Norte, além de Estados como Mato Grosso. Os principais mercados internacionais são China, Coréia, Japão, Estados Unidos, Argentina, Itália e Espanha. Esses fatores contribuem para a grande circulação de pessoas no Amazonas de diferentes localidades geográficas, o que nos faz pensar que a introdução de uma linhagem

viral na região possa ter diferentes origens.

Entretanto, o grupo monofilético formado pelas seqüências do subtipo C para as três regiões gênicas analisadas sugere introdução recente desse subtipo no Brasil por uma ou por um grupo de linhagens similares. Essa hipótese tem suporte nas menores distâncias genéticas entre as seqüências brasileiras quando comparadas com as de outros países, a exemplo da África onde a epidemia de aids é causada por múltiplas introduções virais. Como observado por Monteiro et al. (2007), as seqüências obtidas nesse trabalho também apresentaram similaridade maior com o isolado da Índia, onde é sugerida uma introdução recente do subtipo C. Além disso, essas seqüências também apresentaram maior similaridade com seqüências isoladas na região sul do país, como demonstrado na Tabela 16 no item 5.8 dos resultados.

Esses dados nos levam a sugerir que a introdução do subtipo C na região Norte possa ter ocorrido via Sul do país. Entretanto, os dados epidemiológicos dos indivíduos infectados com o subtipo C analisados neste trabalho não nos dão informações a respeito de possíveis viagens ou contatos com pessoas oriundas a região Sul do Brasil.

Nossos resultados contribuem para uma melhor compreensão das características e epidemiologia dos isolados do HIV-1, sendo necessários maiores estudos para a definição do padrão de transmissão das cepas circulantes no Brasil.

7 CONCLUSÃO

7.1 Este trabalho permitiu a determinação da soroprevalência para o HIV-1 na população de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM);

7.2 A metodologia de *nested* PCR demonstrou ser uma ferramenta útil para a detecção do DNA proviral. A maioria das amostras apresentou padrão de amplificação positivo para as três regiões virais. Entretanto, nossos resultados demonstram a importância da utilização de mais de uma região viral para este fim.

7.3 A partir do sequenciamento e análise filogenética, pode-se observar entre os isolados deste trabalho a presença do subtipo B do HIV-1 mais prevalente, seguido dos subtipos C, F e forma recombinante BF.

7.4 A análise da variabilidade intra-subtipo, nos isolados do subtipo B revelou a predominância do motivo GPGR, comum nas linhagens norte-americanas e européias, seguida pelo variante brasileiro B'' GWGR. Outras variantes descritas anteriormente na literatura também foram encontrados em nosso estudo.

7.5 Este trabalho permitiu a identificação do subtipo F e de um recombinante BF ($B_{gag, pol}/F_{env}$). A presença de um recombinante em nossos resultados ressalta a importância do sequenciamento de mais de uma região viral para a detecção de potenciais mosaicos genômicos.

7.6 A prevalência dos subtipos encontrados neste trabalho mostrou a introdução do subtipo

viral C na região Norte, ainda não relatada na literatura. Nossos resultados contribuem para uma melhor compreensão das características e epidemiologia dos isolados do HIV-1 e confirmam o aumento da disseminação do subtipo C em outras regiões do Brasil, como vem sendo observado em outras pesquisas.

7.7 A maior similaridade das seqüências do subtipo C isoladas neste trabalho com as isoladas no Sul do Brasil, nos leva a sugerir uma introdução do subtipo C na região Norte via Sul do país.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia Celular e Molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

APRILI, G. et al. Detection of an early HIV-1 infection by HIV RNA testing in an Italian blood donor during the preseroconversion window period. *Transfusion*, v.43, n.7, p.848-52, jul. 2003.

BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, n. 4599, p.868-71, mai. 1983.

BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 7, p. 263-270, 2007.

BONGERTZ, V. et al. HIV-1 Diversity in Brazil, genetic, biologic and immunologic characterization of HIV – 1 strains in three potencial HIV vaccine evaluation sites. *JAIDS*, v. 23, p. 184-193, 2000.

