BEATRIZ APARECIDA PASSOS BISMARA

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIRETROVIRAIS EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1) VIA PERINATAL

CAMPINAS

2006

BEATRIZ APARECIDA PASSOS BISMARA

PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA O ESTUDO DA RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIRETROVIRAIS EM CRIANÇAS INFECTADAS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 (HIV-1) VIA PERINATAL

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

ORIENTADORA: *Prof. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa*

CO-ORIENTADORA: *Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela*

CAMPINAS

2006

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família, pelo carinho, amor e apoio que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal, e ao meu namorado, pela sua paciência durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pela sua presença e força em minha vida.

Á prof. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela orientação, apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e principalmente pela confiança depositada em mim.

Á Prof. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela pelo seu exemplo profissional e apoio dado para a realização deste trabalho.

Agradeço de forma especial as minhas amigas Dulcinéia Martins Albuquerque e Paula Durante Andrade, pelos ensinamentos sobre a técnica, orientação e sincera amizade.

Agradeço a minha amiga Cristiane Oliveira pela paciência, amizade e por todos esses anos em que convivemos juntas.

Agradeço as minhas amigas de laboratório: Ana Carolina Guardia, Ana Maria Sampaio, Anali Galluce Torina, Andréia Gusmão Cunha, Fernanda Aparecida Costa, Gláucia Marcon, Keila Biffi, Rosana Mara Molina Marçal, Sheila Kallas, Tatiane Pedroso Kitamura, pela convivência e grande amizade.

Agradeço as minhas amigas Daniela, Roseneide, Camila, pela grande amizade e conselhos.

Agradeço ao Thiago e ao Tarcísio, pela ajuda com a Bioinformática.

Agradeço aos meus vizinhos de laboratórios: Aglecio, Alessandra, Angélica, Arlete, Audrey, Breno, Conceição, Éster e Gabriela.

Agradeço ao Vanderley, por sua ajuda.

Aos funcionários do SAME, pelo apoio na consulta de prontuários hospitalares.

Aos funcionários da coleta, pela coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

PÁG.

RESUMO..... *xxxv*

ABSTRACT..... *xxxix*

1- INTRODUÇÃO..... 43

1- Histórico..... 45

1.1- A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)..... 45

1.2- AIDS no Brasil..... 45

1.3- Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas..... 47

1.4- Taxonomia Viral..... 47

1.5- Estrutura Viral..... 47

1.6- Genoma do Vírus HIV-1..... 50

1.6.1- Genes Estruturais..... 50

1.6.2- Genes Regulatórios..... 52

1.7- Biossíntese Viral..... 53

1.7.1- Adsorção e Fusão..... 56

1.7.2- Desnudamento..... 56

1.7.3- Transcrição Reversa..... 57

1.7.4- Integração..... 57

1.7.5- Expressão Gênica..... 58

1.7.6- Empacotamento e Brotamento..... 58

1.7.7- Maturação..... 58

1.8- Manifestações Clínicas..... 59

1.9- Diagnóstico Laboratorial..... 60

1.9.1- Testes para a detecção de anticorpos..... 62

1.9.1.1- Teste de Elisa..... 62

1.9.1.2- Western Blot..... 63

1.9.1.3- Imunofluorescência Indireta..... 63

1.9.1.4- Raioimunoprecipitação..... 64

1.9.1.5- Outros Testes..... 64

1.9.2- Teste de Detecção do antígeno Viral..... 64

1.9.2.1- Pesquisa de antígeno P24..... 64

1.9.2.2- Técnica de Cultura Viral..... 65

1.9.2.3- Detecção do Genoma..... 65

1.9.2.4- Fenotipagem Viral..... 67

1.9.2.5- Genotipagem Viral..... 68

2- Antiretrovirais..... 70

2.1- Resistência a drogas antiretrovirais..... 71

2- OBJETIVOS..... 77

3- CASUÍSTICAS E MÉTODOS..... 81

3.1- Seleção de População de Estudo..... 83

3.2- Metodologia Utilizada..... 83

3.3- Extração de DNA periférico..... 83

3.3.1- Preparação das Amostras..... 83

3.3.2- Lise de Hemácias..... 83

3.3.3- Lise de Leucócitos..... 84

3.3.4- Precipitação de DNA..... 84

3.3.5- Purificação do DNA com fenol/ clorofórmio..... 84

3.4- Amplificação gênica pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... 85

3.4.1- Detecção da Amplificação Gênica da Região Transcriptase Reversa e Protease pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... 85

3.5- Purificação dos Produtos de PCR..... 86

3.6- Seqüenciamento..... 87

3.7- Purificação para o Seqüenciamento..... 88

3.8- Amplificação Gênica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)..... 89

3.8.1- Detecção do Gene da ß-globina..... 89

3.9- Normas utilizadas para evitar contaminação nas amostras..... 90

4- RESULTADOS..... 91

4.1- Resistência a drogas antiretrovirais..... 105

5- DISCUSSÃO..... 123

6- CONCLUSÃO..... 131

7- ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 135

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 139

9- ANEXOS..... 163

A	Alanina
ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APV	Amprenavir
AZT	Zidovudina
C	Cisteína
cDNA	DNA complementar
CMV	Citomegalovírus
CRF	Formas recombinates circulantes
D	Ácido aspártico
ddc	Zalcitabina
ddI	Didanosina
dH2O	Água destilada, deionizada e estéril
DLV	Delavirdina
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
DNTP	Desoxinucleotídeos trifosfato
D4T	Estavudina
E	Ácido glutâmico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFV	Efavirenz
F	Fenilalanina
G	Glicina
Gp	Glicoproteína
H	Histidina
HAART	Terapia Antiretroviral Altamente Ativa

HCL	Ácido Clorídrico
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	Herpes Simplex
I	Isoleucina
IC50%	Concentração necessária para inibir o crescimento viral em mais de 50% em cultura.
IC90%	Concentração necessária para inibir o crescimento viral em mais de 90% em cultura.
IDV	Indinavir
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
INNTRs	Inibidores análogos não-nucleosídeos da transcriptase reversa
INTRs	Inibidores análogos nucleosídeos da transcriptase reversa
K	Lisina
KCL	Cloreto de potássio
L	Leucina
LIP	Pneumonia Intersticial Linfocítica
LPV	Lopinavir
M	Metionina
M	Molar
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
N	Asparagina
NaCl	Cloreto de sódio
NFV	Nelfinavir

NVP	Nevirapina
P	Prolina
PIs	Inibidores da protease
Pb	Pares de bases
PH	Potencial hidrogeniônico
PR	Protease
P24	*Proteína de peso molecular de 24 kilodaltons*
Q	Glutamina
R	Arginina
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcriptase reversa
RTV	Ritonavir
S	Serina
SDS	Lauril Sulfato de Sódio
SQV	Saquinavir
T	Treonina
TEB	Tampão de tris (hidrox44imetil) aminometano, EDTA e ácido bórico
3TC	*Lamivudina*
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
V	Valina
W	Triptofano
Y	Tirosina

PÁG.

Tabela 1- Seqüência dos "primers" utilizados para a amplificação..... 86

Tabela 2- Seqüência dos "primers" utilizados para o seqüenciamento..... 87

Tabela 3- Seqüência dos "primers" utilizados para a reação de ß globina..... 89

Tabela 4- Características dos pacientes..... 93

Tabela 5- Classificação dos pacientes..... 94

Tabela 6- Principais Manifestações Clínicas..... 94

Tabela 7- Valores de Carga Viral..... 95

Tabela 8- Valores de Linfócitos CD4+/ CD8/ Relação entre eles..... 97

Tabela 9- Tabela de Subtipagem..... 102

Tabela 10- Principais mutações apresentadas referentes aos inibidores da Transcriptase Reversa..... 111

Tabela 11- Principais mutações apresentadas referentes aos inibidores da Protease..... 112

Tabela 12- Tabela de drogas antiretrovirais utilizadas para cada paciente..... 115

Tabela 13- Tabela com as mutações encontradas no gene da transcriptase reversa..... 117

Tabela 14- Tabela com as mutações encontradas no gene da Protease..... 119

PÁG.

Figura 1- Estrutura do HIV-1..... 49

Figura 2- Organização Genômica do HIV-1..... 50

Figura 3- Partículas Virais..... 53

Figura 4- Macrófagos..... 54

Figura 5- Anticorpos..... 54

Figura 6- Células Natural Killer..... 55

Figura 7- Receptores CD4+..... 55

Figura 8- Liberação das partículas virais no meio extracelular..... 56

Figura 9- Fita de RNA sendo transcrita em DNA..... 57

Figura 10- Destruição dos linfócitos..... 59

Figura 11- Reação em Cadeia da Polimerase..... 67

Figura 12- Foto da Amplificação das amostras pré-purificadas..... 99

Figura 13- Foto da Amplificação pós-purificação..... 100

Figura 14- Cromatografia realizada pelo seqüenciador automático..... 105

Figura 15- Cromatografia representando o seqüenciamento automatizado para a região da Transcriptase reversa com a troca do aminoácido metionina para leucina..... 105

Figura 16- Cromatografia do seqüenciamento do gene da Transcriptase Reversa de paciente sem alteração da proteína formada no códon 184..... 106

Figura 17- Cromatografia do seqüenciamento do gene da Transcriptase Reversa de paciente com alteração da proteína formada no códon 184 havendo mudança do aminoácido de metionina para valina... 106

Figura 18- Cromatografia representando o seqüenciamento automatizado para a região da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Amostra de paciente sem mutação no códon 215..... 107

Figura 19- Cromatografia representando o seqüenciamento automatizado para a região da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Amostra de paciente sem mutação no códon 215..... 107

Figura 20- Cromatografia do seqüenciamento de paciente com a mutação no códon 215 com mudança do aminoácido de triptofano para tirosina, conferindo resistência ao gene da transcriptase reversa... 108

Figura 21- Cromatografia da seqüência obtida pelo seqüenciador automático da região da Protease indicando a presença da mutação M36I..... 109

Figura 22- Cromatografia da seqüência obtida pelo seqüenciador automático da região da Protease, indicando a presença do polimorfismo L63..... 109

Figura 23- Foto controle interno da Reação em Cadeia da Polimerase para a amplificação de fragmento Gênico de 110 pares de bases..... 121

PÁG.

Gráfico 1- Distribuição dos casos de AIDS por Transmissão Vertical..... 46

Gráfico 2- Gráfico demonstrativo da classificação dos Subtipos..... 104

Gráfico 3- Prevalência das mutações referentes ao gene da Transcriptase Reversa..... 111

Gráfico 4- Prevalência das mutações referentes ao gene da Protease..... 113

Gráfico 5- Gráfico demonstrando o uso da classe dos Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa..... 114

Gráfico 6- Gráfico demonstrando o uso da classe dos Inibidores da Protease..... 114

Gráfico 7- Gráfico demonstrando o uso da classe dos Inibidores Não Nucleosídicos da Transcriptase Reversa..... 114

PÁG.

Quadro 1- Seqüência utilizada para a genotipagem..... 101

RESUMO

Investigamos a presença de mutações em crianças infectadas verticalmente pelo vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) que conferem resistência aos agentes antiretrovirais. Amostras de sangue periférico foram coletadas de sessenta e seis pacientes em seguimento no do Ambulatório de Pediatria do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. A partir de leucócitos destas amostras foi extraído o DNA, após diversas lavagens e precipitações. Foi preparado um Mix para 20 reações contendo 100µl de Buffer (50 mM de cloreto de potássio; 20 mM de Tris-HCl - pH 8,4); 100 µl de cloreto de magnésio (25mM); 12µl da mistura desoxirribonucléica - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP; dTTP) a 25mM, 10µl de cada "primer" (25pmoles/µl); 0,5µl de *Taq* DNA polimerase e 0,5 µl do DNA a ser estudado, para a realização da PCR. As condições da reação foram: Desnaturação: 95ºC - 3 minutos; Anelamento: 55ºC – 1 minuto; Extensão: 72ºC - 1 minuto (3 ciclos). Desnaturação: 95ºC – 1 minuto; Anelamento: 55ºC – 45 segundos; Extensão: 72ºC – 1 minuto e Extensão final: 72ºC por 10 minutos (35 ciclos). As bandas foram visulizadas em gel de agarose 1%, obtendo-se uma banda de 1008 pares de bases. Os produtos selecionados foram submetidos a seguinte reação de seqüenciamento: 1,0 µl do produto da PCR; 4,0 µl de Premix (Amersham); 1,0 µl de primer 5 µM; Completar com dH_2O para 10,0 µl de reação. Após a amplificação, os fragmentos foram analisados pelo Software MegaBACE™ Sequence Analyzer, em seguida alinhados e comparados com o banco de dados público (GenBank), com o vírus selvagem, e com o programa Phred, Phrap, Consed. As principais mutações encontradas no gene da Transcriptase reversa foram: M184V(42,6%), M41L (39,3%), D67N (27,9%), T215Y (26,2%) e K70R (18%). No gene da Protease as principais encontradas foram: L63P (42,6%), L90M e M36I (32,8%), V77I (29,5%), I93L (24,6%), V82A (16,4%), I54V (14,8%) e K20R (13,1%). Concluímos que este método é muito eficaz para análise das seqüências, auxiliando na observação das mutações. Este exame deveria ser implantado na rotina para os pacientes portadores deste vírus, pois auxiliaria os clínicos na escolha de uma terapia ideal para cada paciente. As crianças que apresentavam estas mutações associadas às drogas antiretrovirais estavam com o quadro clínico afetado e a maioria dos esquemas terapêuticos não reduziam a carga viral em níveis desejáveis.

ABSTRACT

In this work our purpose was to determine the subtype, prevalence of drug-resistance mutations, and assess genotypic profiles in HIV-1 infected children under antiretroviral treatment, from Campinas, São Paulo, Brazil. Blood samples from sixty six vertically human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infected Brazilian children were studied for antiretroviral drug resistance. Combination therapy with protease (PR) and reverse transcriptase (RT) inhibitors can efficiently supress human immunodeficiency virus (HIV) replication, but the emergence of drug resistance variants correlates strongly with therapeutic failure[1]. DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMc) samples, and a 1.0 kb fragment containing HIV-1PR and RT-coding sequence were amplified by Nested Polymerase Chain Reaction, sequencing and subtyping. The HIV-1 subtyping based on the polymerase (*pol*) gene sequences (protease and reverse transcriptase-RT regions) was as follow: subtype B (83,6%), subtype F (9,8%) and B/F viral recombinant forms (6,6%). We found fifty five sequences presented significant mutations and thirty five presented common polymorphism conferring resistance to protease inhibitors (PIs). Forty one presented mutations associated with resistant to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs).

The entire viral protease and codons 1 to 219 of the reverse transcriptase gene from 61 HIV-1 isolates were amplified and sequenced for genotyping. Two major protease inhibitor-resistance associated mutations, M36I and L90M, were most prevalent in our samples (32,8%) and the polymorphism L69P (42,6%). Minor mutation were also found at the protease gene: V77I (29,5%), V82A (16,4%), I93L (24,6%), I54V (14,8%), K20R (13,1%). Many mutations associated with reduced susceptibility to nucleoside or non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors were detected: M41L (39,3%), M184V (42,6%), D67N (27,9%), T215Y (26,2%), L210W (21%), K70R (18%) and E44D (11,5%). This study demonstrated that 98,3% of the studied population from the Campinas, showing evidences of therapy failure, presented viral genomic mutations associated with drug resistance. The main antiretroviral to which this population showed resistance were PI nelfinavir (54%), and ritonavir with lopinavir (18%), and the NNRTIs efavirenz (18%) and nevirapine (3,2%), and the NRTIs zidovudine (60,6%), didanosine (47,5%), lamivudine (45,9%). Ninety-eight percent of patients under antiretroviral therapy and with high viral load counts showed resistance to at least one of the antiretroviral analyzed.

1- INTRODUÇÃO

1- Histórico

1.1- A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)

A doença foi descrita pela primeira vez em 1981, nos Estados Unidos, entre os assim classificados "grupos de risco" que correspondiam a homossexuais, bissexuais masculinos, hemofílicos, usuários de drogas endovenosas e politransfundidos, nos grandes centros urbanos (GALLO *et al.*, 1988; SCHLEUPNER, 1988; CLEWLEY, 1989; LIFSON *et al.,* 1990; RUBINI, 1995; GALEL *et al*, 1995). Entre os homossexuais, do sexo masculino, constatou-se que havia um número elevado, entre eles, que apresentavam infecções consideradas raras em indivíduos imunocompetentes, como sarcoma de Kaposi e pneumonia por *Pneumocystis jeroveci* (SANCHO *et al*., 2003). O vírus foi isolado no final de 1983, por um grupo de pesquisadores liderados por Luc Montaigner, do Instituto Pasteur de Paris, França, que o denominou associado à linfoadenopatia (*lymphadenopaty associated virus* – LAV). Simultaneamente, o grupo de Robert Gallo, trabalhando no Centers for Disease Control and Prevention (CDC), dos Estados Unidos, relatou o isolamento de um novo vírus linfotrópico de célula T humano (*human T-lymphotropic virus* – HTLV), denominando-o HTLV do tipo III, pois acreditavam que um HTLV poderia ser o agente etiológico da AIDS. Posteriormente, ficou comprovado que os vírus descritos eram os mesmos. Em 1984, ocorreu o primeiro isolamento do vírus em indivíduos assintomáticos, indicando o estado de portador, sendo este denominado de retrovírus associado à AIDS (LEVY *et al,* 1996; CUNNINGHAM *et al.,* 1996). Devido à confusão causada pelas várias terminologias para um mesmo agente, em 1986, o International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) recomendou o uso da denominação vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) para esse novo agente.

1.2- AIDS no Brasil

No Brasil, já foram notificados cerca de 371 mil casos de AIDS. Este número representa as notificações feitas pelo Ministério da Saúde, desde a identificação do primeiro caso de AIDS, em 1980, até junho de 2005. A taxa de incidência foi crescente até metade

da década de 90, alcançando, em 1998, cerca de 17 casos de AIDS por 100 mil habitantes (www.aids.gov.br -25/04/2006).

O Sudeste e Sul são as regiões que apresentam maior número de casos de AIDS, apresentando uma taxa de 80%. O Sudeste é a região mais atingida desde o início da epidemia e, apesar da alta taxa de incidência, mostra moderada estabilização desde 1998. Na região Sul observa-se aumento das taxas de incidência de casos até 2003, apresentando queda da taxa em 2004 (www.aids.gov.br- 25/04/2006).

Os casos de AIDS pediátrica seguem os padrões gerais da epidemia quanto à distribuição geográfica. Há, desde o início, um predomínio de casos na Região Sudeste nunca suplantado por outra região. Ao longo da década de 90, a epidemia vem se expandindo na Região Sul, enquanto as regiões Nordeste, Centro-Oeste e Norte apresentam os menores valores quantitativos (www.aids.gov.br- 21/11/2004).

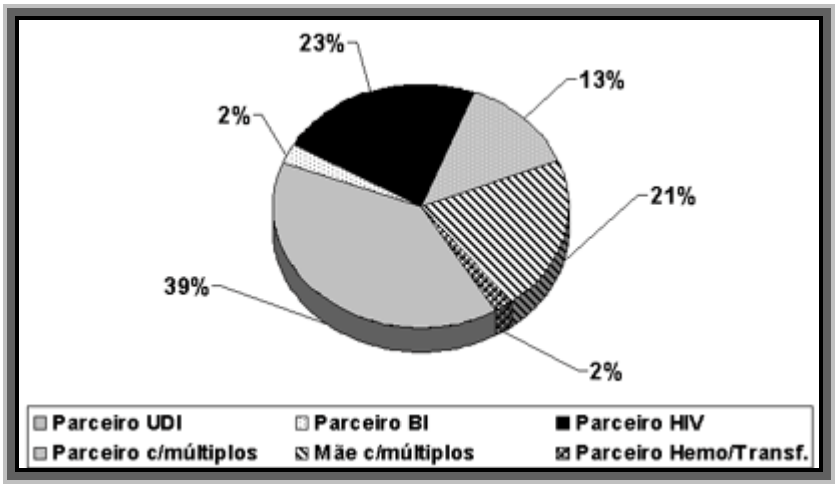


Gráfico 1- Distribuição proporcional dos casos de AIDS por transmissão vertical, segundo características da parceria da mãe na categoria de exposição heterossexual. Brasil. 1993 a 1999 (www.aids.gov.br - 21/11/2004).

Um fato bastante importante ocorrido na epidemiologia da AIDS foi o aumento na incidência desta doença em mulheres tendo como conseqüências o aumento nas transmissões verticais. Estimativas do ano de 2003 mostram 10.577 novos casos de AIDS em crianças com menos de treze anos, representando 3,4% do total geral de casos no Brasil. Desse número, 8.843 casos, ou 86,3%, são de crianças infectadas por transmissão vertical (www.aids.gov.br- site acessado dia 27/07/2006).

1.3- Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp)

O Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas, SP, teve seu primeiro caso clínico de transmissão vertical do vírus HIV-1 em 1989. Dados de outubro de 2005 mostram que o número total de crianças infectadas pelo HIV em tratamento no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica da UNICAMP foi de 145 crianças.