BOUCHARD, M. et al. HIV type 1 drug resistance among naïve patients from Venezuela. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v. 23, n. 3, p. 482-485, mar. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Programa Nacional de DST e AIDS. Boletim Epidemiológico - AIDS e DST. Ano III- nº-1º a 26º de 2006-semanas epidemiológicas. Brasília, 2006. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/> >. Acesso em: 10 novembro 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de Situação. Amazonas. Brasília, 2005. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/am1.pdf> >. Acesso em: 14 julho 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Governo do Estado do Amazonas. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenação Estadual do Programa DST/Aids da Fundação de Medicina Tropical do Amazoans. Boletim Epidemiológico da Aids no Amazonas. Ano II- nº 1. Brasília, 2006. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/> >. Acesso em: 14 setembro 2007.

CABRAL, V.P. et al. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients of Espirito Santo, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 881-885, dec. 2006.

CASTRO, E. et al. Molecular Epidemiology of HIV - 1 in Venezuela: High prevalence of subtype B and identification of B/F recombinant infection. JAIDS, v.32, p. 338-334, 2003.

CASTRO, E. et al. Trends of HIV-1 molecular epidemiology in Venezuela: introduction of subtype C and identification of a novel B/C mosaic genome. J Clin. Virol., v. 32, n. 3, p. 257-258, mar. 2005.

CERQUEIRA, DM. et al. Antiretroviral Resistance and Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from the Federal District, Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 877-882, dez. 2004.

CHANDER, A.; PAHWA, V.K. Status of infectious disease markers among blood donors in a teaching hospital, Bhairahawa, western Nepal. J. Commun. Dis., v.35, n.3, p.188-197, 2003.

COFFIN, J.M. et al. What to call the AIDS virus. Nature, v. 10, 1986.

COUTO-FERNANDEZ, J.C. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v.100, n.1, p.73-78, fev. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php/>>. Acesso em: 27 julho 2005.

COVAS et al. High frequency of the GWG (Pro trp) envelop variable of HIV – 1 in southeast Brazil. J. Acquire immune defic. Syndr hum retrovirol. v. 19, p. 74-79, 1998.

CUNNINGHAM, et al. False negative HIV -1 proviral DNA polimerase chain reaction in a patient with primary infection acquired in Thailand. J. of clin.virol. Austrália, v. 26, p. 163-169, 2003.

DIMMOCK, N.J.; PRIMROSE, S.B. Introduction to Modern Virology. Basic Microbiology Series. 4. ed. Blackwell Science ,1994. 288-310 p.

EYZAGUIRRE, L. et al. First Case of HIV Type 1 subtype F among men who have sex with men in Colombia. AIDS Res Hum Retroviruses, v. 22, n. 8, p. 808-811, ago. 2006.

FONTAINE, E. et al. Evaluation of two commercial kits for the detection of genotypic drug resistance on a panel of HIV type 1 subtypes A through J. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.28, n.3, p.254-8, 1 nov. 2001. Disponível em: < <http://www.jaids.org/pt/re/jaids/> >. Acesso em: 17 agosto 2005.

GADELHA, S. R. et al. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-1 in the State of Ceará, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.98, n.4, p.461-464, jun. 2003. Disponível em: < <http://www.scielo.br/scielo.php/> >. Acesso em: 12 julho 2005.

GENDLER, S. A.; PASCUCCHIO, M. S. Routine HIV Screening Among Blood Donors in Buenos Aires (Argentina): Results from Six Years' Experience and Report of a Single Window-period donation. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v. 25, n. 2, p. 82-90, 2007.

GONÇALVES, K. I. et al. Seroprevalence of HIV-1/2 among blood donors of Goiania (Goias state, Brazil). *RBAC*, v. 38, n. 4, p.263-266, 2006.

GOTLIEB, M.S. et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosa candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New Engl J Med*, v.305, n.24, p.1425-1431, 1981.

GUIMARAES, M.L; MOREIRA, A.S; MORGADO, M.G. Polymorphism of the Human Immunodeficiency Virus Types 1 in the Brazil: Genetic Characterization of the nef Gene and Implications for Vaccine Design. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 97, n. 4, p. 523-526, jun. 2002.

HANNA, G. J. et al. Comparison of Sequencing by Hybridization and Cycle Sequencing for Genotyping of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Clin Microbiol*, v.38, n.7, p.2715–2721, jul. 2000. Disponível em: < <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi/> >. Acesso em: 21 maio 2005.

HIERHOLZER, J. et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguai and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 18, n. 18, p. 1339-1350, dez. 2002.

JAGODZINSKI, L.L. et al. Performance Characteristics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Genotyping Systems in Sequence-Based Analysis of Subtypes Other than HIV-1 Subtype B. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.3, p. 998–1003, mar. 2003. Disponível em: < <http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi/> >. Acesso em: 14 agosto 2005.

JANEWAY, C.A. et al. *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 5. ed. Porto

Alegre: Armed, 2002. 451-460 p.

KANDATHIL, A. J. et al. Molecular epidemiology of HIV. Indian J Med Res, v.121, n.4, p.333-44, abr. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi/>>. Acesso em: 13 julho 2005.

KOCH, N. et al. Comparison of two commercial assays for the detection of insertion mutations of HIV-1 reverse transcriptase. Journal of Clinical Virology, v. 21, n.2, p.153-162, mai. 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/>>. Acesso em: 17 agosto 2005.

KORNMAN, M.T. et al. Nucleic acid amplification testing: the new infectious disease testing method for donor blood. Cancer Control, v.6, n.5, p.504-508, out. 1999. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/417739>>. Acesso em: 29 junho 2005.

LAETHEM et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus by a chain reaction assay evaluated in patients harbouring strains of diverse geographical origin. J. of virol. Methods, Belgica, v. 70, p. 153-166, 1998.

LEITNER, T. et al. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005. Disponível em: <[http://www.hiv/lan.gov/content/hiv-db/REVIEWS/RefSeqs 2005/ RefSeqs05. html](http://www.hiv/lan.gov/content/hiv-db/REVIEWS/RefSeqs%2005/RefSeqs05.html)>. Acesso em: abril 2006.

LEVI, J.E. et al. Replacement of HIV p24 Ag test by a multiplex RT-PCR method for primary screening of blood donors. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, v.49, n.3, p.171-176, mai. 2007.

LY, T.D.; LAPERCHE, S.; COUROUCÉ, A. M. Early detection of human immunodeficiency virus infection using third and fourth-generation screening assays. Eur.J.Clin.Microbiol. Infect. Dis. França, v. 20, p. 104-110, 2001.

MACHADO, A.A.; COSTA, J.C. Métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Medicina, Ribeirão Preto, v.32, p.138-146, abr./jun. 1999. Disponível em: <[http://www.fmrp.usp.br/revista/1999/vol32n2/metodos_laboratoriais _diagnostico](http://www.fmrp.usp.br/revista/1999/vol32n2/metodos_laboratoriais_diagnostico)>. Acesso em: 01 junho 2005.

MAES, B. et al. Performance of ViroSeq HIV-1 Genotyping System in routine practice at a Belgian clinical laboratory. Journal of Virological Methods, v.119, p.45-49, jul. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/>>. Acesso em: 17 agosto 2005.

MARTINEZ, A.M.B, et al. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 5, n. 5, p. 471-476, set/out 2002.

MCCUTCHAN, F. E. Global Epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology*, v.78, 2006.

MICELI, M. et al. Residual risk of HIV-1 transmission: the case of soroconverter. *Clin lab*, v.48, p.283-286, 2002.

MONTEIRO, J. P. et al. Genetic and Biologic Characterization of HIV Type 1 Subtype C Isolates from South Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses*, v. 23, n.1, p. 135-143, 2007.

MORGADO, M. G. et al. Molecular Epidemiology of HIV in Brazil: Polymorphism of the Antigenically Distinct HIV-1 B Subtype Strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 93, n. 3, p. 383-386, mai/jun. de 1998.

MORGADO, M.G., GUIMARAES, M.L.; GALVAO-CASTRO, B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, n.2, p.143-150, mar. 2002. Disponível em: < <http://www.scielo.br/scielo.php/>>. Acesso em: 23 maio 2005.