1.4- Taxonomia Viral

O vírus da Imunodeficiência Humana é um retrovírus não-oncogênico, um lentivírus, membro da família **Retroviridae**, e é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

1.5- Estrutura viral

O HIV-1 é um vírus de formato esférico, com aproximadamente, 10nm de diâmetro, constituído de uma membrana lipídica ou envelope, que envolve o nucleocapsídeo viral de formato cônico (LUCIW, 1996). Apresenta um genoma de, aproximadamente, 10kb (LUCIW, 1996), que codifica diversas proteínas, como as estruturais do core ou cerne viral e as com atividade enzimática. As proteínas do envelope

são codificadas pelo gene *env*, as proteínas do core são codificadas pelo gene *gag* e as proteínas com atividade enzimática são codificadas pelo gene *pol*. As proteínas estruturais do HIV são importantes, uma vez que é contra elas que se produz a maior parte dos anticorpos detectados pelas técnicas laboratoriais rotineiras. Já as proteínas com atividade enzimática, têm a função de transcriptase reversa, ligase e endonuclease e são responsáveis pela diversidade genotípica do HIV-1.

A proteína da membrana externa do HIV (envelope-gp120) está ligada ao vírus pela glicoproteína da transmembrana (gp41). As regiões destas glicoproteínas, particularmente a gp 120, podem apresentar ampla variação, configurando diferentes cepas de HIV, que aumentam, em número com o avanço da infecção, tornando-se, o maior problema para o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra o vírus (PLANTIER *et al*., 1998). As proteínas p24 (kDa), p17 (kDa), p7 (kDa) são originadas de uma proteína de 55 kDa e formam as proteínas do nucleocapsídeo (ANTONI *et al.,* 1994).

O núcleo com forma de cone, dentro do envelope viral, do HIV-1/HIV-2 consiste na proteína p24, que possui formato cônico, e envolve o RNA diploíde genômico do vírus. A proteína da matriz P17, envolve o capsídeo viral e a p7 está associada ao RNA genômico viral. A integrase, RNAse (LUCIW, 1996) e a protease são partes da transcriptase reversa pois, trata-se de um complexo proteíco pertencente ao gene *pol* do HIV.

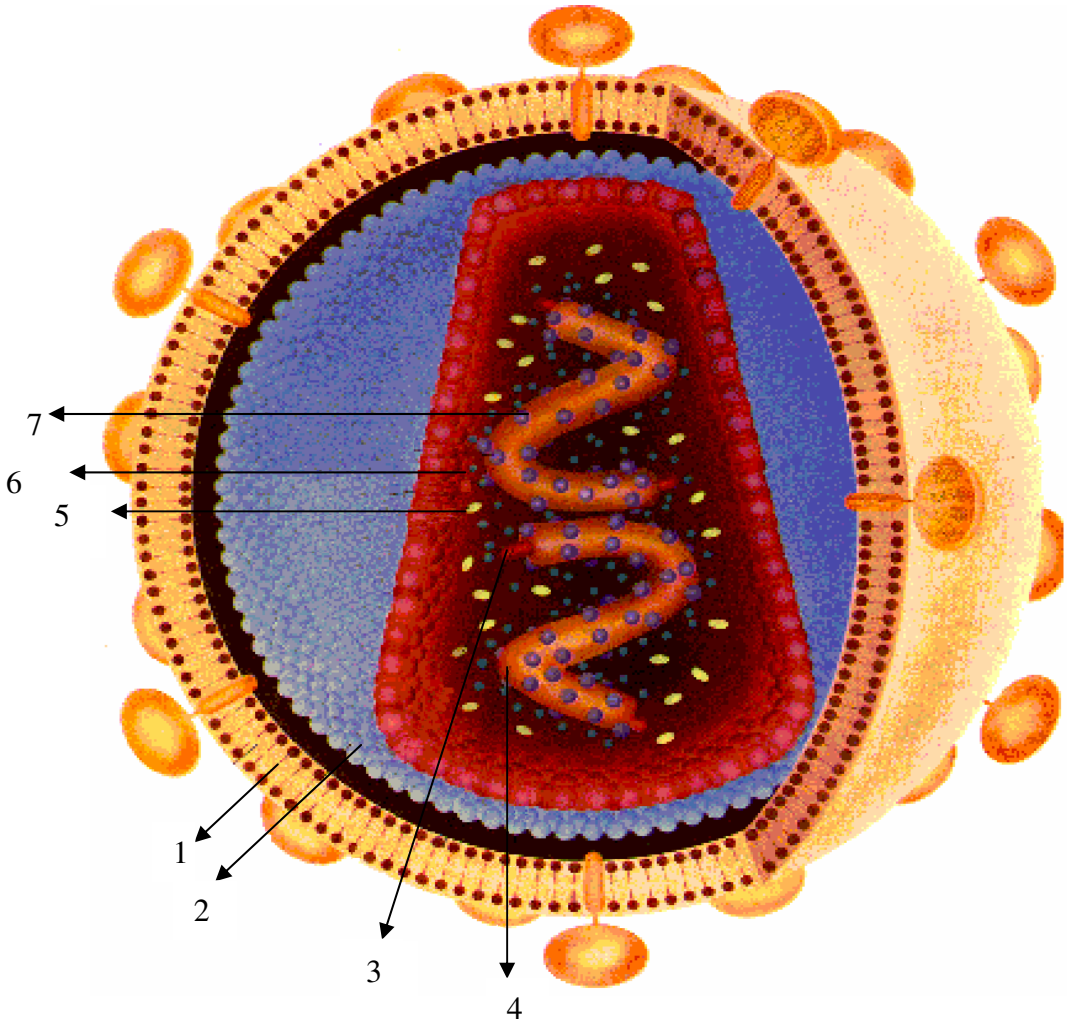


Figura 1- Estrutura do HIV-1 **bmb.pharma.hr/predavanja/ molmed/sld021.htm-** site acessado dia 03/05/2005.

1 = Bicamada Lipídica

2 = Proteína matriz

3 = RNA

4 = Nucleocapsídeo

5 = Protease

6 = Integrase

7 = Transcriptase Reversa

1.6- O Genoma do Vírus HIV-1

O HIV-1 apresenta DNA genômico composto por genes estruturais *gag, pol* e *env*, que são comuns a todos os retrovírus (ROSEN & PAVLVIKS, 1990), além de dois genes regulatórios, *tat* e *rev*, e de quatro acessórios, *nef, vif, vpr* e *vpu*, que regulam a replicação do HIV através da produção de suas proteínas características, conforme mostra a figura 02 (CUNNINGHAM *et al.,*1996). Nas terminações 3' e 5', há longas seqüências repetidas denominadas *long terminal repeats*- LTRs. (WIGG *et al*., 2002).

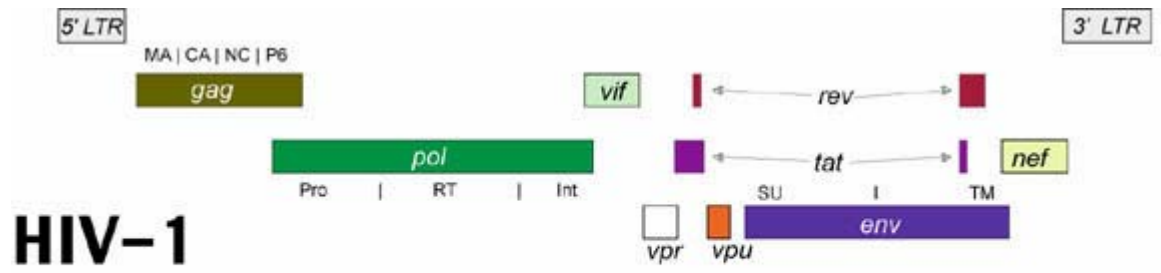


Figura 2- Organização genômica do vírus da Imunodeficiência Humana www.google.com.br-http://www.aids.havard.edu/images/laboratories/figure_HIV1and2.jpg

25/04/2005).

1.6.1- Genes Estruturais

Gene *gag* (p24, p17, p9 e p7), região do capsídeo - grupo específico de antígeno.

As proteínas codificadas pelo gene *gag* formam a estrutura do capsídeo. A proteína precursora codificada pelo gene *gag* apresenta 55kDa (p55) (JACKS *et al.,* 1988); esta sofre adição do ácido mirístico e através de clivagens proteolíticas dão origem a quatro proteínas menores de 17kDa (p17), 24kDa (p24), 9kDa (p9) e 7kDa (p7).

A p24 ou capsídeo é uma partícula nuclear, que apresenta de 24-27kDa e 240 aminoácidos. A proteína p17 ou proteína matriz apresenta 130 aminoácidos e está relacionada com o ciclo de vida viral (LUCIW, 1996). Ela está localizada na superfície interna da membrana do envelope, e parece ser o maior componente da cápsula protéica, apresentando simetria icosaédrica (ANTONI, STEIN, RABSON, 1994). As p7/p9 pertencem ao nucleocapsídeo viral, possuem de 7-9 kDa e são compostas por 70 aminoácidos (LUCIW, 1996).

Gene *env*

O gene *env* codifica uma proteína precursora, gp160, que é clivada originando duas outras glicoproteínas, gp41 e gp120. A gp120 é a mais externa do HIV, responsável pela interação viral com a molécula de CD4 do linfócito T auxiliador e macrófagos, principais células hospedeiras do HIV, tendo como função a adsorção do HIV na célula hospedeira (ANTONI *et al.,* 1994). A gp41 é uma proteína transmembrana, que é responsável pela ligação da gp120 com o vírus. Ambas são alvos para anticorpos neutralizadores, que impedem a penetração e replicação do vírus nas células, prevenindo muitas vezes, a ligação à proteína CD4 (CUNNINGHAM *et al.,* 1996).

Gene *pol*

Os produtos do gene *pol* são: a integrase, a RNA e a protease, que são partes da transcriptase reversa (ANTONI, STEIN, RABSON, 1994). Esta possui 51-66 kDa e traduz o RNA viral em DNA, logo após a entrada do HIV na célula, para, posteriormente, esse DNA ser inserido nos cromossomos da célula hospedeira. A integrase apresenta 31kDa e integra o DNA viral ao genoma desta célula. A protease possui 10 kDa, sendo constituída por 99 aminoácidos (LUCIW, 1996). Ela atua especificamente na clivagem dos polipeptídeos precursores das proteínas funcionalmente ativas, dos genes *gag* e *pol* do HIV-1 (SHAW, 1996). A RNAse degrada a fita de RNA viral deixando apenas a fita de DNA viral , para posterior formação da sua fita complementar (ANTONI *et al.,* 1994).

Transcriptase reversa (p66 e p51): enzima responsável pela transcrição reversa, com função de DNA polimerase-RNA dependente.

Protease (p11): enzima que realiza o processamento das poliproteínas precursoras virais.

Integrase (p32): realiza a integração do DNA proviral, ou seja, insere o genoma viral no DNA celular.

1.6.2- Genes Regulatórios

Gene *tat* (p14): Composto pôr uma seqüência de 16 kDa, possui localização nuclear e codifica uma proteína com 86 aminoácidos (ROSEN & PAVLAKIS, 1990), cuja função essencial é a replicação do HIV-1. É responsável pela transativação, pois é um potente transativador da expressão das extremidades LTR do HIV (ANTONI *et al.,* 1994). A proteína desse gene acelera a produção de partículas virais (HALSELTINE, 1989).

Gene *rev* (p19): Composto pôr uma seqüência de 19 kDa , com localização nuclear e codifica uma proteína de 116 aminoácidos (ROSEN & PAVLAKIS, 1990). É o segundo transativador da expressão viral, pois a proteína que ele produz está ligada ao ciclo de replicação e de todas as partículas virais. Ele é responsável pela regulação da expressão do RNA mensageiro viral, resultando na produção de altos níveis de proteínas estruturais do HIV (ANTONI *et al*., 1994).

Gene *nef* (p27): A proteína codificada por esse gene possui entre 25-27 kDa e localização citoplasmática. São encontrados anticorpos contra a proteína desse gene em pacientes com AIDS (ANTONI *et al.,* 1994). Há controvérsias sobre a função desse gene, pois ele pode atuar indiretamente para reduzir a transcrição do terminal longo do HIV-1, e em outros casos demonstra estimular a habilidade do vírus em infectar uma variedade de células (COFFIN, 1990), podendo ser um fator negativo, aumentando a infecciosidade.

Gene *vif* (p23): A proteína codificada pelo gene vif possui 23-27 kDa, e está relacionada à replicação do HIV (LUCIW, 1996). Ele auxilia na síntese do DNA proviral e/ou empacotamento do vírus. É denominado “viral infective factor”, pois aumenta a infecciosidade viral, capacitando o virion a infectar células livres e a transmissão

célula-célula *in vitro* (ANTOIN, STEIN, RABSON, 1994), sendo responsável pelo aumento da infectividade viral fora da célula (HÖGLUNG *et al.,* 1994).

Gene *vpr* (p15): A proteína desse gene apresenta 15 kDa (LUCIW, 1996) e está presente nas partículas do virion. Facilita o transporte do DNA do HIV, para dentro do núcleo da célula, regulando o ciclo celular e auxiliando na replicação viral.

Gene *vpu* (p16): A proteína que esse gene codifica possui 16 kDa (LUCIW, 1996) e é responsável pela maturação viral e auxilia na liberação do vírion (ANTONI, STEIN, RABSON, 1994).

Gene *vpx:* Codifica uma proteína de aproximadamente, 14-16 kDa e é encontrado apenas no vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (LUCIW, 1996).

1.7- Biossíntese Viral

O vírus do HIV, circula pelo sangue e atinge todo o organismo.

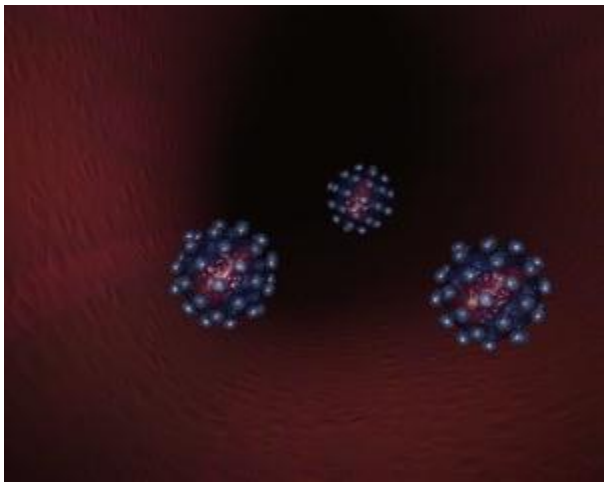


Figura 3- Partículas Virais. (**www.msichicago.org/ exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** - 05/02/05).

Existem três mecanismos básicos de defesa do nosso organismo:

- Através dos macrófagos, que englobam todos os invasores;

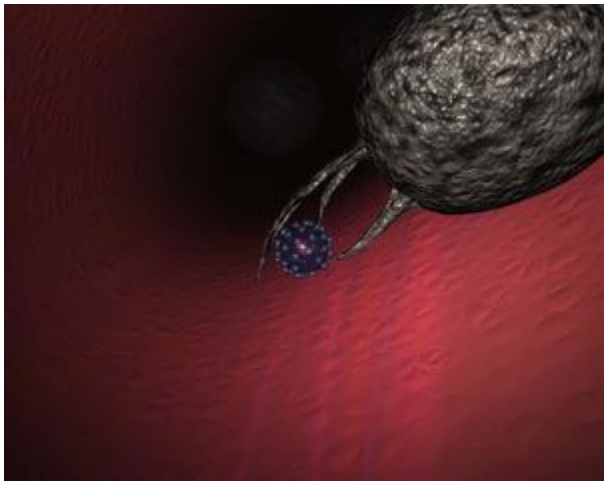
- 

Figura 4- Macrófagos (**www.msichicago.org/ exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** **-** 05/02/05).

- Anticorpos;

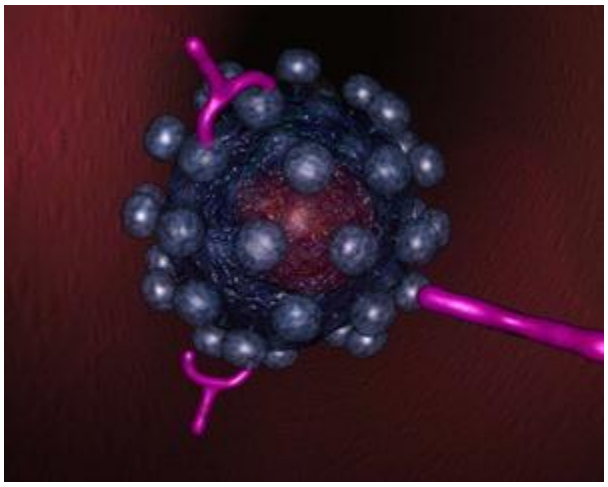


Figura 5- Anticorpos (**www.msichicago.org/ exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** **-** 05/02/05).

- células T killer, que destrõem as células que foram infectadas pelo vírus.

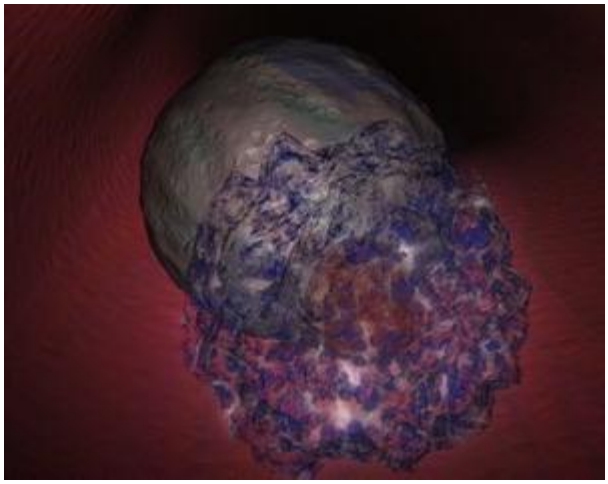


Figura 6- Células Natural Killer (**www.msichicago.org/ exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** - 05/02/05).

O HIV infecta os linfócitos T auxiliares (*helper),* um tipo de célula imune, que possui a molécula CD4 como marcadora de superfície. Estas células constituem uma importante parte do sistema imunológico, porque ajudam a controlar a resposta do organismo às infecções, que poderiam ser fatais caso elas não existissem.

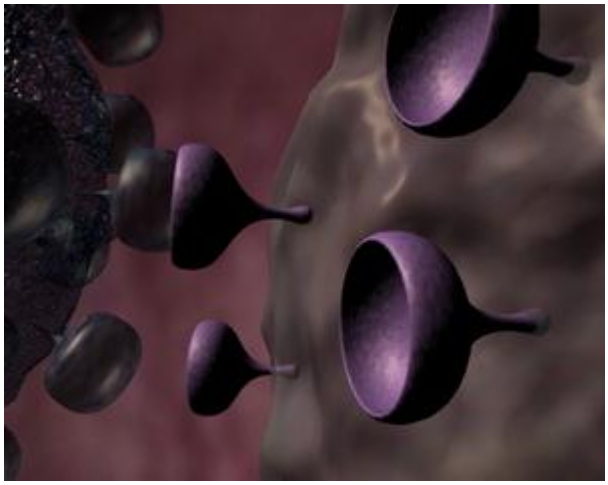


Figura 7- Receptores CD4. O vírus da AIDS atacando os linfócitos pelo receptor CD4. (**www.msichicago.org/ exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** **-** 05/02/05).

O ciclo de replicação do HIV-1 inclui as seguintes etapas: Adsorção viral, penetração por fusão, desnudamento, transcrição reversa, integração, expressão gênica, empacotamento, brotamento e maturação.

1.7.1- Adsorsão e Fusão

A primeira etapa do ciclo de replicação do HIV-1 é a interação de proteínas do envelope viral com receptores da superfície da célula, através de glicoproteína do envelope gp120 à molécula receptora CD4, que é expressa em células T auxiliares e células da linhagem dos macrófagos. Por intermédio de um segundo receptor ou co-receptor, que é representado por algumas moléculas receptoras para quimiocinas, principalmente CCR5 (proteína receptora das β-quimiocinas) e CXCR4 (proteína receptora das α-quimiocinas), o HIV-1 realiza o processo de adsorção e conseqüente fusão do seu envelope com a membrana citoplasmática da célula infectada, por exposição do domínio hidrofóbico da glicoproteína gp 41.(http://www.ajc.pt/cienciaj/n23/invivo.php acessado dia 02/04/2005).

1.7.2- Desnudamento

Após a fusão do envelope viral com a membrana da célula a ser infectada, o complexo nucleoproteíco é liberado no citoplasma.

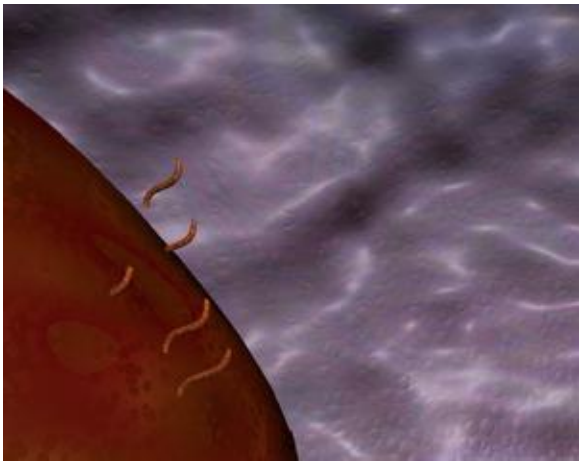


Figura 8- Liberação das partículas virais no meio extracelular. (**www.msichicago.org/exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** - 05/02/05).

1.7.3- Transcrição Reversa

No citoplasma, pela ação da enzima transcriptase reversa, que utiliza um RNA transportador (RNAt) presente no vírion, como iniciador, ocorre a transcrição das fitas de RNA em uma fita complementar negativa de DNA. A transcrição reversa também atua como ribonuclease H degradando a fita de RNA e, a seguir, sintetizando uma fita positiva de DNA, originando um duplo filamento. Durante a síntese do DNA, ocorre a duplicação das seqüências de cada extremidade do genoma (U3 e U5) que fixam os LTRs em ambas as extremidades. Dessa maneira, o DNA sintetizado é maior do que o RNA viral. Esse processo possibilita a integração e cria seqüências ativadoras e promotoras da transcrição.

Figura 9- Fita de RNA sendo transcrita em DNA (**www.msichicago.org/exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** - 05/02/05).

1.7.4- Integração

A fita de DNA de duplo filamento é transportada para o núcleo da célula, onde pode ocorrer a integração (provírus) no genoma da célula, através da enzima viral integrase, ou a permanência na forma circular não integrada.

1.7.5- Expressão Gênica

O provírus é transcrito, pois é ativado por fatores de transcrição celulares, pela RNA polimerase II celular, em RNAs mensageiros virais, que vão para o citoplasma. Eles darão origem a proteínas não estruturais que serão responsáveis pela regulação da transcrição de outros RNAs mensageiros, para a síntese de das proteínas estruturais dos vírus. O transcrito primário do HIV-1 é um RNA mensageiro idêntico ao RNA viral que é traduzido em proteínas *gag* e *gag-pol*.

1.7.6- Empacotamento e Brotamento

Produtos de outros RNAs mensageiros processados originam várias proteínas regulatórias e acessórias que podem afetar a replicação do HIV em diferentes tipos de células. No citoplasma, ocorre a reunião das poliproteínas estruturais, que são sintetizadas por ribossomas livres, com os RNAs virais e migram para a membrana, em locais onde há acúmulo de glicoproteínas virais, saindo da células pelo mecanismo de brotamento.

1.7.7- Maturação

No momento em que as partículas virais estão sendo liberadas no meio extracelular, elas são imaturas e não infecciosas, mas logo após a sua liberação, a protease viral sofre auto-ativação, passando a clivar as poliproteínas geradas pelos genes *gag* e *gag-pol*, de modo que a partícula viral apresenta o nucleocapsídeo em forma de cone, sendo então considerada infecciosa.

Após a destruição de várias células T, o indivíduo é considerado com AIDS. Ele desenvolverá uma ou mais infecções oportunistas, devido à fragilidade do sistema imune, podendo ir a óbito por causa de tais infecções.

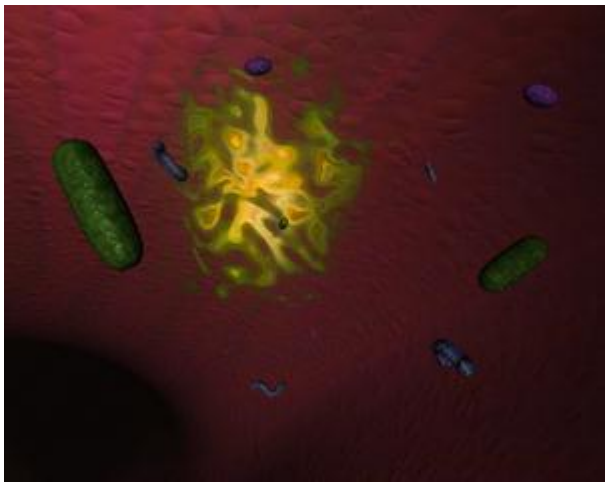


Figura 10-Destruição de linfócitos T (**www.msichicago.org/ exhibit/AIDS/AIDSlc5.html** **-** 05/02/05)

1.8- Manifestações Clínicas

A infecção pelo HIV pode ser dividida nos seguintes estágios: Infecção aguda, fase assintomática ou latência clínica, fase sintomática inicial, fase sintomática intermediária, fase sintomática tardia e infecção avançada.

A classificação da infecção pelo HIV baseia-se em parâmetros clínicos e imunológicos e o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), em 1994, propôs as seguintes categorias:

Categoria N- Assintomática, ou seja, ausência de sinais e/ou sintomas, ou com apenas uma das condições da categoria A.

Categoria A- São aquelas crianças que apresentam sintomas e/ou sinais leves, podendo apresentar duas ou mais manifestações abaixo listadas, porém sem nenhuma das categorias B e C: linfonodopatia; hepatoesplenomegalia; esplenomegalia; parotidite; infecções persistentes ou recorrentes de vias aéreas superiores (otite média ou sinusite).

Categoria B- Crianças que apresentam sinais e/ou sintomas moderados, como, por exemplo: anemia, neutropenia ou trombocitopenia; meningite bacteriana, pneumonia ou sepse; candidíase oral; miocardiopatia; infecção por Citomegalovirus; diarréia recorrente ou crônica; hepatite; estomatite pelo vírus Herpes simplex; pneumonite ou esofagite por HSV; nefropatia; herpes zoster; pneumonia intersticial linfocítica (LIP); nocardiose; febre persistente; toxoplasmose e varicela disseminada ou complicada.

Categoria C - Crianças que apresentam sinais e/ou sintomas graves, exceto LIP, como, por exemplo: infecções bacterianas graves, múltiplas ou recorrentes: septicemia, pneumonia, meningite, infecções osteo-articulares, abscessos de órgãos internos; candidíase esofágica ou pulmonar; coccidioidomicose disseminada; criptococose extra-pulmonar; criptosporidíase ou isosporíase com diarréia; CMV em locais além do fígado, baço ou linfonodos; infecção por HSV, leucoencefalopatia multifocal progressiva; úlceras mucocutâneas, pneumonite ou esofagite; sarcoma de Kaposi; linfoma primário do cérebro e outros linfomas; histoplasmose disseminada; *Mycobacterium tuberculosis* disseminada ou extra-pulmonar; *Mycobacterium avium* ou *M. kansaii* disseminados; *Mycobacterium* ou outras espécies disseminadas; pneumonia por *Pneumocystis jeroveci;* salmonelose disseminada recorrente; toxoplasmose cerebral, encefalopatia pelo HIV (www.aids.gov.br- site acessado dia 27/04/2006).

Pela história natural da AIDS pediátrica, sabe-se que a evolução clínica varia de acordo com diversos fatores, incluindo época da infecção, genótipo e fenótipo viral, carga viral, resposta imune e constituição genética individual. Portanto, acompanhamento clínico, avaliação imunológica e virológica seriados são fundamentais para avaliar o prognóstico e orientar decisões terapêuticas.

1.9- Diagnóstico Laboratorial

Os testes laboratoriais para a detecção de infecção pelo HIV-1 são realizados, basicamente por três razões: identificar pacientes com infecção, para a aplicação do tratamento antiretroviral; identificar portadores (nos casos de doadores de sangue ou de orgãos, gestantes e parceiros sexuais) e confirmar o diagnóstico de AIDS.

Os testes laboratoriais podem ser divididos em quatro grupos: detecção de anticorpos, detecção de antígenos, cultura viral e amplificação do genoma viral.

O teste de detecção de anticorpos apresenta excelentes resultados na triagem inicial, e é menos dispendioso, porém, é incapaz de identificar pessoas infectadas recentemente devido ao que se chama **janela imunológica,** que é o período em que o indivíduo já está infectado, mas a quantidade de anticorpos não está no limite de detecção do teste imunoenzimático empregado. Devido a isso, eles devem ser aplicados entre 4 a 6 semanas após a exposição ao vírus, tempo em que começam a ser detectados anticorpos circulantes.

Enquanto os testes sorológicos detectam a resposta do hospedeiro contra o vírus, as outras três técnicas detectam o vírus ou seus antígenos. Essas técnicas são menos utilizadas rotineiramente, sendo aplicadas em situações específicas, tais como: exames sorológicos indeterminados ou duvidosos, acompanhamento de pacientes e avaliação da carga viral durante o tratamento com antiretrovirais.

Com a finalidade de maximizar o grau de confiabilidade na emissão dos resultados dos testes para a presença de anticorpos anti-HIV, bem como minimizar a ocorrência de resultados falso-positivos ou falso-negativos, o Ministério da Saúde, através da Portaria n° 488, de 17 de junho de 1998, estabeleceu-se obrigatoriedade de um conjunto de procedimentos seqüenciados para os testes em indivíduos com idade acima de dois anos. Os procedimentos são agrupados em três etapas:

- Etapa I-Triagem sorológica;
- Etapa II - confirmação sorológica pelo teste de imunofluorêscencia indireta para o HIV-1;
- Etapa III-confirmação sorológica pelo teste de Western Blotting para HIV-1. Há a obrigatoriedade da utilização combinada de dois testes diferentes, na primeira etapa de testes. Esses dois testes devem apresentar princípios metodológicos e/ ou antígenos distintos. Pelo menos um dos testes deve ser capaz de detectar anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2.

1.9.1- Testes para a detecção de anticorpos

As técnicas para diagnóstico do HIV, por métodos de detecção de anticorpos contra o vírus foram introduzidas nos Estados Unidos em 1985, (JOSEPHSON *et al.,* 1989), quando foram licenciados pelo Food and Drug Administration – FDA, para triagem de doadores de sangue (LACKRITZ *et al.*, 1995). Os anticorpos IGg podem persistir na criança até os primeiros 18 meses de vida (MOLINA *et al.,* 2004). Os testes mais utilizados são: o método sorológico imunoenzimático ELISA, para triagem e o Western Blot como teste confimatório, embora vários outros testes estejam disponíveis, como radioimunoprecipitação e a imunofluorescência indireta, que foram desenvolvidos para estudos de campo e triagem de grandes populações, pois são testes rápidos (KIFFER *et al.,* 1995).

1.9.1.1- Elisa

É um teste imunoenzimático, sendo o método sorológico mais utilizado para a detecção de anticorpos contra o HIV (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1989; MOLINA *et al.,* 2004). Ele utiliza-se de antígenos virais produzidos em cultura de células (testes de primeira geração) ou através de tecnologia molecular recombinante. Os antígenos virais são adsorvidos por cavidades existentes em placas de plástico e a seguir, adiciona-se o soro do paciente (HUSSON *et al.,* 1990). Se o soro possuir anticorpos específicos contra o HIV, há a formação do complexo antígeno/anticorpo, havendo aglutinação. Esse fenômeno pode ser observado com a adição de uma anti-imunoglobulina humana conjugada a uma enzima, por exemplo, a peroxidase (KIFFER *et al.,* 1995).

Essa técnica é amplamente utilizada como teste inicial para a detecção de anticorpos contra o vírus (MARGNI, 1996), devido a sua facilidade de automação e custo relativamente baixo. Além disso, detecta quantidades extremamente pequenas de antígenos e anticorpos (FERREIRA & ÁVILA, 1996), apresentando sensibilidade e especificidade de 98% (HUSSON *et al.,* 1990), sendo atualmente o teste mais utilizado. A sensibilidade e a

especificidade podem variar entre diferentes kits, laboratórios e populações testadas (FALLON *et al.,* 1989).

Os testes rápidos, como, por exemplo, de aglutinação em látex e hemaglutinação, também podem ser utilizados. Apesar disso, o teste de Elisa pode apresentar resultado falso positivos (MOLINA *et al.,* 2004), procedimentos mais específicos devem ser utilizados, como o Western Blot e imunofluorescência indireta, usado como teste confirmatório.

1.9.1.2- Western Blot

O Western Blot é um teste mais específico, e usado para confirmar a presença de anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e 2 em amostras de soro (CHIANG *et al.,* 1989; KÄMMERER *et al.,* 1995; SAYRE *et al.,* 1996). Neste método há a separação das proteínas virais por eletroforese em gel de poliacrilamida, que separa os antígenos virais, de acordo com seus respectivos seus pesos moleculares (HUSSON *et al,* 1990). Posteriormente, ocorre transferência eletroforética dos antígenos para uma membrana de nitrocelulose (KIFFER *et al.,* 1995; STITES *et al.,* 2000), e ela é bloqueada com proteínas que são adsorvidas por sítios não ocupados pelos antígenos e colocada em contato com o soro pesquisado. As reações antígeno-anticorpo são detectadas por meio da reação com anti-imunoglobulina humana, conjugada com um radioisótopo ou uma enzima e a revelação é feita por auto-radiografia ou por substrato cromogênico. Apresenta alta especificidade e sensibilidade (KIFFER *et al.,* 1995).

1.9.1.3- Imunofluorescência Indireta

É usada para a confirmação da infecção pelo HIV, em testes iniciais (*KIFFER et al.,* 1995). É uma técnica muito poderosa para a identificação de moléculas ligadas à anticorpos em células ou secções de tecidos, infectado pelo HIV, na qual um corante fluorescente é ligado de forma covalente diretamente ao anticorpo, por isso a reação

é denominada imunofluorescência indireta. A presença dos anticorpos é revelada por meio de microscopia de fluorescência. Embora Albert Coons tenha inicialmente criado esta técnica para identificar as células plasmáticas como fonte de anticorpos, ela pode der usada para detectar a distribuição de qualquer proteína (HENRY, 1999; JANEWAY *et al*., 2000).

1.9.1.4- Radioimunoprecipitação

Este método utiliza reações com antígenos radioativos para a detecção de anticorpos. Esses antígenos são obtidos de células infectadas mantidas na presença de radioisótopos durante a síntese de proteínas virais, ou seja, a replicação das células ocorre em presença de aminoácidos marcados radioativamente; esses aminoácidos são incorporados na proteína viral durante a replicação. Precipitados formados da reação desses antígenos com anticorpos específicos são sedimentados, dissociados com detergentes e posteriomente analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguindo-se a autoradiografia (KIFFER *et al.,* 1995). Em alguns lugares é uma técnica também bastante utilizada para a confirmação de diagnóstico.

1.9.1.5- Outros Testes

Outros testes para detecção de anticorpos: um grande número de testes rápidos para estudos de campo, triagens de grandes populações e para decisões terapêuticas em situações de emergência vêm sendo desenvolvidos, geralmente baseados em técnicas de aglutinação em látex e hemaglutinação (HENRY, 1999).

1.9.2- Teste de detecção de antígeno viral

1.9.2.1- Pesquisa de antígeno P24

Ensaio imunoenzimático para a detecção do antígeno viral nuclear p24, é comumente utilizado para o diagnóstico da infecção pelo HIV (HUSSON *et al.,* 1990). A pesquisa de antígeno p24 quantifica a proteína viral presente no plasma ou no sobrenadante

de cultura de tecido (KIFFER *et al.,* 1995). Este teste é comumente utilizado para o diagnóstico da infecção pelo HIV (HUSSON *et al.,* 1990). Embora esta proteína esteja presente no plasma de pacientes em todos os estágios da infecção pelo HIV, sua maior prevalência ocorre antes da soroconversão, ou seja, na fase inicial da infecção (STRATHDEE *et al.,* 1995) e na fase final da doença. Esse período no plasma apresenta uma sensibilidade de 18% no diagnóstico do HIV, durante o período neonatal (ZÖLLNER *et al.,* 1996; MOLINA *et al.,* 2004).

1.9.2.2- Técnica de cultura viral

Esta técnica é utilizada para detecção do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 em células de sangue periférico e plasma de indivíduos com anticorpos para o vírus (CASTRO *et al.,* 1988), pois não é utilizada rotineiramente para diagnóstico, já que envolve dificuldades técnicas, pois exige condições laboratoriais especiais de segurança, não disponíveis na maioria dos serviços (EDWARDS *et al.,* 1989; KELLOG *et al.,* 1990). Além disso, consome muito tempo para resultados confiáveis, levando em média de 3 a 4 semanas para se evidenciar o crescimento do vírus (DORENBAUM *et al.,* 1997), apresentando uma sensibilidade de aproximadamente 28-48% (ZÖLLNER *et al.,* 1996). É uma técnica bastante sensível para a detecção do HIV em recém-nascidos com suspeita de transmissão vertical (MOLINA *et al.,* 2004).

1.9.2.3- Detecção do Genoma Viral

Introduzida em 1985 (SAIKI *et al.,* 1985), a reação em cadeia da polimerase é amplamente utilizada para detectar a infecção pelo HIV-1 (SLAVIK *et al.,* 1995; ZAZZI *et al.,* 1995) e tem como princípio a amplificação de fragmentos específicos do DNA alvo, através de repetidos ciclos de separação das hélices de DNA, com temperaturas variando entre 90°C - 95°C; a ligação complementar entre iniciadores (“primers”) e o DNA, com temperatura de aproximadamente 37°C- 50°C e síntese de DNA pela DNA Taq polimerase a temperaturas de 67°C - 72°C (CLEWEY *et al*., 1989), conforme mostra a

figura 11. A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um iniciador é utilizado como substrato para outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA no ciclo precedente, aumentado exponencialmente o número de fragmentos amplificados (COSTA *et al.,* 1992).

A “Nested PCR” tem sido muito aplicada para aumentar a sensibilidade e especificidade do método, e consiste numa segunda PCR, com a utilização de pares de “primers” internos aos da primeira reação de amplificação (ALBERT & FENYÖ, 1990). A PCR utilizada para diagnóstico do DNA do HIV-1 amplifica regiões conservadas do vírus, já que o HIV-1 é um patógeno capaz de sofrer consideráveis variações genômicas em certas regiões de seu código genético (ZIEGLER *et al.,* 1996; BARIN *et al.,* 1997). Permite a detecção rápida da infecção do HIV antes da soroconversão (WILLIAMS *et al.,* 1990).

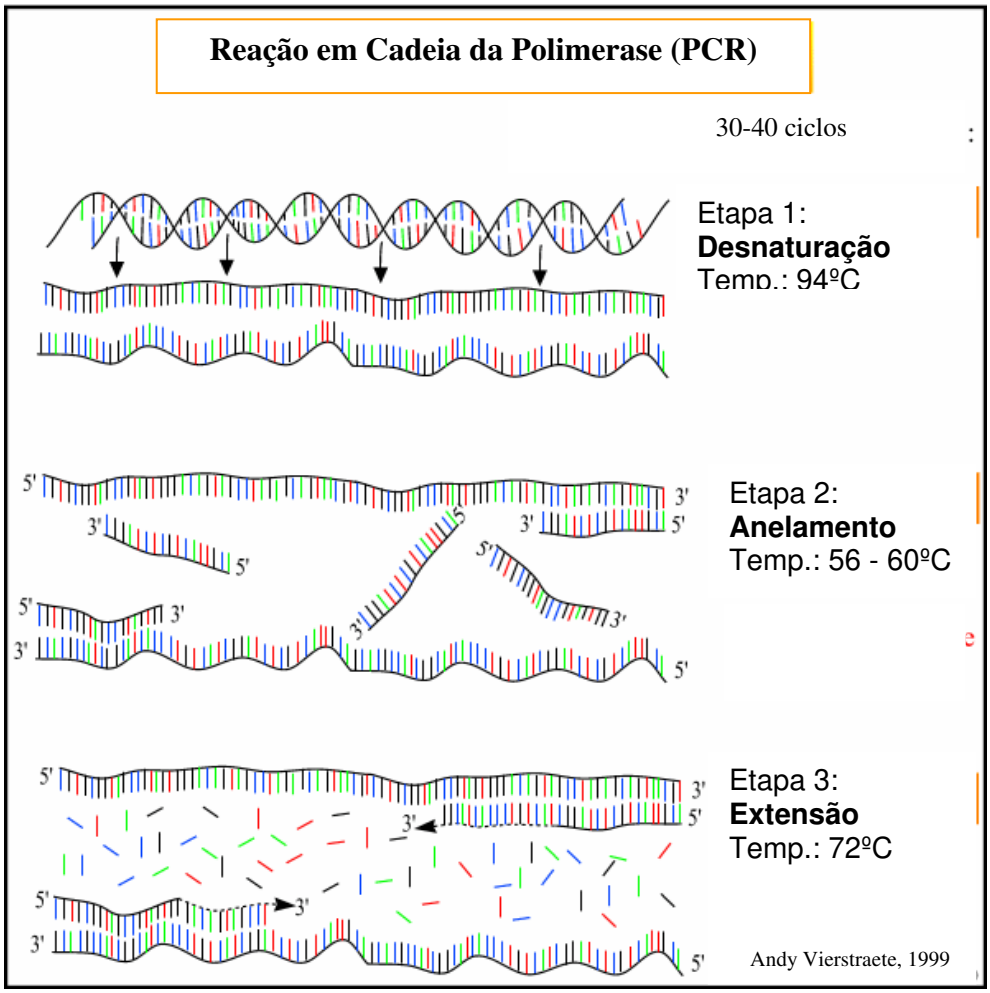


Figura 11- Reação em Cadeia da Polimerase

1.9.2.4- Fenotipagem Viral

Por definição metodológica, os testes de fenotipagem são aqueles que mais se assemelham aos antibiogramas clássicos, de susceptibilidade de cepas bacterianas aos antibióticos. Na fenotipagem viral, no entanto, são testados isolados virais do paciente na sua capacidade replicativa em cultura de células sensíveis à infecção quando expostos a diversas drogas antiretrovirais.