NAJIOULLAH, F. et al. Failure and success of HIV tests for the prevention of HIV-1 transmission by blood and tissue donations. *J Med Virol*, v.73. n3, p.347-349, jul. 2004.

NETO, J. L. A. et al. HIV Prevalence Among Blood Donors in a Blood Bank in Curitiba (Brazil). *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. 15-21, 2002.

PEDUZZI, C. et al. Performance of an in-house genotypic antiretroviral resistance assay in patients pretreated with multiple human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase inhibitors. *Journal of Clinical Virology*, v.25, n.1, p.57-62, jul. 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/> >. Acesso em: 17 agosto 2005.

PLANTIER, J. et al. Rapid Discrimination between Human Immunodeficiency Virus Type 2 Groups A and B by Real-Time PCR. *Journal of clinical microbiology*, v.42, n.12, p.5866-5870, dez. 2004. Disponível em: < <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/42/12/5866> >. Acesso em: 20 julho 2005.

PROIETTI, A. B. F. C. et al. Genetic Variability of HIV-1 Isolates from Minas Gerais, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 141-143, 1999.

REZENDE et al. Sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase para HIV em relação à técnica de ensaio imunoenzimático. Res. Bras. Hematol. Hemoter. São José do Rio Preto, v.24, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., v.4, n.4, p.406-425, jul 1987. Disponível em: <<http://mbe.oxfordjournals.org/cgi/reprint/4/4/406>>. Acesso em: 11 novembro 2005.

SANABANI, S. et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. Infection, Genetics and Evolution, v. 6, p. 368-377, 2006.

SANCHEZ, G.I. et al. Short Report: Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency virus-infected individuals in Medellin, Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 74, n. 4, p. 674-677, 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nati Acad Sci, v.74, n.12, p.5463-5467, dez. 1977. Disponível em: < <http://http://www.pubmedcentral.gov/articlerender.fcgi?tool=pubmed&pubmedid=271968>>. Acesso em: 3 maio 2005.

SCURACCHIO, P. S. P. et al. Detection of HIV-1 infection in blood donors during the immunological window period using the nucleic acid-amplification technology. Transfusion Medicine, v. 17, p. 200-204, 2007.

FERREIRA, W. A.; ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 92-102 p.

SOARES, E.A.J.M. et al. Epidemiologic and Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Southern Brazil. J. Acquir Immune Defic Syndr., v. 34, n. 5, dez. 2003.

STEFANI, M. M. A. et al. Molecular Screening Shows Extensive HIV-1 Genetic Diversity in Central West Brazil. Journal of Clinical Virology, v. 39, p. 205-209, 2007.

STRAMER, S.L. Viral diagnostics in the arena of blood donor screening. Vox Sang, v.87, p.180-183, jul. 2004.

STURMER, M. et al. Evaluation of the LiPA HIV-1 RT assay version 1: comparison of sequence and hybridization based genotyping systems. Journal of Clinical Virology, v. 25,

p.S65-/S72, dez. 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/>>. Acesso em: 17 agosto 2005.

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

TURNER, B.G.; SUMMERS, M.F. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*, v.285, n.1, p.1-32, jan. 1999.

UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update: December 2006. Disponível em: <<http://www.unaids.org/epi/2006/>>. Acesso em: 17 setembro 2007.

VICENTE, A. C. et al. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J AIDS*, v.23, n.4, p.327-331, abr. 2000.

WEI, M. et al. Simple Subtyping Assay for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes B, C, CRF01-AE, CRF07-BC, and CRF08-BC. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 4261–4267, set. 2004. Disponível em: < <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender>>. Acesso em: 24 agosto 2005.

YAGYU, F. et al. Determination of HIV-1 subtypes (A-D, F, G, CRF01_AE) by PCR in the transmembrane region (gp41) with novel primers. *J Med Virol*, v.76, n.1, p.16-23, mai. 2005.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TÍTULO DO ESTUDO: Caracterização dos genótipos do HIV em doadores de sangue soropositivos da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas.