Os testes de sensibilidade aos agentes antivirais determinam a capacidade de replicação do HIV sob diversas concentrações dos medicamentos em comparação com uma cepa viral de laboratório sensível a estes agentes ou com a cepa isolada previamente do mesmo paciente (HIRSCH *et al.,* 1999).

Um estoque de vírus gerado por qualquer uma dessas técnicas é então cultivado *in vitro* na presença de diferentes concentrações das diversas drogas terapêuticas conhecidas ou escolhidas para a avaliação. Neste teste, as células são infectadas com uma quantidade fixa do inóculo viral; e várias concentrações do medicamento são testadas para determinar a concentração necessária para inibir a replicação viral (determinar a curva dose/resposta) em comparação com células de controle infectadas, mas não tratadas. Os resultados de susceptibilidade do vírus são reportados como diferentes IC50 (concentração necessária para inibir o crescimento viral em mais de 50% em cultura) ou IC90 (concentração necessária para inibir o crescimento viral em mais de 90% em cultura). Esses valores dependem do ensaio utilizado, do tipo de célula empregada, do inóculo viral aplicado, do marcador da replicação viral escolhido e do tempo em cultura (HIRCSH *et al.,* 1999).

Os testes de fenotipagem viral nem sempre conseguem detectar o desenvolvimento de resistência (HIRSCH *et al.,* 1999). Além disso, apenas as populações virais predominantes na circulação são analisadas para obter esses valores, sendo que as espécies resistentes minoritárias que contribuem para a falência do tratamento ou transmissão dos vírus resistentes nem sempre são detectadas (HIRCSH *et al.,* 1999).

1.9.2.5- Genotipagem Viral

A genotipagem viral é uma forma direta e rápida para identificar o padrão genético das mutações virais que podem conferir resistência biológica a uma ou mais drogas das diferentes classes terapêuticas (HERTOGS *et al.,* 1998). Ela aponta no genótipo viral as mutações já anteriormente descritas na bibliografia como sendo responsáveis ou associadas ao comportamento viral de resistência. Este teste se tornou uma excelente

alternativa ao alto custo e demora na confecção dos testes de fenotipagem. (www.roche.com.br -21/11/2001). Em geral, são necessárias amostras de plasma com mais de 10.000 cópias/ml de RNA do HIV para se obter bons resultados (HIRSCH, *et al.,* 1999).

Os ensaios para detectar mutações do genoma viral do HIV-1 estão baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) como primeira etapa metodológica (HIRSCH *et al.,* 1999). Na segunda etapa, existem dois métodos para seqüenciar o fragmento amplificado: seqüenciamento automático com terminadores dideoxinucleotídeos fluorescentes e seqüenciamento por hibridização de alta densidade em micro-chips de DNA ("micro array DNA chips").

O seqüenciamento automático com terminadores dideoxinucleotídeos fluorescentes é o método mais utilizado, pois sua vantagem reside no fato de acessar diretamente a seqüência dos genes alvo de mutações de resistência.

São analisadas as seqüências de DNA dos genes da protease viral completa e da transcriptase reversa (RT) em sua porção inicial. Após seqüenciamento automático do cDNA dos genes da RT e protease virais, as duas seqüências obtidas são comparadas com as respectivas seqüências de um isolado viral-referência já publicado, reconhecidamente sensível às drogas utilizadas.

A genotipagem tem como objetivo ajudar os clínicos na escolha (BAHIA *et al.,* 2004) de um regime efetivo para o tratamento antiviral. Deve-se analisar a mutação identificada, a interpretação da susceptibilidade às drogas e a sugestão para o tratamento (BAXTER *et al.,* 2000).

Caso haja um aumento na prevalência de mutações em uma população em particular, o teste de resistência a drogas antiretrovirais deve ser considerado na escolha do regime inicial de antiretrovirais (WEGNER *et al.,* 2000) e de rotina (MAGUIRE *et al.,* 2000).

2- Antiretrovirais

O desenvolvimento de uma nova geração de drogas antiretrovirais contra o HIV conduziu a mudanças drásticas na terapia antiretroviral e no tratamento da AIDS (CARIDE *et al.,* 2000). As opções de terapia para o controle do HIV-1 incluem inibidores análogos nucleosídeos da transcriptase reversa (INRTs), inibidores não-nucleosídeos da transcriptase reversa (INNRTs) e inibidores da protease (IPs) (NETTLES *et al.,* 2004). O Tratamento Antiretroviral Altamente Ativo (HAART) consiste em combinações de drogas antiretrovirais incluindo dois inibidores análogos da transcriptase reversa ou dois inibidores análogos não-nucleosídeos e uma ou mais drogas inibidora da protease (NETTLES *et al.,* 2004). Os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa utilizados são a zidovudina (AZT), didanosina (ddI), zalcitabina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T) e abacavir (ABC), e agem de forma similar, como terminadoras da cadeia da reação da transcriptase reversa após a fosforilação pelas quinases intracelulares (TANTILLO *et al*., 1994), impedindo a adição de novos nucleotídeos à cadeia de DNA que está sendo sintetizada. Os inibidores não-nucleosídeos são delavirdina (DLV), efavirenz (EFV) e nevirapina (NVP) e agem inibindo alostericamente a replicação do HIV-1 pelo deslocamento dos resíduos catalíticos relativos de aspartato do sítio de ligação da polimerase (TANTILLO *et al.,* 1994; SIMONETTI *et al.,* 2003). Os inibidores de protease são indinavir (IDV), amprenavir (APV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV) e lopinavir/ritonavir. Eles não necessitam uma ativação intracelular e sim de uma ligação forte ao sítio ativo da protease competindo com o substrato natural e produzindo virions inativos e não-infecciosos prevenindo a divisão de poliproteínas virais precursoras *Gag* e *Gag-Pol* em proteínas estruturais e enzimas virais. (SIMONETTI *et al.,* 2003).

A introdução deste tratamento como terapia para o HIV, tem diminuído a morbidade e a mortalidade dos casos de AIDS (PARKIN *et al.,* 2000; MAGUIRE *et al*., 2000; NETTLES *et al.,* 2004).

O objetivo da terapia antiretroviral é diminuir a replicação viral ao máximo grau possível (PARKIN *et al*., 2000), podendo reduzi-la a níveis indetectáveis (CARIDE *et al.,* 2000; STINGELE *et al.,* 2001). Esta redução permite uma reconstrução considerável do sistema imunológico na maioria dos pacientes (NETTLES *et al.,* 2004),

beneficiando-o clinicamente (CARIDE *et al.,* 2000). O sucesso da terapia antiviral em pessoas aderentes ao tratamento pode reduzir a carga viral no sangue e nas secreções genitais, reduzindo o HIV e o risco de transmissão (WAINBERG & FRIEDLAND, 1998). A combinação de três ou mais drogas demonstrou ser a melhor opção para pacientes virgens de tratamento e para pacientes já tratados, pois nesses conseguiu-se reduzir a quantidade de RNA viral no sangue abaixo dos limites de detecção, ou seja, menos de 20 cópias/ml (WAINBERG & FRIEDLAND, 1998; BIRK *et al.,* 2000). É rara a completa supressão da replicação do HIV-1 apenas com o uso de mono e biterapias, por esta razão é recomendável combinação de três ou mais drogas no mínimo (CARIDE *et al.,* 2000). Na última década, várias drogas foram disponibilizadas para o tratamento de indivíduos infectados pelo vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), o que mudou a morbidade e a mortalidade nesses pacientes em relação a infecção pelo HIV-1 (HERTOGS *et al*., 1998).

2.1- Resistência á drogas antiretrovirais

O desenvolvimento da terapia combinada de três ou mais drogas antiretrovirais (HAART) em pacientes infectados com o HIV, tem sido de grande importância no combate à evolução do quadro clínico da AIDS (BAXTER *et al.,* 2000). O sucesso da terapia anti-HIV depende da habilidade das drogas em suprimir a replicação viral (HERTOGS *et al*., 1998; WEGNER *et al.,* 2000). Porém, o aparecimento da resistência viral aos agentes antiretrovirais usados para no tratamento da infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana é uma causa importante de falência terapêutica (BAHIA *et al.,* 2004) e limita as opções dos esquemas antiretroviras alternativos (HIRSCH *et al.,* 2000). Em pacientes com uso do HAART para o HIV-1, a resistência viral é a principal causa de falha terapêutica (BAHIA *et al.,* 2004). A prevenção, a caracterização e o controle clínico dessa resistência são de interesse crescente para o sucesso terapêutico antiretroviral (HIRSCH *et al.,* 2000). Foram descritas mais de cem mutações associadas à resistência, abrangendo as regiões codificadoras da protease e da transcriptase reversa (HERTOGS *et al.,* 1998). Mutações resistentes á estes inibidores tem sido identificadas até

em pacientes não tratados (HIRSCH *et al.,* 2000), e a resistência a drogas aparece antes da falha do tratamento (PARKIN *et al.,* 2000).

A maior preocupação da saúde pública está em determinar até quando a terapia está, realmente, reduzindo a carga viral, não somente no sangue, mas também nos fluídos genitais, que são os principais veículos de transmissão do HIV em todo mundo (WAINBERG & FRIEDLAND, 1998).

A falha do tratamento com HAART pode ser causada pela pouca aderência à terapia inadequada potência ou biodisponibilidade da droga, ou resistência a drogas antiretrovirais (NETTLES *et al.,* 2004). Além disso, muitos pacientes não respondem adequadamente a esta terapia, gerando um dos mais importantes obstáculos para o sucesso do tratamento (BAXTER *et al.,* 2000; CARIDE *et al*., 2000).

A incompleta supressão da replicação viral causada pelo regime inicial inadequado de drogas pode diminuir os benefícios clínicos do paciente e pode promover o desenvolvimento de resistência a drogas que podem inativar o próximo tratamento (WEGNER *et al.,* 2000). O uso do regime com diversas drogas e o aumento da prevalência de resistência entre o HIV-1 em pacientes infectados tem aumentado a probabilidade de resistentes ao HIV-1 a uma ou mais classes de drogas antiretrovirais serem transmitidas (WEGNER *et al.,* 2000).

No Brasil, pesquisa realizada com 500 pacientes da Rede Nacional de Genotipagem (Renageno) demonstrou que somente 7% não apresentavam resistência a nenhum dos antiretrovirais. Outro estudo feito na Escola Paulista de Medicina, com 791 pacientes, revelou que 94,7% eram resistentes aos inibidores análogos nucleosídicos da transcriptase reversa (INRTs), 58% aos inibidores da protease e 48% aos inibidores análogos não nucleosídicos da transcriptase reversa (INNRTs). Na Europa e na América do Norte, a prevalência da resistência primária a zidovudina é variável e oscila entre 0% e 10% das cepas isoladas (HIRSCH *et al.,* 2000).

Num paciente infectado por vírus RNA, a população viral pode ser descrita como uma “semi-espécie”, o que pressupõe a existência de variantes virais geneticamente diferentes, que evoluíram a partir do vírus inoculado de início (NÁJERA *et al.,* 1995;

CARIDE *et al.,* 2000). Essas variantes são geradas porque os mecanismos de revisão do DNA, que preservam a composição genética dos organismos com genomas de DNA de fita dupla, não existem nos vírus de RNA. Desse modo, à medida que os vírus RNA de fita simples replicam-se, cada genoma recém-copiado difere do vírus primitivo em média por um nucleotídeo (HIRSCH *et al.,* 2000).

Quando a pressão seletiva dos agentes antivirais for aplicada contra as "semi-espécies" virais deste paciente, estas com resistência aos medicamentos, que até então eram numericamente insignificantes, tornam-se predominantes. O desenvolvimento destas cepas selecionadas pelas drogas ocorre por uma série de substituições de aminoácidos nos alvos atingidos pelas enzimas protease (PR) e a transcriptase reversa. Esta última, responsável pela transcrição reversa do RNA viral *in vivo* (SANDSTROM & FOLKS, 1996), apresenta uma elevada taxa de erro por incorporação de nucleotídeos no genoma (WAINBERG & FRIEDLAND, 1998; HERTOGS *et al,* 1998). Logo, a droga terapêutica não cria as mutações, mas seleciona aquelas pré-existentes. Apesar destas mutações estarem presentes em grande parte do genoma do vírus, o uso da terapia antiretroviral potente tem melhorado substancialmente o quadro clínico da infecção pelo HIV-1 (DETELS *et al.,* 1998).

É muito importante classificar as mutações de resistência em primárias e secundárias. As mutações primárias são geralmente selecionadas numa fase precoce do processo de acumulação das mutações de resistência, são relativamente especificas para cada inibidor, dificultando a ligação deste, podendo produzir um efeito detectável na sensibilidade do vírus aos agentes antiretrovirais (HIRSCH *et al*, 2000). As mutações secundárias acumulam-se nos genomas virais que já apresentaram uma ou mais mutações primárias (HIRSCH *et al.,* 1999).

Uma importante consideração referente a este assunto é o conceito de "barreira genética", pois para alguns medicamentos antiretrovirais, como a lamivudina, a nevirapina (WAINBERG & FRIEDLAND, 1998) e alguns inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa, uma única mutação pode conferir níveis elevados de resistência, e quando usados em combinação que suprimem, apenas, parcialmente a replicação do HIV, os mutantes resistentes predominam depois de algumas semanas (HIRSCH *et al.,* 2000).

Deve-se, portanto, reservar estas drogas para o uso em conjunto com outros agentes, pois sua utilização em esquemas menos supressores resultaria mais rapidamente em níveis elevados de resistência (HIRSCH *et al.,* 2000). Em contraste estão a zidovudina, o indinavir e os inibidores de protease, que possuem um processo geneticamente complexo, envolvendo a acumulação de diversas mutações (WEGNER *et al.,* 2000), pois só tem potencial de conferir resistência quando outras mutações estão presentes (WANG *et al.,* 2000), denominadas resistência cruzada (STINGELE *et al.,* 2001).

A transmissão dos mutantes do HIV-1 resistentes a zidovudina foi descrita, pela primeira vez, em 1992 (DETELS *et al.,* 1998; HIRSCH *et al*, 2000). A resistência a zidovudina é um reflexo do uso difundido deste componente no tratamento da infecção desde 1980, e a transmissão de cepas resistentes tem sido relatada por uma variedade de vias: homossexual, heterossexual, uso de drogas injetáveis, transmissão perinatal e entre crianças no contato familiar envolvendo a sua exposição com sangue (WAINBERG & FRIELAND, 1998).

Dados demonstraram que o desenvolvimento de mutações relacionadas á zidovudina é suprimida quando um inibidor de protease é combinado com zidovudina/lamivudina. A informação genotípica deve ser considerada como uma rotina na escolha de uma nova terapia para pacientes (MAGUIRE *et al.,* 2000).

Os principais padrões de mutações encontradas no Brasil, independente do subtipo, são K70R, M184V, e T215F/Y. Com menos freqüência, encontram-se a L210W, Q151M, Y115F, G333D/E, F116Y, L74I, entre outras (CARIDE *et al.,* 2000). Algumas delas, como a mutação M184V, M41L/T215Y, foram encontradas em isolados de pacientes com carga detectável e com baixa viremia (NETTLES *et al.,* 2004) e em células do sangue periférico, partículas virais contendo a mutação M184V relacionada com resistência a lamivudina (WAINBERG & FRIEDLAND, 1998). Atualmente, as mutações mais encontradas são M184V, K65R, e M41L/T215Y (NETTLES *et al.,* 2004).

As mutações resistentes às drogas identificadas no período de falha do tratamento estão associadas à baixa resposta a combinação das drogas utilizadas. Há fortes evidências de que o tratamento guiado pelo conhecimento das mutações resistentes pode ser muito mais efetivo (STINGELE *et al.,* 2001). A alternação de terapia com duas ou mais drogas pode ser uma boa estratégia para a prevenção ou retardo do aparecimento desta resistência (FITZGIBBON *et al.,* 1993).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a padronização da "Nested-PCR" para genotipagem do vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1, para a detecção de mutações localizadas em regiões do gene *pol* (protease e transcriptase reversa) do HIV-1 em amostras obtidas de pacientes pediátricos infectados por via perinatal, que possivelmente causariam resistência as drogas antiretrovirais utilizadas no controle desta doença.

As classes de drogas envolvidas na possível resistência eram as utilizadas pelas crianças que incluíam os inibidores análogos nucleosídeos da Transcriptase Reversa, os inibidores análogos não nucleosídeos da Transcriptase Reversa e os inibidores da Protease.

Na classe dos Inibidores nucleosídeos da Transcriptase Reversa as drogas utilizadas foram: zidovudina, lamivudina, didanosina, zalcitabina e abacavir. Na classe dos Inibidores não nucleosideos da Transcriptase Reversa utilizaram: efavirenz, nevirapina e tenofovir. Entre a classe dos Inibidores da Protease incluíam: nelfinavir, ritonavir e ritonavir+lopinavir.

As mutações foram analisadas e relacionadas com as drogas, de acordo com a classe terapêutica que estavam associadas.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Seleção da população de estudo

Foram estudadas 66 crianças infectadas verticalmente pelo vírus HIV-1, em seguimento no Ambulatório Imunodeficiência Pediátrica, do Hospital das Clínicas – Unicamp. Tais pacientes recebiam tratamento com droga antiretroviral e apresentavam carga viral com valor de 10.000 cópias por ml ou mais elevada.

3.2- Metodologia utilizada

Os métodos utilizados para a detecção da presença do HIV-1 nos pacientes estudados foram: Extração do DNA; Amplificação gênica do gene *pol* do HIV-1 pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Detecção do fragmento amplificado pela PCR; Seqüenciamento direto do fragmento de DNA a ser estudado; Alinhamento deste fragmento no programa Phred Phrap; Análise do fragmento pelo programa padrão do HIV da Universidade de Stanford.

3.3- Extração de DNA de sangue periférico

3.3.1- Preparação das amostras

Foram coletados cerca de cinco mililitros de sangue periférico, colhidas em tubo com anticoagulante (EDTA), foram centrifugadas a 2.500 rpm durante 10 minutos para a separação do plasma, o qual foi descartado.

3.3.2- Lise das hemácias

As hemácias (sedimentadas) foram lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio (NH4Cl), a 0,444M – 5 vezes o volume de células e bicarbonato de amônio (NH4HCO3) a 0,01M – 0,5 vezes o volume de células. O hemolisado foi centrifugado durante 10 minutos a 3300 rpm, esta etapa foi repetida mais de uma vez, e posteriormente o sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos submetido à etapa seguinte.

3.3.3- Lise dos leucócitos

Os leucócitos foram lisados com lavagens de solução TKM1 (Tris-HCl 10 mM (pH=7,6); KCl 10 mM; MgCl2 10 mM e EDTA 20 mM), sendo centrifugados por 10 minutos a 3300 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foi adicionado de 2 a 3 gotas de Triton X-100 (Nuclear), na primeira lavagem. O sobrenadante foi descartado e após essa etapa, foi acrescentado ao precipitado, 800µl da solução TKM2 (contendo Tris-HCl 10 mM (pH=7,6); KCl 10 mM; NaCl 0,4 M; MgCl2 10 mM; EDTA 2 mM) e 50µl de duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%. Em seguida o material foi incubado de 30 a 40 minutos a uma temperatura de 56ºC e então foi adicionado 150µl de NaCl 5M gelado e, então, centrifugado a 3300 rpm por 10 minutos. Nesta etapa o precipitado foi descartado e o sobrenadante transferido para um tubo (falcon) estéril.

3.3.4- Precipitação do DNA

Ao sobrenadante foi adicionado 4,0 ml de etanol absoluto gelado, ocorrendo precipitação do DNA. O DNA precipitado foi removido e colocado em tubo "eppendorf" e seco a temperatura ambiente e, posteriormente, solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH2O) e levado à temperatura de 4ºC.

3.3.5- Purificação do DNA com fenol clorofórmio

Nestas amostras foram adicionados 500µl de clorofórmio/álcool isoamílico e 500µl de fenol saturado sendo centrifugando á 12000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, e desta vez foi adicionado 1000µl de clorofórmio/álcool isoamílico e centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. O sobrenadante foi retirado, transferido para um novo eppendorf, adicionou-se 10 % do volume do sobrenadante de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 1ml de etanol absoluto gelado e centrifugou-se á 12000 rpm por 3 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado, adicionando-se 1000µl de etanol 70 % gelado e centrifugando-

se á 12000 rpm por 5 minutos. Decartou-se o sobrenadante e deixou o DNA secando em temperatura ambiente. Foi ressuspendido em água deionizada e estocado em geladeira para entrar em solução para, posteriomente congelar.

3.4- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.4.1- Detecção da Amplificação gênica da região da transcriptase reversa e protease pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu, com algumas modificações, o método descrito por Saiki e cols. (1985). Foi preparado um Mix para 20 reações contendo 100µl de Buffer (50 mM de cloreto de potássio; 20 mM de Tris-HCl - pH 8,4); 100 µl de cloreto de magnésio (25mM); 12µl da mistura desoxirribonucléica - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP; dTTP) a 25mM, 10µl de cada primer (25pmoles/µl); 0,5µl de *Taq* DNA polimerase e 0,5 µl do DNA a ser estudado.

As condições da reação foram:

- Desnaturação: . 95ºC - 3 minutos
- Anelamento: 55ºC – 1 minuto
- Extensão: 72ºC - 1 minuto

} 3 ciclos

- Desnaturação: . 95ºC – 1 minuto
- Anelamento: 55ºC – 45 segundos
- Extensão: 72ºC – 1 minuto
- Extensão final: 72ºC – 10 minutos.

} 35 ciclos

Foram utilizados como controle positivo da reação, a amostra de um paciente da pediatria com desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), e como controle negativo, amostras de indivíduos com ausência de infecção pelo HIV e água, considerado o branco da reação.

O protocolo de amplificação para a "Nested" PCR, seguiu o descrito anteriormente e uma alíquota de 0,5 µl do DNA amplificado na primeira PCR, foi reamplificado com pares de "primers" internos aos primeiros.

Visualização da banda

4,0 µl do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo 0,1µl/ml, juntamente com 2,0 µl de solução corante de azul de bromofenol. Em todas as amostras observou-se um fragmento de 1008 pares de bases correspondente à região do gene flanqueada pelos "primers" utilizados demonstrados na **tabela1.**

Tabela 1- Seqüência de "primers" utilizados para amplificação de fragmento do gene *pol* resultando um produto de 1008 pares de bases.

PRIMER	GENE	POSIÇÃO	SEQÜÊNCIA
DP10 (Externo)	*POL*	1605-1630	5' TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG 3'
LR54 (Externo)	*POL*	2679-2699	5' TAGGCTGTACTGTCCATTTAT 3'
DP16 (Interno)	*POL*	1663-1684	5' CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC 3'
RT12 (Interno)	*POL*	2644-2670	5' ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA 3'

Seqüência de primers gentilmente obtida pelo Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da Fiocruz-Rio de Janeiro.

3.5- Purificação dos produtos de PCR

Os produtos da PCR foram purificados com o kit Quiagen purification PCR products e submetidos ao seqüenciamento.

3.6- Seqüenciamento

MegaBACE 1000, é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase^{tm} II DNA Polimerase). Os produtos da PCR purificado, quantificado através de gel de agarose 1,5% utilizando um marcador de massa molecular (Low Mass Ladder –Invitrogen) selecionados foram submetidos a seguinte reação de seqüenciamento:

- 1,0 µl do produto da PCR purificado;

- 4,0 µl de solução Dyenamic ET Reagent Premix (Amersham);

- 1,0 µl de iniciador 5 µM (sense e antisense);

- Água destilada para completar 10,0 µl de reação.

A reação, distribuída em placa própria de seqüenciamento, foi protegida da luz com papel alumínio. As amostras foram submetidas a desnaturação inicial de 94° C por 2 minutos seguido do ciclo:

94° C – 20 seg
57° C – 15 seg } 35 ciclos
60° C – 1 min

Tabela 2- Seqüência de "primers" utilizados para o seqüenciamento da região amplificada na PCR.

PRIMER	GENE	POSIÇÃO	SEQÜÊNCIA
LR49	*POL*	2026-2045	5' CAATGGCCATTGACAGAAGA 3'
LR51	*POL*	2222-2246	5' TGTGGTATTCCTAATTGAACTTCCC 3'

3.7- Purificação para o Seqüenciamento

Foi adicionado a cada tubo 2,0 µl de acetato de amônio (7,5 M) e 50,0 µl de etanol absoluto e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4000 rpm por 30 minutos, descartando o volume com cuidado e adicionando 100,0 µl de etanol 70%. Centrifugou-se novamente nas mesmas condições descritas acima, o sobrenadante foi descartado e esperou-se secar. Adicionou-se 10,0µl de Loading Buffer (Amersham) e foi submetido à eletroforese em sequenciador automático MegaBACE1000 Sequence Analyzer (Amersham Pharmacia Biotech).

O gel para a eletroforese é o MegaBACE Long Read Matrix com poliacrilamida linear, as condições de eletroforese foram as seguintes Voltagem de injeção da amostra –3KV, tempo de injeção da amostra 60 segundos, voltagem de corrida –9 KV, tempo de corrida 90 minuto, potência do Laser- 40W.

Após a amplificação, os fragmentos foram analisados pelo Software MegaBACE™ Sequence Analyzer, em seguida alinhados e comparados com o banco de dados público (GenBank), com o vírus selvagem, e com o programa Phred, Phrap, Consed. Este programa permitiu que fossem analisadas várias seqüências simultaneamente, observando suas analogias e diferenças. Além desta vantagem, permitia a utilização de até dois aminoácidos, caso ocorresse dúvida em esclarecer qual aminoácido pertencia à determinada posição. Após alinhada a seqüência, ela era lançada no programa de Stanford especializado em detectar mutações referentes aos agentes antiretrovirais – hivdb Program (genotyping resistance interpretation) analysis sequences (enter complete sequences) (hivdb.stanford.edu), no qual era fornecido um relatório com todas as mutações presentes e quais possivelmente eram responsáveis por esta resistência.Além de analisar as mutações que conferem resistência aos agentes antiretrovirais, as seqüências obtidas foram utilizadas para verificar qual subtipo pertencia cada paciente. Na análise dos subtipos virais, utilizou-se a seqüência já alinhada com os programas descritos acima e lançadas no site Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov- Retrovirus Resource – Tools genotyping – Human Immunodeficiency Vírus Type 1 (HIV-1).

3.8- Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.8.1- Detecção do gene da β-globina

A amplificação do fragmento do gene da β-globina humana evidencia a viabilidade do DNA da amostra e funciona como controle da reação de PCR. A não amplificação desse gene demonstra que o DNA presente na amostra avaliada não é viável e, portanto, deve ser excluído da reação. Essa amplificação seguiu a metodologia descrita por Saiki *et al*. (1985), com algumas modificações. O produto amplificado foi usado como controle interno da reação. O fragmento obtido indicou a presença de DNA.

5,0 µl do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo 0,1µl/ml, juntamente com 2,0 µl de solução corante de azul de bromofenol. Em todas as amostras observou-se um fragmento de 110 pares de bases correspondente à região do gene flanqueada pelos "primers" utilizados demonstrados na tabela 3.

Tabela 3- Seqüência de "primers" utilizados para detecção da β-globina, com amplificação de um fragmento com 110 pares de bases.

PRIMER	SEQÜÊNCIA
PCO3+	5' CTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC 3'
PCO4+	5' TCACCACCAACTTCATCCACGTTCACC 3'

Seqüência de primers gentilmente obtida pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNESP-Botucatu e extraída de SAIKI *et al*., 1988, com algumas modificações.

As condições da reação foram:

- Desnaturação: 94ºC - 45 segundos
- Anelamento: 55ºC - 45 segundos
- Extensão: 72ºC - 1 minuto

} 35 ciclos

Os ciclos foram precedidos pôr um período de desnaturação inicial a 94ºC durante 5 minutos e, 7 minutos de extensão final a 72ºC.

3.9- Normas utilizadas para evitar contaminação das amostras

Durante a execução da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), vários cuidados foram tomados, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação nas amostras manipuladas. Os cuidados foram:

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) daquela onde amplificação foi feita.
- As amostras de fluidos humanos foram estocadas em geladeira diferentes das que armazenavam os reagentes.
- Antes da abertura de tubos tipo "eppendorf", era efetuada rápida centrifugação em microcentrifuga, para concentrar o líquido, contido no tubo, na região inferior deste e evitar a dispersão do mesmo por aerosol.
- Todo material plástico (ponteiras tubos do tipo "eppendorf") era novo e estéril, não autoclavado.
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o processo.
- Uso de hipoclorito a 10% e etanol 70%, antes e depois do uso da bancada e objetos utilizados.
- Ponteiras com filtro foram utilizadas, para se evitar a contaminação via aerosol.
- Jogo de pipetas para cada bancada.
- Sala da preparação e corrida do gel de agarose era separada das demais.
- Prática labotatorial meticulosa foi realizada.

4- RESULTADOS

Foram incluídas neste estudo, 66 amostras de crianças infectadas verticalmente pelo vírus da Imunodeficiência Humana e sob terapia antiretroviral, em seguimento clínico no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Estes pacientes já eram sabidamente HIV-1 positivos, pois apresentavam dois testes de Elisa positivos e um confirmatório, podendo ser o Western Blot ou a PCR.

A padronização da primeira PCR e da "Nested-PCR" para a amplificação da região *pol* do HIV-1 foi realizada com êxito e optou-se pela aplicação da "Nested-PCR" com a finalidade de aumentar a especificidade e sensibilidade do método. Entretanto a banda obtida, em algumas amostras, não era apropriada para o seqüenciamento, pois apresentavam rastros. Foi realizada a purificação destas bandas com o QIAquick PCR Purification Kit, da Quiagen. Após a purificação foi obtida uma banda nítida e de boa intensidade, na altura correspondente ao produto amplificado, tornando-a ideal para o seqüenciamento, conforme demostrado na figura 14. Entre as amostras, 64 apresentaram resultado adequado (amplificação de um fragmento de 1008 pb), entretanto, foi possível o seqüenciamento e posterior genotipagem viral adequada, em apenas 61 amostras. A "Nested-PCR" foi padronizada com o mesmo ciclo utilizado para a PCR.

Nas amostras para a genotipagem foram obtidas bandas de 1008 pares de base, como mostra a figura 13, ao passo que não foi amplificado nenhum fragmento no controle negativo da reação.

Tabela 4- Características dos 61 pacientes portadores do HIV-1, com possível resistência a drogas (idade e sexo).

Total de crianças	**61**
Idade (média)	7,45
Sexo (M/F)	37/24

Tabela 5- Classificação Clínica dos 61 pacientes segundo o Guia de Tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças, do Ministério da Saúde.

Classificação	Pacientes	Porcentagem (%)
A1	2	3,2
A2	4	6,5
A3	3	4,9
B1	8	13,0
B2	14	22,9
B3	6	9,8
C1	2	3,2
C2	3	4,9
C3	19	31,0

A = Crianças com sinais/sintomas leves; B = Crianças com sinais/sintomas moderados; C = Crianças com sinais/sintomas graves. 1 = Crianças com ausência de alterações imunológicas; 2 = Crianças com alterações imunológicas moderadas; 3 = Crianças com alterações imunológicas grave.

Tabela 6- Principais manifestações clínicas dos pacientes estudados.

Manifestações Clínicas	Pacientes	Porcentagem (%)
Otite Média Aguda	31	50,8
Moníliase Oral	20	32,7
Pneumonia	47	77,0
Baixo ganho pondero estatural	24	39,3
Anemia	33	54,0
Diarréia	19	31,1

Tabela 7- Carga viral dos pacientes estudados antes da terapia, no momento da realização do exame, os menores e os maiores valores obtidos.

	Valor no exame de genotipagem			MENOR VALOR			MAIOR VALOR			ANTES DOS RETROVIRAIS		
	CD4	CD8	REL	CD4	CD8	Rel	CD4	CD8	Rel	CD4	CD8	Rel
1	530	1386	0,38	246			848			113		
2	753	1118	0,67	734			1127			1127	1852	0,60
3	319	1124	0,28									
4	334	2266	0,15	118	1200	0,12	576					
5	1364	889	1,53	234	172	1,36	4825	2970	1,62	4825	2970	1,62
6	585	1035	0,57	812			1215			1215	1278	1,00
7	125	3000	0,04	8	933	0,01	1013	2000	0,51			
8	565	991	0,57	34	722	0,50	783	1859	0,42	194	1268	0,20
9	560	981	0,57	407	1298	0,31	882	1166	0,76	626	1549	0,40
10	643			337	1100	0,34	643	1982	0,32	502	1162	0,43
11	928	1834	0,51	928	1834	0,51	1931	2000	0,97	1545	2870	0,54
12	127	931	0,14	127	931	0,14	694	1163	0,60	694	1163	0,60
13	290	540	0,57	282	1083	0,26	1665			954	2000	0,48
14	184	1150	0,16	26	1026	0,03	4019	2070	0,49	1019	2070	0,49
15	514	1471	0,35	400	1390	0,29	813	1579	0,51	425	1270	0,30
16	955	970	0,98	741	1642	0,45	1567	1177	1,33	741	1642	0,45
17	626	1054	0,59	563	1587	0,35	1020	1355	0,75	854	1954	0,44
18	796	2000	0,40	614			1635			801	1818	0,44
19	523	2000	0,26	373	890	0,42	625	1664	0,38	449	1981	0,23
20	204	244	0,84	84	111	0,76	226	180	1,26	172	893	0,19
21	162	1029	0,16	37	553	0,07	793	1354	0,59	793	1354	0,59
22	985	1068	0,92	857	1811	0,47	2000	1754	1,14	2791	3102	0,90
23	267	864	0,31	24			263			125	1345	0,09
24	79	273	0,29	79	273	0,29	235	585	0,4	235	585	0,4
25	364	1078	0,34	259	594	0,44	733	1702	0,43	626	1429	0,44
26	1535	1698	0,90	955	1073	0,89	2437	1470	1,65			
27	825	1140	0,72	456	963	0,47	1981	3147	0,60	1351	1437	0,90
28	478	2022	0,24	52	479	0,10	484	1884	0,26	123	977	0,12
29	510	731	0,70	445	610	0,33	817	818	1,00	477	929	0,51
30	859	1562	0,55	151	284	0,53	2040	3910	0,52	2040	3910	0,52
31	316	923	0,34									
32	454	1183	0,38	285	974	0,29	1120	2000	0,56	579	2524	0,20
33	674	1707	0,39	423	1233	0,34	2636	4889	0,54	2636	4889	0,54
34	275	982	0,28	123	416	0,29	535	255	1,5	426	898	0,50
35	546	1299	942	388	852	0,46	721	979	0,74	411	2000	0,21
36	28	604	0,05	28	604	0,05	1863	3056	0,61	549	2994	0,20
37	645	748	0,80	645			1067			811	2124	0,38
38	439	600	0,67	439	600	0,67	2392	1613	1,48	1273	1259	1,01
39	1476	957	1,54	1190			1852			1316	1388	0,9
40	453	1665	0,27	453	1665	0,27	1222			461	2000	0,23

41	967	1023	0,95	625	868	0,72	1425	2865	0,50	1425	2865	0,50
42	821	2000	0,41	729	1291	0,56	1336			729	1291	0,56
43	814	2156	0,38	661	1773	0,37	1686	2000	0,84	1380	5435	0,25
44	1085	2000	0,54	580	1365	0,42	2285	2295	1,00	817	625	1,30
45	607	1831	0,33	159	131	0,11	2400	3130	0,77	607	1831	0,33
46	567	627	0,90	100	1095	0,09	1067	1763	0,60			
47	467	1678	0,28	299	1365	0,22	1071	2000	0,54			
48	161	1038	0,16	146	550	0,27	161	1038	0,16			
49	540	2000	0,27	406	1001	0,41	1135	1734	0,65	603	1472	0,40
50	395	2000	0,20	306	2000	0,15	530	2246	0,24	307		0,07
51	475	875	0,54	475	875	0,54	528	649	0,81			
52	241	1087	0,22	191	951	0,20	640	1303	0,49	371	1130	0,32
53	1852	1931	0,96	1114	1135	0,98	2752	2562	1,07	2752	2562	1,07
54	528	1387	0,38	440	1227	0,36	980	2671	0,40	980	2671	0,40
55	457	1159	0,39	311	1292	0,24	967	4021	0,24	499	1959	0,24
56	954	2000	0,50	505	1766	0,29	1613	3771	0,40	1613	3771	0,40
57	1285	1578	0,81	937	1773	0,53	2055	1733	1,20	2055	1733	1,20
58	6	352	0,02	6	352	0,02	1570	1505	1,04	123	1429	0,09
59	876	1733	0,51	60	738	0,08	1143	1668	0,69	183	1452	0,13
60	1206	2000	0,60	790	2000	0,40	1496	2000	0,75	1103	1222	0,55
61	395	235	1,68	100	90	1,11	1630	860	1,90	1560	1380	1,13

De acordo com o estudo deveriam ser realizadas quatro coletadas de cada paciente. Isto não foi possível devido a disponibilidade e a desistência de alguns pacientes, portanto foi utilizada apenas uma coleta. A tabela mostra apenas os dados dos pacientes que foi possível a genotipagem (sessenta e um).

Tabela 8- CD4, CD8 e a relação destes valores dos pacientes estudados em quatro ocasiões (antes da terapia, no momento da realização do exame de genotipagem, os menores e os maiores valores).

	MENOR VALOR		MAIOR VALOR		VALOR NA COLETA		ANTES DO RETROVIRAL	
	Cópias/ml	Log						
1			3100000	6,50	3100000	6,50	1900000	6,30
2	190	2,30	7400	4,90	13874	4,10	2800	4,40
3					9777	4,00		
4	2333	3,40	221489	5,30	158230	5,20	sem dados	
5	Indetectável		>12000000	7,10	Indetectável		>12000000	7,10
6	66	1,80	620000	5,80	72	1,90	620000	5,80
7	4483	3,70	4900000	6,70	45193	4,70	4900000	6,70
8	Indetectável		1400000	6,10	5482	3,70	sem dados	
9	Indetectável		270000	5,40	9580	4,00	270000	5,40
10	10000	4,00	2800000	6,40			2000000	6,30
11	98	2,00	1600000	6,20	23301	4,40	1600000	6,20
12	Indetectável		1600000	6,20	13281	4,10	790000	5,90
13	2425	3,40	950000	6,00	26543	4,40	950000	6,00
14			370000	5,60	3324	3,50	370000	5,60
15	3500	3,50	270000	5,50	5204	3,70	270000	5,50
16	2760	3,40	150000	5,20	3476	3,50	130000	5,10
17	689	2,30	160000	5,20	36341	4,60	160000	5,20
18	58	1,80	89349	5,00	77738	4,90	9500	4,00
19	Indetectável		76000	4,90	22272	4,30	54000	4,70
20	265	2,40	584	3,40	2584	3,40	Sem dados	
21	Indetectável		370000	5,60	26034	4,40	180000	5,30
22	3653	3,60	2100000	6,30	14360	4,10	160000	5,20
23					16144	4,20	29000	4,50
24	15019	4,20	>500000	5,70	15019	4,20	>5000000	5,70
25	131	2,10	14000	5,10	29875	4,50	140000	5,10
26					599	2,80		
27	2945	3,50	53000	4,70	3830	3,60	53000	4,70
28	4539	3,70	160000	5,20	15459	4,20		
29	Indetectável		74000	47,90	14440	4,20	74000	4,90
30	2434	3,40	110000	5,00	2434	3,40	110000	5,00
31					40040	4,60		
32	1100	3,00	4788130	7,00	4100	3,60	320000	5,50
33	140	2,10	1200000	6,10	84923	4,90	1200000	6,10
34	290	2,50	460000	5,40	19145	4,30	460000	5,40
35	Indetectável		32000	4,50	Indetectável		32000	4,50
36	44516	4,60	2800000	6,40	133682	5,10	2800000	6,40
37					21149	4,30	91000	4,90
38	2054	3,30	120000	5,10	3032	3,50	120000	5,10
39	Indetectável		530000	5,70	7199	3,90		

40					8380	3,90	88000	4,90
41	Indetectável		2800000	6,40	28277	4,50	2800000	6,40
42					43600	4,60	210000	5,30
43	830	2,90	71000	4,90	14977	4,20	830	2,90
44	Indetectável		4600000	6,60	20689	4,30	4600000	6,60
45	4652	3,70	9500	4,90	7378	3,90	9500	4,90
46	2989	3,50	28000	4,40	13569	4,10		
47	592	2,80	105308	5,00	18967	4,30	4400	3,60
48	900	2,90	84936	4,90	84936	4,90		
49	3400	3,50	85000	4,90	9341	4,00	41000	4,60
50	846	2,90	170000	5,20	3088	3,50	10000	4,00
51	3180	3,50	15604	4,20	114000	4,10		
52	Indetectável		220000	5,40	13681	4,10	37000	4,56
53	1439	3,20	180000	5,20	9537	4,00	850000	6,00
54	9929	4,00	110000	5,00	29293	4,50	31000	4,50
55	19299	4,30	1600000	6,20	35146	4,50	1600000	6,20
56	340	2,50	700000	5,80	3929	3,60	52000	4,80
57	1127	3,10	68000	4,80	2133	4,00	33000	4,50
58	99000	5,00	4000000	6,60	427183	5,60	220000	5,34
59	80	1,90	909	3,00	909	3,00		
60	6031	3,80	710000	5,90	20320	4,30	710000	5,90
61	2100	3,30	400000	5,60	2153	3,30	400000	5,60

As informações referentes aos pacientes estudados foram obtidas através da análise do prontuário médico. Alguns pacientes não apresentam valor devido à dificuldade de consulta de seu prontuário médico, pois eram pacientes com maiores complicações clínicas. A carga viral da maioria dos pacientes apresentava um valor alto, com valores baixos de contagem de células CD4+.