JUSTIFICATIVA/OBJETIVOS: Este estudo irá contribuir com informações sobre os tipos do vírus HIV envolvidos na infecção de doadores de sangue do Estado do Amazonas, promovendo um melhor entendimento sobre a doença.

PROCEDIMENTOS: Para este estudo será coletada amostra de 10 mL de sangue. Serão feitos testes para verificar a presença do vírus e a confirmação mais segura do diagnóstico da infecção. Alguns destes testes serão realizados na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM em Manaus e outros na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

RISCOS E DESCONFORTOS: Não existem riscos associados à participação deste estudo. O único desconforto é o da picada da agulha.

BENEFÍCIOS: A participação neste estudo não traz nenhum benefício direto e imediato para o senhor(a), mas ajudará no conhecimento e na prevenção do HIV.

ACOMPANHAMENTO ASSISTENCIAL: O senhor(a) terá, sempre que necessário, orientação, esclarecimentos de dúvidas, acompanhamento clínico e laboratorial pela equipe médica da FHEMOAM, no que diz respeito ao HIV, podendo entrar em contato com as doutoras Kátia Torres e Adriana Malheiro (HEMOAM: Tel: 92-655-0111/ 92-656-0113). Também serão feitos pela equipe médica do HEMOAM os encaminhamentos necessários de acordo com o local onde o doador residir.

VOLUNTARIEDADE: A sua participação neste estudo é voluntária, podendo ser retirada a qualquer momento, sem que isso atrapalhe o seu atendimento no HEMOAM.

CONFIDENCIALIDADE, PRIVACIDADE E ANONIMATO: Os seus dados pessoais referentes à participação neste estudo permanecerão confidenciais, não sendo divulgados de forma a declarar a sua identidade.

USO DE MATERIAL BIOLÓGICO COLETADO: O material biológico coletado (sangue) será utilizado somente para o que se propõe neste estudo e solicitamos a sua autorização para armazenamento de material para estudos posteriores. Garantimos que toda nova pesquisa a ser realizada utilizando as amostras armazenadas será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da FHEMOAM e, se for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP.

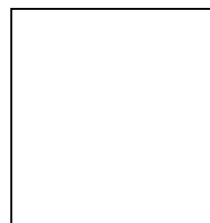
O Sr.(a) autoriza que o seu sangue seja guardado para pesquisas futuras das características do vírus e de como o corpo convive com a infecção? () Sim ou () Não

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo em participar do estudo em questão.

(Assinatura do participante)

(Assinatura do pesquisador)



(Impressão dactiloscópica)

Manaus, ____/____/____

APÊNDICE B – Questionário Epidemiológico

Título do projeto: Caracterização dos genótipos do HIV em doadores de sangue soropositivos
da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas

Código: _____

Dados pessoais/ demográficos:

Número da bolsa: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: F ☐ M ☐

Data da doação: ____/____/____

Local da doação: ☐ HEMOAM ☐ Maternidade Ana Braga ☐ Coleta Externa (Manaus)

Dados epidemiológicos:

É a primeira doação? ☐ Sim ☐ Não

Quando foi a última doação?(informar dados das doações anteriores) _____

Estado civil: ☐ Casado ☐ Solteiro ☐ Viúvo ☐ Divorciado ☐ Outros

Múltiplos parceiros? ☐ Sim ☐ Não

Profissão : _____

Já trabalhou em: ☐ Hospitais ☐ Clínicas médicas ☐ Unidades de diálise ☐ Laboratório
☐ Consultório dentário ☐ Afins

Já precisou receber transfusão de sangue? ☐ Não ☐ Sim

Quando? _____ Por qual motivo?

Já teve hepatite? ☐ Sim ☐ Não

Há quanto tempo? _____

Faz ou fez uso de drogas injetáveis/outras? ☐ Sim ☐ Não

Já fez cirurgia? ☐ Sim ☐ Não Quando? _____

Qual? _____

Possui tatuagem ou piercing? ☐ Sim ☐ Não

Utiliza terapia por acupuntura? ☐ Sim ☐ Não

Faz uso de bebidas alcoólicas? ☐ Sim ☐ Não

Comentários: _____

Responsável pelo preenchimento: _____

Data: ____/____/____