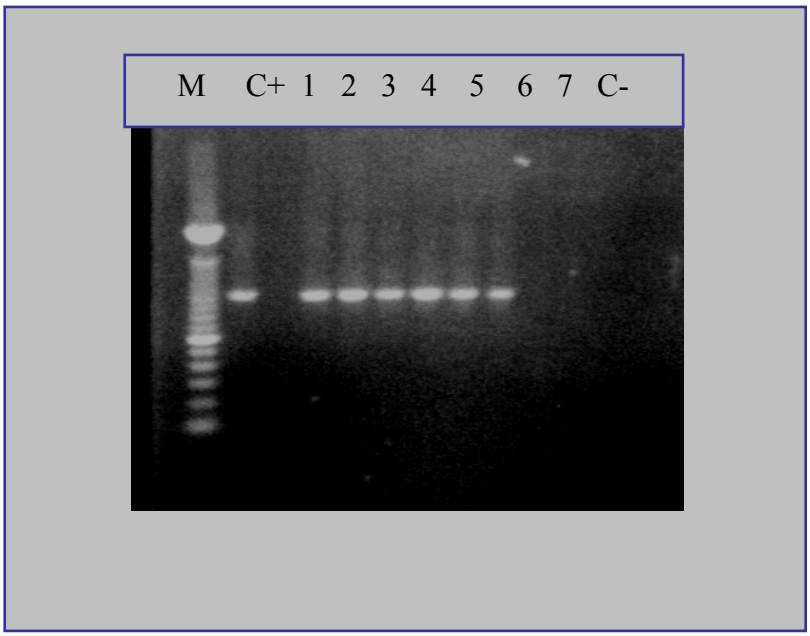


Figura 12- Foto da amplificação das amostras pré-purificação. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, demonstrando a amplificação de um fragmento de 1008 pb do DNA do HIV-1 com os primers DP16 e RT10 (produtos da Nested-PCR") em crianças infectadas verticalmente pelo HIV-1. **M** (Marcador de peso molecular -Ladder 100 pb, Gibco-BRL -LIFE TECHNOLOGIES$_{TM}$, USA); **C+** (controle positivo da reação; **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7** (Pacientes positivos para HIV-1); **C-** (Controle negativo).

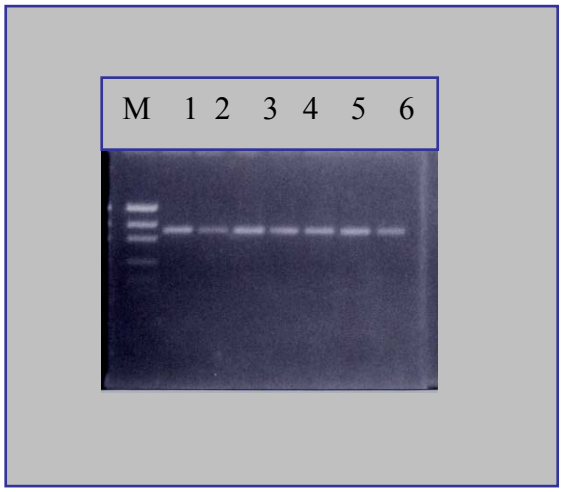


Figura 13- Foto da amplificação pós- purificação. Amplificação de 1008 pb do DNA do HIV-1 com os primers DP16 e RT10 (produtos da Nested-PCR") com a realização da purificação para maior especificidade e sensibilidade da técnica. **M** (Quantificador de peso molecular- Low DNA Mass Ladder Invitrogen- Life Tecnologies); **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7** (Pacientes positivos para o HIV-1).

Genotipagem do HIV-1 através do Seqüenciamento gênico

O seqüenciamento gênico da região do gene da protease e da transcriptase reversa, além de comprovar que o produto amplificado visualizado em gel pertencia ao HIV-1, também permitiu a caracterização dos diferentes subtipos virais. Na análise das seqüências foram encontrados dois subtipos do HIV-1, B, F e recombinantes B/F, que são prevalentes no Brasil.

Quadro 1- Seqüência de DNA amplificada da região do gene da protease e da transcriptase reversa do HIV-1

1744↓

.....caactcc ccctcagaag caggagccga tagacaagga actgtatcct ttaacttccc
tcaggtcact ctttggcaac gacccctcgt cacaataaag ataggggggc aactaaagga
agctctatta gatacaggag cagatgatac agtattagaa gaaatgagtt tgccaggaag
atggaaacca aaaatgatag ggggaattgg aggttttatc aaagtaagac agtatgatca
gatactcata gaaatctgtg gacataaagc tataggtaca gtattagtag gacctacacc
tgtcaacata attggaagaa atctgttgac tcagattggt tgcactttaa attttcccat
tagccctatt gagactgtac cagtaaaatt aaagccagga atggatggcc caaaagttaa
acaatggcca ttgacagaag aaaaaataaa agcattagta gaaatttgta cagagatgga
aaaggaaggg aaaatttcaa aaattgggcc tgaaaatcca tacaatactc cagtatttgc
cataaagaaa aaagacagta ctaaatggag aaaattagta gatttcagag aacttaataa
gagaactcaa gacttctggg aagttcaatt aggaatacca catcccgcag ggttaaaaaa
gaaaaaatca gtaacagtac tggatgtggg tgatgcatat ttttcagttc ccttagatga
agacttcagg aagtatactg catttaccat acctagtata aacaatgaga caccagggat
tagatatcag tacaatgtgc ttccacaggg atggaaagga tcaccagcaa tattccaaag
tagcatgaca aaaatcttag agccttttag aaaacaaaat ccagacatag ttatctatca
atacatggat gatttgtatg taggatctga cttagaaata gggcagcata gaacaaaaat
agaggagctg agacaacatc tgttgaggtg gggacttacc acaccagaca aaaaacatca
gaaagaacct ccattcctt ggatgggtta tgaactccat cctgataaat ggacagtaca
gccta.....

Quadro 1- Seqüência utilizada para a genotipagem

Legenda referente ao Quadro 01

Seqüência do "primers sense" – em cor azul

Seqüência do "primers antisense" – em cor rosa

As setas numeradas correspondem a posição do nucleotídeo inserido na seqüência

Das 61 amostras analisadas, 51 apresentaram-se como portadoras do subtipo B, 4 do subtipo F e 5 do recombinante B/F do HIV-1 (Tabela 09).

Tabela 9- Resultado da subtipagem do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) em pacientes infectados, através da utilização do "primers" sense.

Paciente	Subtipo (Stanford)	Subtipo (Genbank)	Número de seqüências descritas comparadas
001	B	B	117
066	B	B	117
054	B	B+CRF12, 07 e 03	117
165	B	B	117
124	B	B +CRF03 e 07/F	117
153	B	B+ F1+CRF12+F2+A2+D	117
126	B	B+ G+CRF 06 e 13	117
145	B	B	117
067	B	B+CRF08 e 16	117
017	B	F1+J+CRF09 e 12	117
074	B	B+CRF03 e 12	117
142	B	B	117
065	B	B+CRF03 e 12	117
068	B	B +CRF12	117
171	B	B+D+CRF12	117
157	B	B+CRF08 e 12	117
169	B	B	117
159	B	B	117
057	B	B	117
167	B/F	B+ F1 + CRF12	117
146	B	B + CRF08	117
174	F	F1+F2+CRF05 e12	117
133	B	B+ CRF03	117
155	B/F	B+ F1+ CRF12	117
150	F	F1+F2+CRF01 e 05	117
076	B	B+ CRF03 e12	117
176	B	B + CRF07	117

Paciente	Subtipo (Stanford)	Subtipo (Genbank)	Número de seqüências descritas comparadas
141	B	B+CRF12+A2	117
064	B	B	117
035	B	B+F1+G+CRF03,12 e 16	117
179	B	F1+CRF12	117
123	B	B+CRF12	117
148	B	B+CRF07 e 08	117
140	B	B	117
087	B/F	B	117
036	F	F1+CRF05+F2	117
158	B	B + CRF12	117
170	B	B+ CRF08	117
147	B	B+ CRF03	117
042	B/F	B+ F1+CRF 06 e 09	117
056	B	B	117
131	B	B	117
008	F	A1+CRF04, 09 e 10	117
173	B	B + CRF12	117
130	B/F	B+ F1+CRF04, 09 e 16	117
168	B	B	117
110	B	B+CRF03	117
143	B	B + CRF08	117
043	B	B+CRF12 e 16	117
101	B	B+ CRF03 e 12	117
135	B	B+ crf03 E 12	117
161	B	D+CPZ+ CRF08	93
034	B	B	117
156	B	B+CRF07	116
134	B	B+ CRF03, 07 e 08	117
175	B	B	117
154	B	B+CRF08 e 11	117
115	B	B+ CRF08	117
016	B	B + CRF12	117
047	B	B	117

CRF = Formas recombinantes em circulação do HIV (Circulating recombinant forms).

As seqüências obtidas tiveram analogia com uma média de 117 seqüências descritas no GenBank.

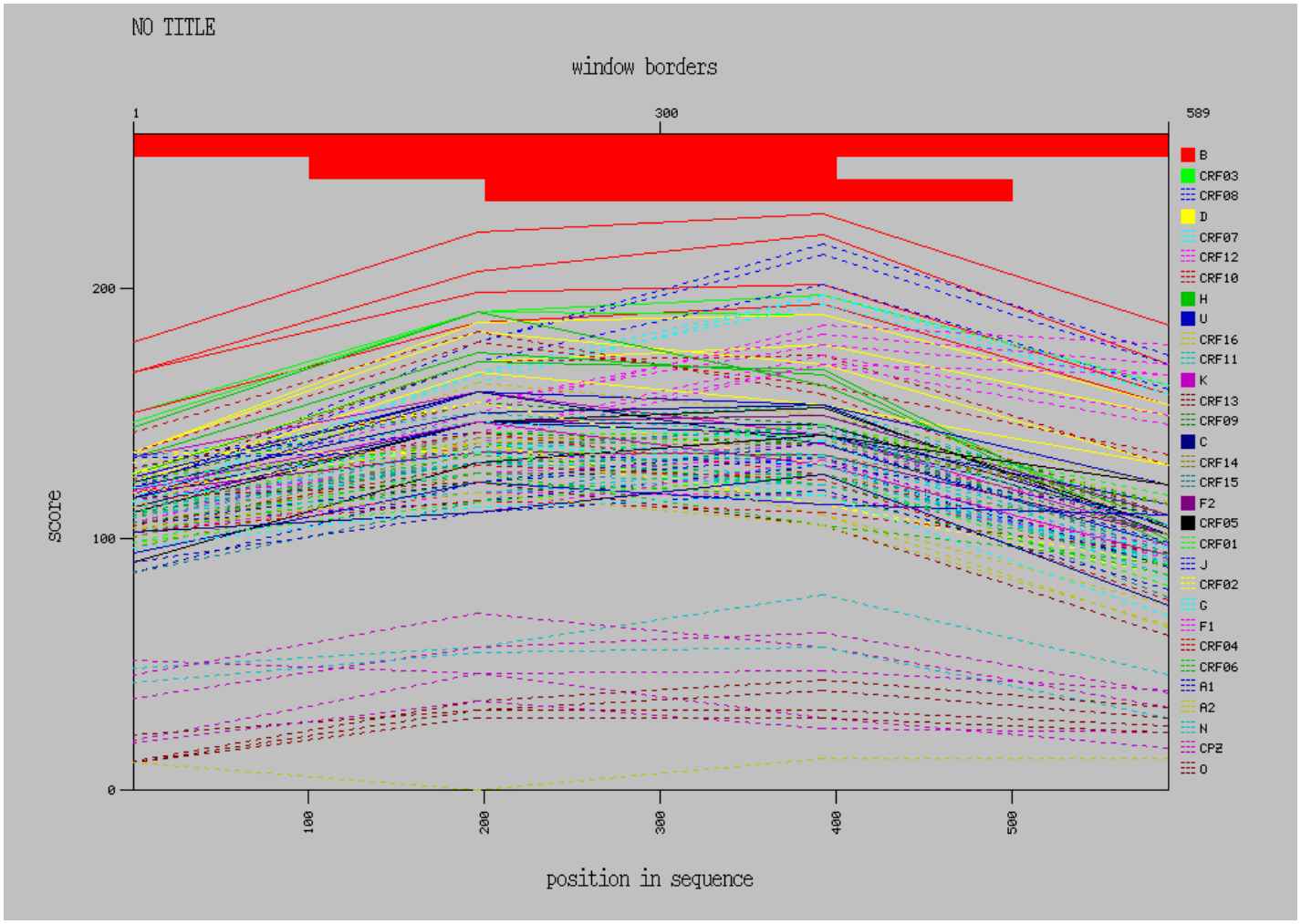


Gráfico 2- Gráfico demonstrativo da presença predominante do Subtipo B do HIV-1 em amostra do paciente 730184-9 através da análise comparativa com seqüências descritas no genbank, acesso em: (www.ncbi.nlm.nih.gov) – Retrovírus resource – Tools genotyping – Human Immunodeficiency Vírus Tipe I (HIV-1).

As seqüências foram expressas em cromatógrafo, que faz parte da composição do seqüenciador automático Megabace 1000, como mostra a figura 14.

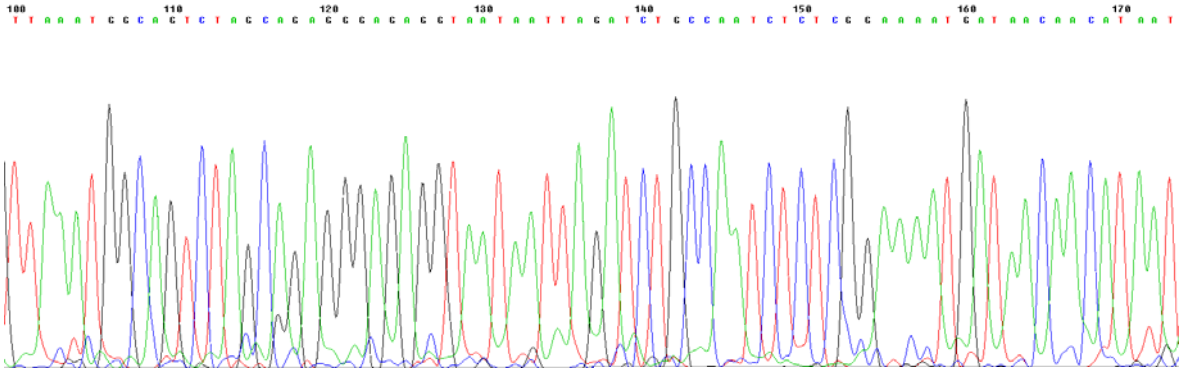


Figura 14- Cromatografia da seqüência obtida pelo seqüenciador automático Megabace 1000, de paciente, indicando a presença do Subtipo B do HIV-1, após analogia com seqüências descritas no GenBank.

4.1- Resistência às drogas antiretrovirais

Figuras 15, 16 e 17. Eletroferogramas referentes a mutações no gene da Transcriptase Reversa.

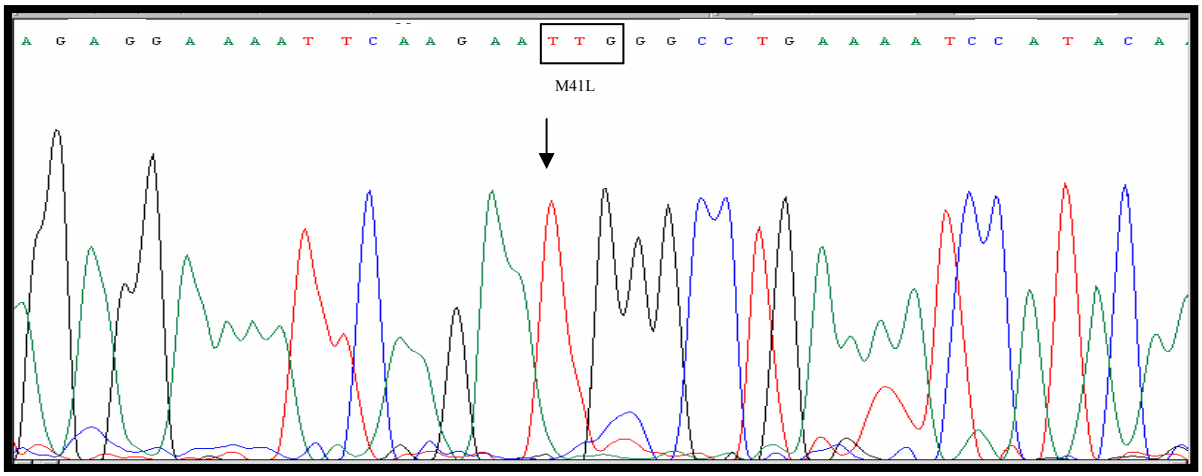


Figura 15- Cromatograma representando o seqüenciamento automatizado para a região da Transcriptase reversa. (A) Amostra do paciente 076 com a troca do aminoácido metionina (M) para leucina (L), que confere resistência ao gene da transcriptase reversa.

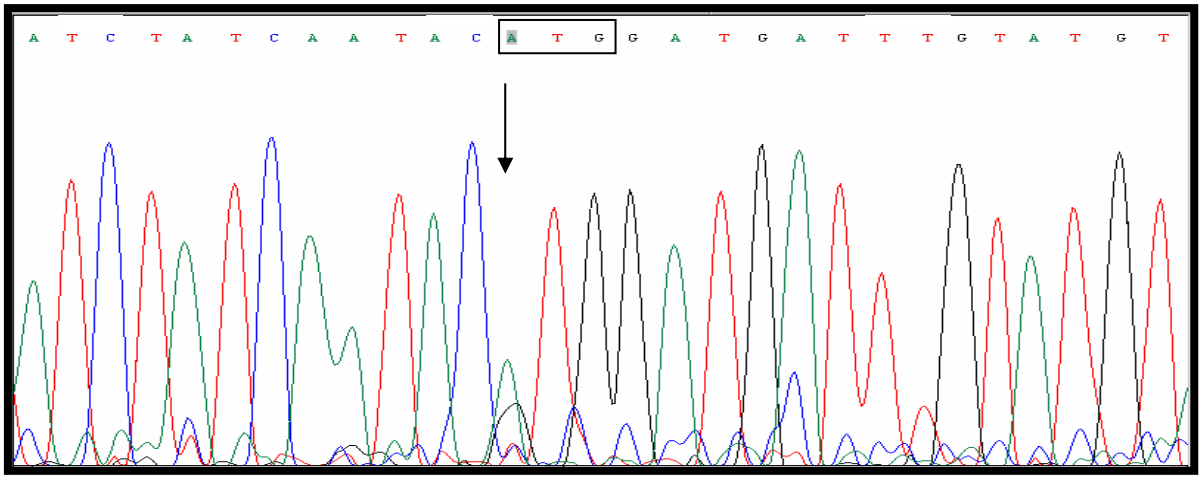


Figura 16- Cromatograma do paciente 068 da região que apresenta mutação que confere resistência ao gene da transcriptase reversa. Neste seqüenciamento não há mudança no códon 184, portanto sem alteração da proteína formada.

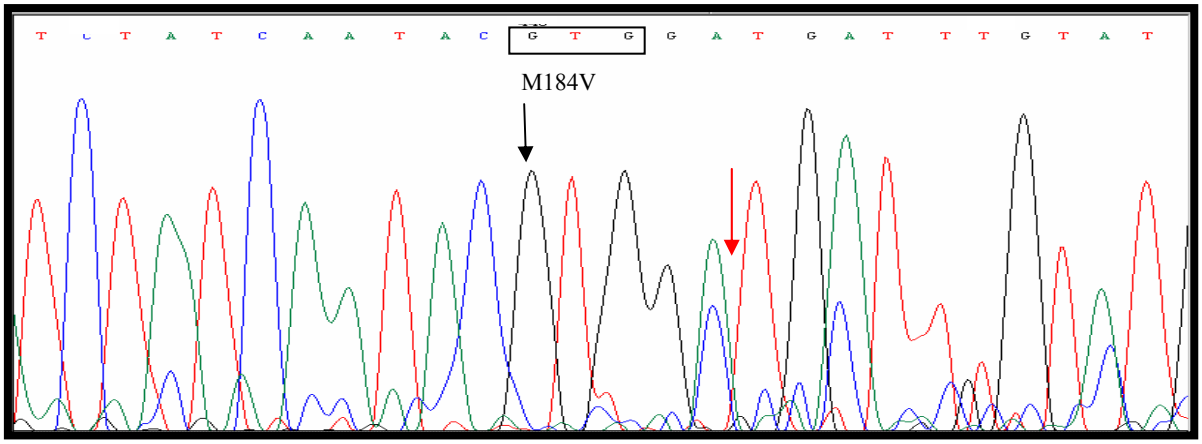


Figura 17- Cromatograma do paciente 066 da região que apresenta mutação que confere resistência ao gene da transcriptase reversa. Este seqüenciamento mostra a mudança do aminoácido de metionina (M) para valina (V), conferindo resistência ao inibidor da transcriptase reversa Lamivudina. A seta em vermelho mostra que o paciente é heterozigoto.

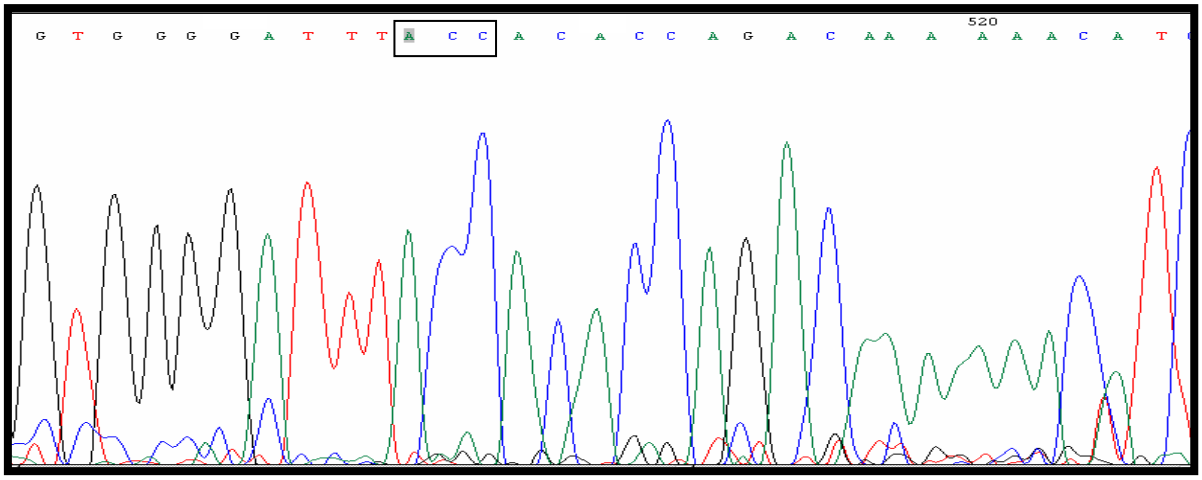


Figura 18- Cromatograma representando o seqüenciamento automatizado para a região da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Amostra do paciente 035 sem mutação no códon 215.

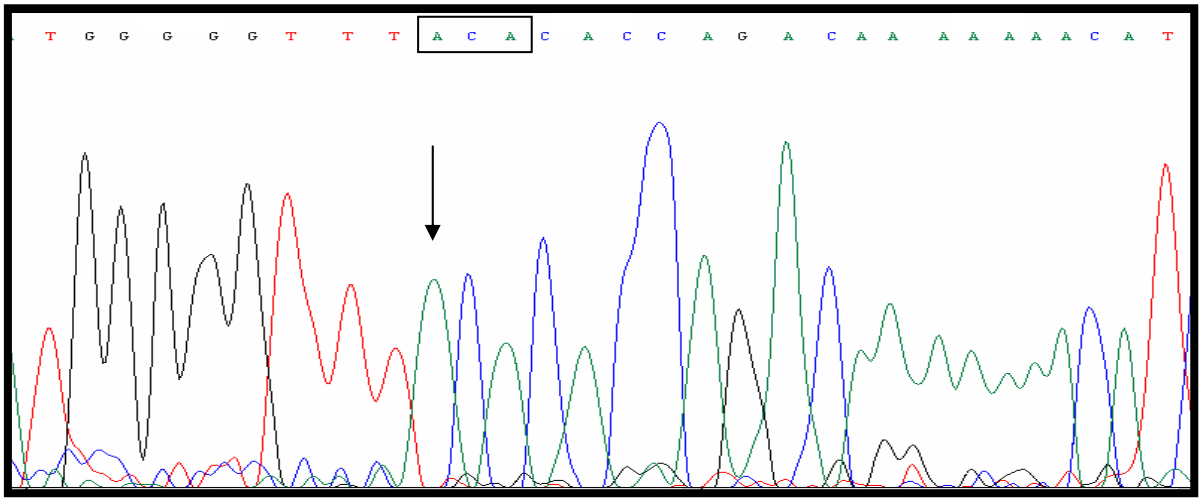


Figura 19- Cromatograma representando o seqüenciamento automatizado para a região da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Amostra do paciente 068 sem mutação no códon 215.

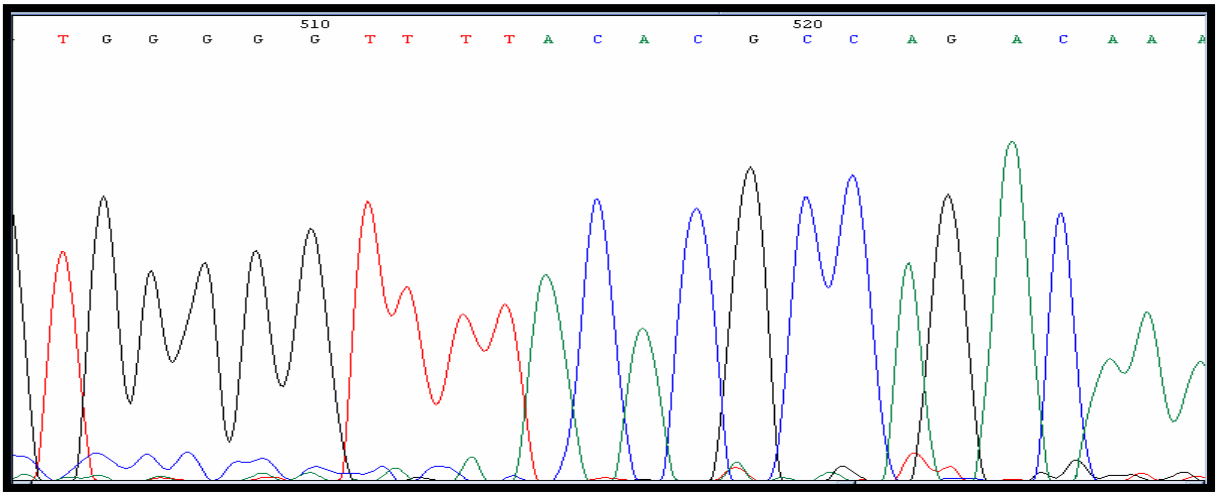


Figura 20- Cromatograma representando o seqüenciamento automatizado para a região da transcriptase reversa do vírus HIV-1. Amostra do paciente 016 com a mutação no códon 215, com mudança do aminoácido de triptofano para tirosina, conferindo resistência ao gene da transcriptase reversa.

Figuras 21 e 22. Eletroferogramas referentes as mutações no gene da protease

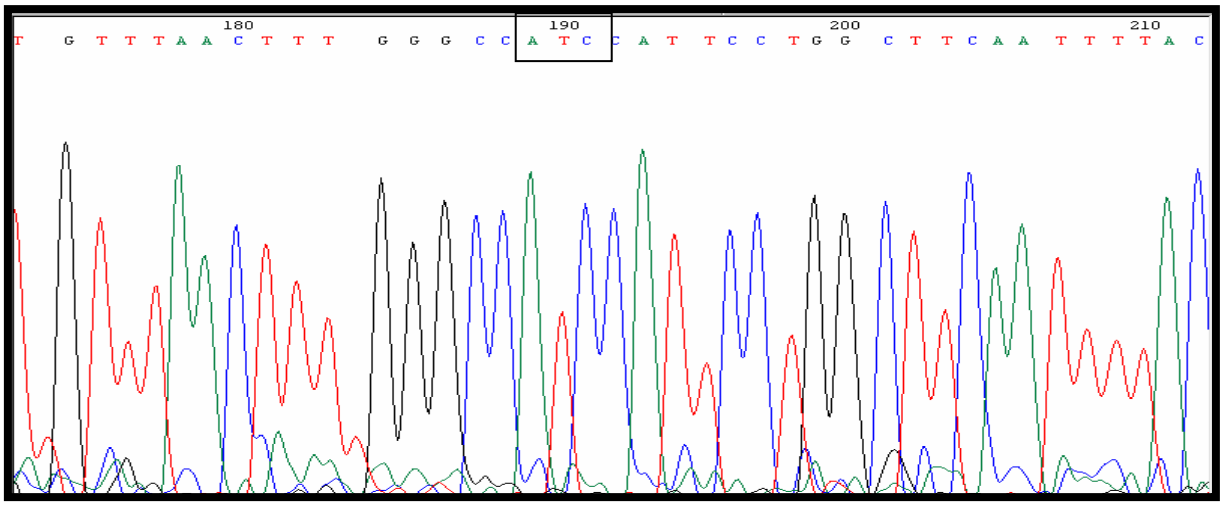


Figura 21- Cromatografia da seqüência obtida pelo seqüenciador automático MegaBace 1000, de paciente analisado (016), da região da Protease, indicando a presença da mutação M36I, com troca do aminoácido metionina para prolina. Esta mutação, na presença de outras mutações confere resistência aos inibidores da Protease.

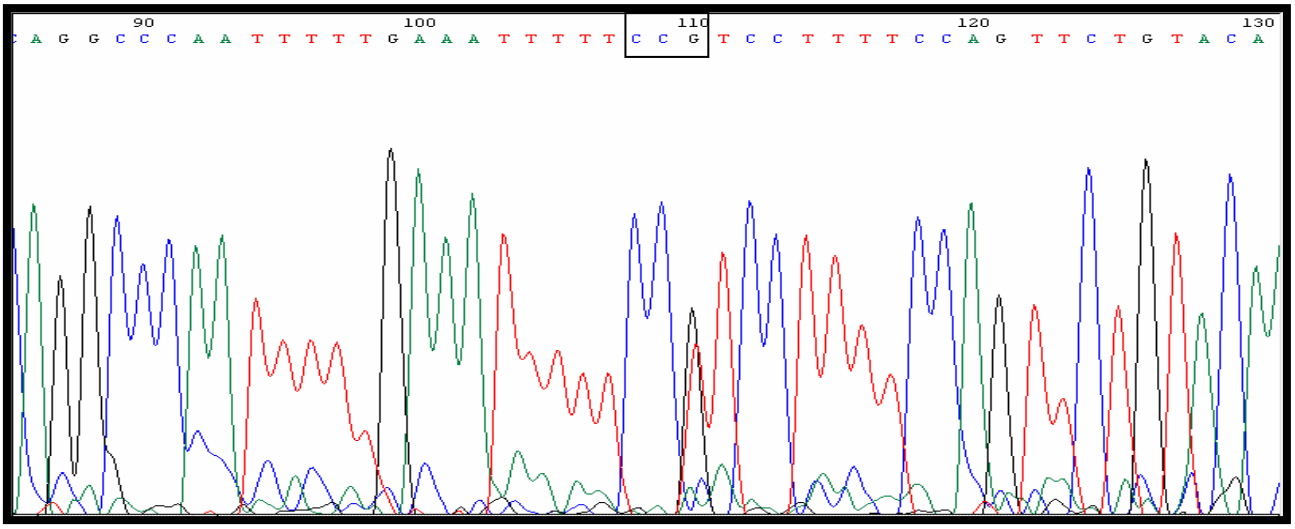


Figura 22- Cromatografia da seqüência obtida pelo seqüenciador automático MegaBace 1000, de paciente analisado, da região da Protease, indicando a presença do polimorfismo L63P, com troca do aminoácido leucina para prolina. Este polimorismo, na presença de outras mutações confere resistência aos inibidores da Protease

Tabela 10- Principais mutações apresentadas referente aos inibidores de transcriptase reversa.

Mutações RT	Ocorrências	Subtipo	Porcentagem (%)
A62A	1	B	1,6
A62V	3	B	4,9
A98G	3	F, B	4,9
D67E	2	B	3,3
D67N	17	B/F, F, B	27,9
E44A	2	B	3,3
E44D	7	B/F, F, B	11,5
E44E	2	F, B	3,3
F116Y	2	B	3,3
F77L	1	B	1,6
G190A	2	B	3,3
G190Q	1	B	1,6
K101E	3	B	4,9
K101K	1	B/F	1,6
K101T	1	B/F	1,6
K103N	5	B/F, B	8,2
K103R	1	B	1,6
K103S	1	B	1,6
K219N	1	B	1,6
K219Q	2	B	3,3
K70R	11	F, B	18,0
L210W	13	B/F, F, B	21
L74I	1	B	1,6
M184V	26	B/F, F, B	42,6
M41L	24	B/F, F, B	39,3
M41M	1	B/F,	1,6
Q151L	1	B	1,6
Q151M	2	B	3,3
T215F	1	B	1,6
T215N	2	B	3,3
T215S	2	B	3,3
T215T	2	B	3,3
T215V	1	B	1,6
T215X	1	B	1,6
T215Y	16	B/F, B	26,2
T69A	2	B	3,3
T69D	5	B/F, B	8,2
T69G	2	B	3,3
T69I	1	B	1,6
T69N	4	B	6,6
T69S	3	B	4,9

Mutações RT	Ocorrências	Subtipo	Porcentagem (%)
T69T	2	B	3,3
V106I	2	F	3,3
V106M	1	B	1,6
V108I	1	B	1,6
V118I	6	B	9,8
V118V	1	B	1,6
V179D	1	B	1,6
V75I	1	B	1,6
V75M	3	F, B	4,9
Y181C	2	F, B	3,3
Y181S	1	B	1,6
Y181Y	1	B	1,6
Y188N	1	B	1,6
Y188Y	1	B	1,6

A = Alanina; G= Glicina; V= Valina; L= Leucina; I= Isoleucina; S= Serina; C= Cisteína; M= Metionina; Y= Tirosina; F= Fenilalanina; W= Triptofano; H= Histidina; R= Arginina; K= Lisina; D= Aspartato; E=Glutamato; N= Asparagina; Q= Glutamina; P= Prolina; T= Treonina.

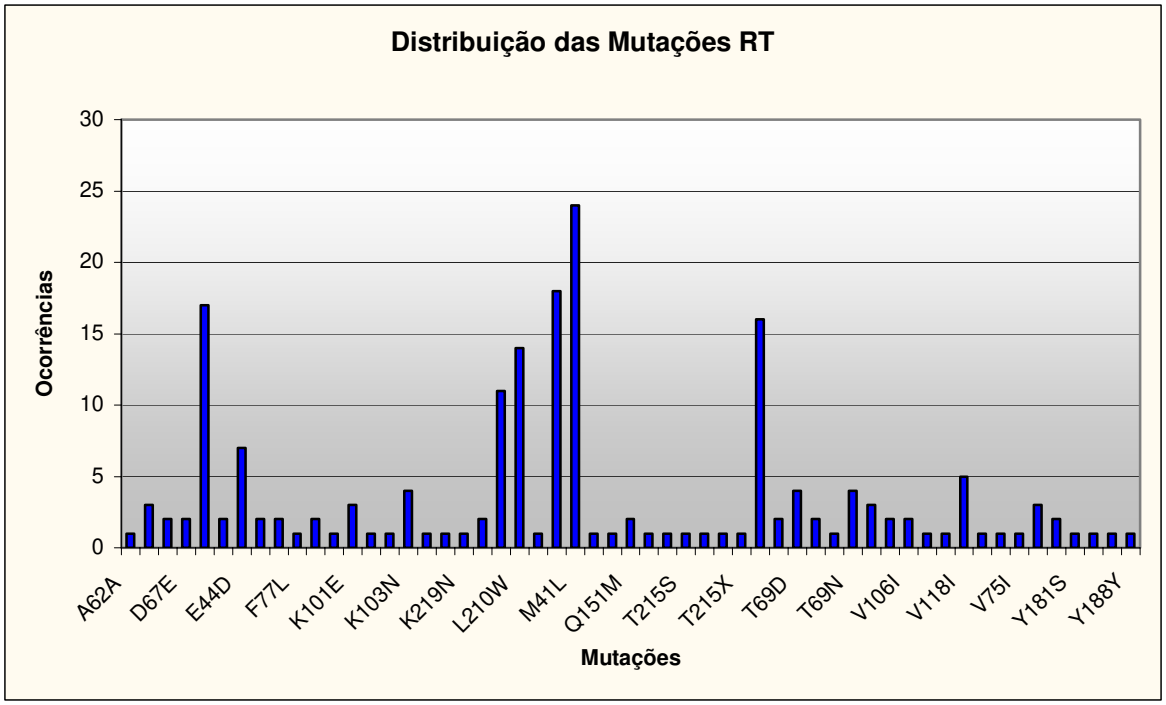


Gráfico 3- Prevalência das mutações encontradas no gene da Transcriptase reversa, dos pacientes estudados.

Tabela 11- Principais mutações apresentadas referentes aos inibidores de protease.

Mutação IP	Ocorrências	Subtipo	Porcentagem (%)
A71A	1	B	1,6
A71I	2	B	3,3
A71T	4	B	6,6
A71V	4	F, B	6,6
D30N	6	B/F, B	9,8
D60E	6	B/F, F, B	9,8
G73A	2	B	3,3
G73C	1	B	1,6
I50V	1	B	1,6
I54V	9	B	14,8
I93F	1	F	1,6
I93I	2	F, B	3,3
I93L	15	F, B	24,6
I93V	1	F	1,6
K20I	3	B	4,9
K20K	2	B	3,3
K20M	1	B	1,6
K20P	4	B	6,6
K20R	8	B/F, B	13,1
K20T	4	F, B	6,6
L10I	6	B	9,8
L10L	1	B	1,6
L10V	2	B	3,3
L33F	2	B	3,3
L33I	1	B	1,6
L33M	1	B	1,6
L33V	1	B	1,6
L63A	2	B	3,3
L63H	4	B	6,6
L63L	4	FB	6,6
L63P	26	F, B	42,6
L63S	1	B	1,6
L63T	2	B	3,3
L90L	3	B/F, B	4,9
L90M	20	B/F, F, B	32,8
M36I	20	B/F, F, B	32,8
M36L	1	B	1,6
M36V	2	B	3,3
M46I	5	B	8,2
M46L	2	B	3,3
N88D	5	B/F, B	8,2
N88S	1	F	1,6
V32I	3	F, B	4,9

Mutação IP	Ocorrências	Subtipo	Porcentagem (%)
V771	18	B/F, F, B	29,5
V82A	10	B/F, B	16,4
V82M	2	B	3,3

A = Alanina; G= Glicina; V= Valina; L= Leucina; I= Isoleucina; S= Serina; C= Cisteína; M= Metionina; Y= Tirosina; F= Fenilalanina; W= Triptofano; H= Histidina; R= Arginina; K= Lisina; D= Aspartato; E=Glutamato; N= Asparagina; Q= Glutamina; P= Prolina; T= Treonina.

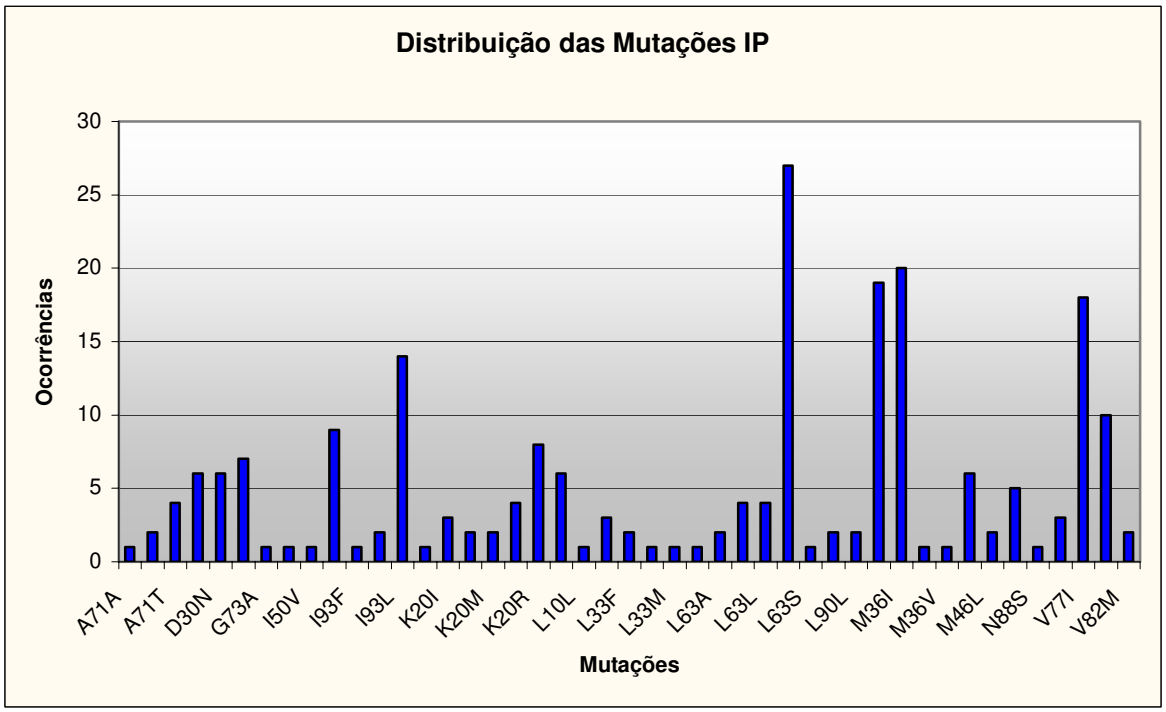


Gráfico 4- Prevalência das mutações encontradas no gene da Protease, dos pacientes estudados.

Gráficos 05, 06 e 07. Demonstração do uso das classes de antiretrovirais utilizadas no momento da realização do exame de genotipagem:

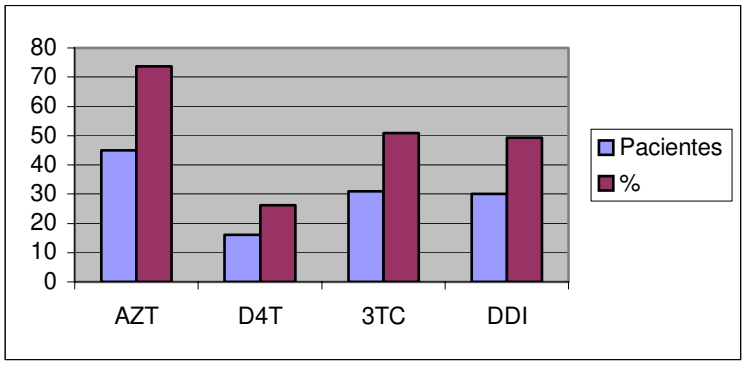


Gráfico 5- Classe dos Inibidores Nucleosídicos da Transcriptase Reversa;

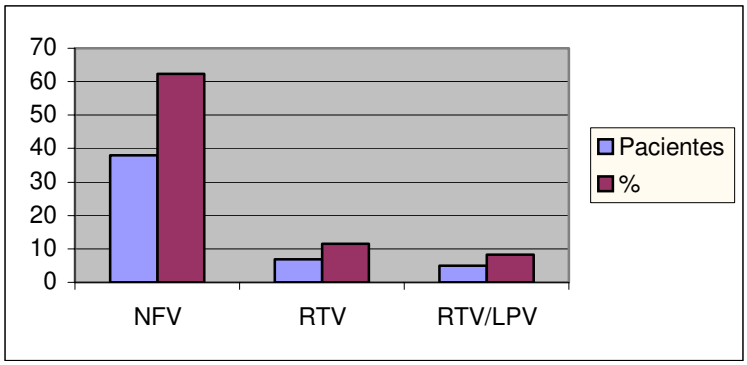


Gráfico 6- Classe dos Inibidores da Protease;

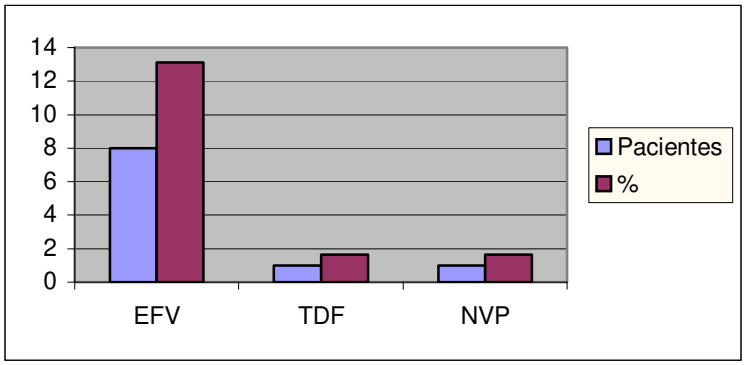


Gráfico 7- Classe dos Inibidores Não- Nucleosídicos da Transcriptase Reversa;

Tabela 12- Tabela das drogas antiretrovirais utilizadas por cada paciente desde o nascimento.

Paciente	INRT's	IP's	INNRT's
01	DDI*, D4T*	NFV, IDV, RTV, LPV+RTV*	NVP
02	D4T, DDI, 3TC*,AZT*	NFV*, LPV+RTV	
03	AZT*, DDI*,D4T	NFV	
04	DDI*, D4T*	NFV, RTV, LPV+RTV*	EFV*
05	DDI*, AZT*, D4T	LPV+RTV, RTV*	
06	AZT*, 3TC*	NFV*	
07	AZT*, 3TC*, DDI, D4T	RTV, NFV, RTV+LPV*	EFV, TDF*
08	3TC*, AZT, DDI, D4T*	NFV*, RTV	EFV*
09	3TC, AZT*, DDI*	NFV	EFV
10	AZT*, DDI*	NFV*	
11	AZT*, 3TC*	NFV*, RTV	
12	DDI, AZT*, 3TC*	NFV*, RTV, RTV+LPV	TDF, EFV
13	D4T, DDI 3TC*, AZT*	NFV*	EFV
14	AZT, 3TC*, DDI, D4T*	RTV, NFV*, PLV+RTV	
15	AZT*, DDI*		
16	AZT*, DDI*	RTV*	
17	AZT*, DDI*	NFV*	
18	AZT*, DDI, 3TC*	RTV, NFV*	
19	3TC, DDI*, AZT*	NFV*	EFV
20	AZT, DDI*, D4T*	NFV*	
21	D4T, 3TC, DDI*, AZT*	NFV*, LPV	
22	AZT, DDI, 3TC*, D4T*	NFV*	NVP*
23	AZT*, 3TC*, DDI	RTV+LPV, NFV	
24	AZT, D4T*, 3TC*, DDI	NFV, LPV+RTV*	EFV
25	3TC, DDI*, AZT*	NFV	
26	AZT*, DDI*	NFV*	
27	AZT*, 3TC, DDI*		
28	3TC*, D4T*, ABC	NFV*, LPV+RTV	EFV*
29	DDI, AZT*, 3TC*	NFV*	EFV
30	AZT, 3TC*, D4T*, DDI	NFV*	
31	AZT, 3TC, DDI*, D4T*	RTV+LPV, NFV*, RTV	
32	AZT*, DDI*	NFV*	
33	AZT*, 3TC*, DDI, D4T	NFV*	EFV
35	AZT*, 3TC*	NFV*	
36	AZT*,3TC, DDI*	RTV*, NFV	
37	AZT, 3TC, DDI*, D4T*	RTV, NFV*	
38	3TC*, D4T*, DDI, AZT	NFV*	
39	DDI*, D4T*	NFV*	
40	AZT*, DDI*	NFV	EFV*
41	D4T, AZT*, DDI*, 3TC	RTV, NFV, LPV+RTV	EFV
42	AZT*, 3TC*, DDI	NFV*	

Paciente	INRT's	IP's	INNRT's
43	AZT*, DDI*, ABC, 3TC	NFV*, LPV+RTV	NVP
44	AZT*, DDI*	NFV*	
45	DDI*, D4T*	NFV*	
46	AZT*, 3TC*, DDI, D4T	RTV, NFV*	EFV*
47	AZT*, 3TC, DDI*	RTV	
48	AZT*, 3TC*, DDI	RTV*, NFV, LPV+RTV	
49	AZT*, 3TC*, DDI	RTV*, LPV+RTV	EFV
50	AZT*, 3TC*	RTV, NFV*	
51	AZT*, 3TC, DDI*		NVP, EFV*
52	AZT*, 3TC*, DDI	NFV*, LPV+RTV	EFV
53	AZT*, 3TC*, DDI	RTV, NFV*	
54	AZT*, 3TC*, DDI		
55	AZT*, 3TC*, DDI DAT	NFV*, RTV, LPV+RTV, SQV	TDF
56	AZT*, 3TC*, DDI	NFV*, RTV	
57	AZT*, DDI*	NFV*	
58	3TC*, D4T*, DDI, AZT	LPV+RTV*, IDV, NFV, RTV	EFV*
59	AZT, 3TC*, DDI, D4T*	RTV*, NFV	EFV*
60	AZT*, DDI*	RTV*	
61	AZT*, DDI*, 3TC, ABC	NFV*, RTV	EFV

- = As drogas que carregam este símbolo indicam aquelas que estavam sendo administradas no momento da realização do exame de genotipagem.

Tabela 13- Tabela com as mutações encontradas no gene da transcriptase reversa

Paciente	Subtipo	Mutações no gene da Transcriptase reversa
01	B	M41L, E44D, D67N, V118I, T215Y, K103N, Y181C
02	B	E44D, D67N, K70R, M184V
03	B	-
04	B	M41L, L210W, T215Y, K101E, K103R, G190A
05	B	L210W
06	B	-
07	B	M41L, E44D, D67N, L74I, V118I, T215Y, V106I, V108I
08	B	A62V, M184V, K103S, V106M
09	B	M41L, D67E
10	B	-
11	B	-
12	B	M41L, M184V, L210W, T215Y
13	B	-
14	B	-
15	B	M41L, D67N, K70R, T215Y, K219Q
16	B	T69INST, K70R
17	B	M41L, T215NSTY
18	B	M41L, M184V
19	B	-
20	B/F	-
21	B	M41L
22	F	M41L, V75M, M184V, L210W, A98G, Y181C
23	B	-
24	B/F	T215Y, K103N
25	F	M41L, E44DE, D67N, L210W, V106I
26	B	-
27	B	-
28	B	D67N, T69N, K70R, M184V, K101E, K103N
29	B	M184V, T215Y
30	B	-
31	B	M41L, E44D, D67N, T69D
32	B	D67N, K70R, V118I, M184V
33	B	-
34	B	M184V, L210W
35	B	-
36	B/F	M41L, E44A, D67N, V118I, L210W, T215Y, K219N, K103N
37	F	M41L, E44D, D67N, T69D, L210W, T215Y
38	B	D67N, K70R

Paciente	Subtipo	Mutações no gene da Transcriptase reversa
39	B	A62V, T69NT, V75I, F77L, F116Y, Q151M
40	B	-
41	B/F	M41LM, M184V
42	B	M184V, L210W
43	B	D67N, L210W, Y188NY, T215Y
44	F	M41L, K70R
45	B	T69N, F116Y, Q151LM
46	B/F	M41L, T215Y, K101KT
47	B	E44A, D67N, T69D, M184V
48	B	M41L, D67E, T69SG
49	B	M184V
50	B	M41L, T69A,M184V, T215Y
51	B	-
52	B	M41L, D67N, K70R, M184V, T215Y, K219Q
53	B	M184V
54	B	M184V
55	B	A62AV, T69SG, K70R, M184V
56	B	M41L, E44D, D67N, T69D, V118I, L210W, T215X
57	B	T69A
58	B	M41L, D67N, K70R, V75M, M184V, L210W, T215Y, V179D, G190Q
59	B	M41L, L210W, A98G, K101E, G190A
60	B	T215Y
61	B	-

Mutações primárias em vermelho.

Tabela 14- Tabela com as mutações encontradas no gene da Protease

Paciente	Subtipo	Mutações no gene da Protease
01	B	D30N, N88D, K20I, L63LP, V77I
02	B	N88D
03	B	L10I, L33V
04	B	V32I, L10V, K20T, L63H, A71T
05	B	-
06	B	V77I
07	B	M46I, G73C, L90M, L63P, V77I
08	B	M46L, I54V, V82A, A71V
09	B	L63H
10	B	L90M, L63P, A71T
11	B	L63P, V771, I93IL
12	B	D30N, N88D, L90M, M36I, L63P
13	B	L63P, I93L
14	B	M36I, L63LP
15	B	L63P, V77I, I93L
16	B	-
17	B	-
18	B	D30N, M36I, V77I
19	B	M36I, D60E, L63P
20	B/F	L63P, I93L
21	B	D30N, N88D, K20K, M36I, D60E
22	F	N88S, K20T, M36I
23	B	L63T, I93L
24	B/F	K20R
25	F	M36I, D60E, V77I
26	B	L10I, L63P, I93L
27	B	-
28	B	V32I, M46I, I54V, V82A, L90M, L33M, L63P
29	B	M46I, L90M, L63P, A71I, V77I
30	B	M36I, L63P, V77I
31	B	M46L, I54V, V82A, L90M, L10I, K20R, M36I, L63T, A71V, I93L
32	B	G73A, L90M, L63P, V77I, I93L
33		M36I, L63S
34	B	V77I
35	B	V77I
36	B/F	I54V, V82M, L90M, K20R, M36I, D60E
37	F	L90M, M36I, D60E, V77I
38	B	L63LP, V77I
39	B	D30N, N88D, K20KM, L63P, I93L

Paciente	Subtipo	Mutações no gene da Protease
40	B	L10I, I93L
41	B/F	L90LM, M36I
42	B	L90M, K20I, M36V, L63H
43	B	D30N, M46I, L63A, A71AT, V77I
44	F	V32I, L90M, K20T, M36I, D60E, A71V, V77I, I93FILV
45	B	L63P
46	B/F	V82A, K20R, M36I
47	B	V82M, L90M, M36I, L63P
48	B	I54V, V82A, L63P
49	B	L90M, L10IL, K20KR, M36IM
50	B	L90M, K20T, M36I, L63LP, A71V
51	B	M36I
52	B	V77I
53	B	V82A, L90M, L10V, K20M, L33I, M36I, L63P, I93L
54	B	L10I, L63P, V77I, I93L
55	B	I54V, V82A, L90M, D60E, L63P, A71T
56	B	L90LM
57	B	-
58	B	L33F, M46I, I50V, I54V, V82A, K20R, M36I, L63P, A71V
59	B	L33F, I54V, V82A, L90M, L10V, M36L, L63H
60	B	I54V, V82A, K20R, M36I, L63A
61	B	L63P, V77I, I93L

Mutações primárias em vermelho.

Mutações secundárias em azul.

Mutações em preto não são significantes.

Controle interno da reação de amplificação

Como controle interno da reação de amplificação, todas as amostras foram submetidas a PCR para amplificação de uma região específica do gene da ß-globina humana. A figura 23 representa a amplificação dessa região, sendo observado um fragmento de 110 pb nas amostras positivas. Somente as amostras com PCR positivo foram incluídas em nosso estudo.

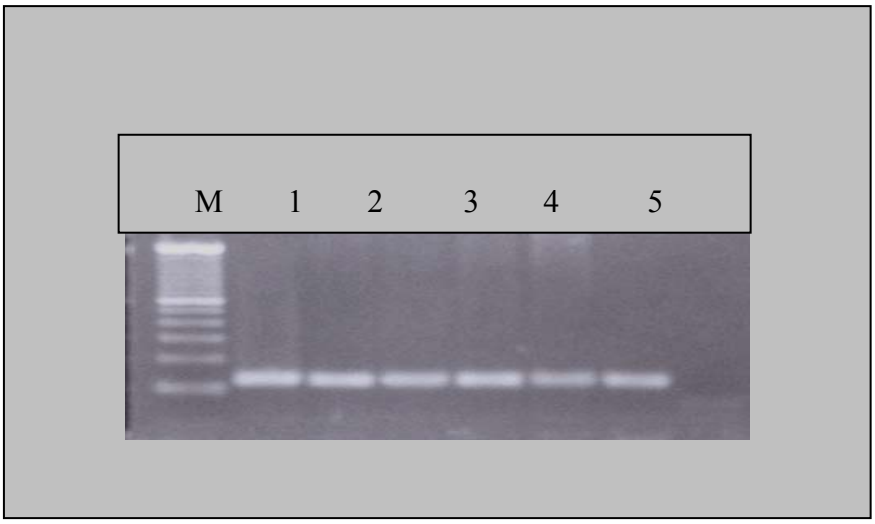


Figura 23- Amplificação de 110 pb do DNA da β-globina humana com os "primers" PCO3 e PCO4. **M** (Marcador de peso Molecular -Ladder 100 pb; Gibco-BRL, USA); **C+** (Controle positivo da reação); **1, 2**, **3, 4, 5, 6** (Pacientes positivos para a Beta globina); **C-** (Controle negativo)

5- DISCUSSÃO

O objetivo da Terapia Antiretroviral Altamente Ativa (HAART) é diminuir a morbidade e a mortalidade associada ao HIV-1, reduzindo ao máximo a replicação viral. Apesar dessa terapia ter alcançado seu objetivo, o desenvolvimento de vírus resistentes á estas drogas é freqüentemente observado após a falha do tratamento (PARKIN *et al.,* 1999; RACE *et al.,* 1999; PARKIN *et al.,* 2000).

De acordo com HERTOGS *et al.* (1998), a Terapia Antiretroviral pode falhar por diversas razões incluindo: potência da droga, não aderência ao tratamento, fatores farmacológicos e aparecimento de cepas virais resistentes às drogas. A aderência, que pode ser definida como o quanto um paciente toma a medicação da forma como foi prescrita pelo médico responsável, pode ser um fator determinante para o número de mutações presentes (MACHTINGER & BANGSBERG, 2005). A taxa média de aderência à terapia antiretroviral é de, aproximadamente, 70%, enquanto a taxa ideal para um sucesso clínico e virológico, ocasionando uma supressão viral, seria em torno de 100%.

Mais de cem mutações associadas à resistência aos agentes antiretrovirais foram descritas, abrangendo a região da transcriptase reversa e da protease (SCHINAZI, *et al.,* 1998; HERTOGS *et al.,* 1998). Conseqüentemente métodos para a detecção de resistência e da resistência cruzada são necessários para o manejo clínico dos pacientes (HERTOGS *et al.,* 1998).

O Brasil é um país que apresenta diferenças nos padrões de subtipos de HIV-1 em suas regiões. O subtipo B é o mais prevalente neste país, seguido do subtipo F (ROSSINI *et al.,* 2001; MORGADO *et al.,* 2002; TANURI *et al*., 2002; GADELHA *et al.,* 2003, SOARES *et al.,* 2003). Apesar do subtipo B ser o de maior prevalência no Brasil, estudos mostram que os subtipos não-B estão se espalhando, e dentre eles merece destaque o subtipo F, segundo em prevalência em diversas regiões do Brasil, como, São Paulo, Distrito Federal e Ceará (SÁ-FILHO *et al.,* 2003; CERQUEIRA *et al*., 2004; GADELHA *et al*., 2003; BRINDEIRO *et al.,* 2003; SOARES *et al.,* 2003). O Brasil responde por 47,5% das seqüências do subtipo F correspondentes à região da protease depositada na base de dados de resistência aos antiretrovirais de Stanford, seguido pela Romênia, apontando 22,4%. Na América Latina, a Argentina detem uma prevalência significativa do subtipo F e recombinantes B/F (CARIDE *et al.,* 2000). Apesar desta

disseminação do subtipo F, pesquisas brasileiras, como por exemplo, a realizada por FERNANDEZ *et al.* (2005), mostrou que cerca de 92% dos vírus circulantes no estado no Rio de Janeiro pertence ao subtipo B. Em outro estudo realizado no estado de São Paulo, 83,93% das crianças eram do subtipo B e 16,07% do subtipo F1 (MOLINA *et al.,* 2005), reforçando a idéia de prevalência do subtipo B no nosso país.

No nosso estudo, observamos que 51 crianças (83,6%) pertencem ao subtipo B, seis amostras (9,8%) eram formas recombinantes dos subtipos B e F, que também já foi descrita no Brasil (RAMOS *et al.,* 1999; GADELHA *et al*., 2003; CERQUEIRA *et al*., 2004; MOLINA *et al.,* 2005), e quatro são do subtipo F (6,6%).

Dos pacientes analisados, os que apresentavam carga viral superior a 10.000 cópias/ml (67,2%) tiveram maior número de mutações. Entre os pacientes com carga inferior a este valor (32,8%), um não apresentou mutações e dezenove apresentaram até dez mutações. Entre estes pacientes, notou-se que, havia predominância, nos mais velhos, de mutações no gene da Transcriptase Reversa e entre os mais novos, mutações no gene da Protease. Estudos realizados por JAPOUR *et al*. (1993) e TUDOR *et al*. (1992) demonstraram que a resistência a zidovudina, causada por mutações no gene da transcriptase reversa, ocorre durante o tratamento prolongado e está relacionado à progressão da doença, estando de acordo com os nossos resultados.

A zidovudina tem sido largamente utilizada como agente antiretroviral contra o HIV nos últimos dez anos (MOHAMED *et al.,* 1998). Segundo The Pediatric AIDS Clinical Trials Group (ACTG), o estudo do protocolo 076, tem demonstrado que a zidovudina, reduz significativamente o risco de transmissão materno-fetal, do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (EASTMAN *et al.,* 1998). O uso deste medicamento é aconselhável durante a gestação; no trabalho de parto, por via intravenosa; e deve ser prolongado à criança entre 8-12 horas após o nascimento, estendido por seis semanas (MATHESON *et al.,* 1995). Apesar da terapia com esta droga durante o período gestacional ter propiciado uma redução na transmissão materno-fetal do HIV-1, ainda não foi possível a eliminação total da transmissão, mas continua sendo a melhor profilaxia adotada. Apesar destas vantagens, esta droga possui fortes evidências que estejam associadas ao genótipo de resistência dos pacientes com HIV. No Hospital das Clínicas de Campinas, desde 1998, a

medida profilática para gestantes infectadas pelo HIV é baseada no uso deste medicamento, a partir do terceiro trimestre de gestação, no momento do parto e após o nascimento do feto. Devido a este fato, todas as crianças nascidas desde então já foram usuárias dessa droga, relacionando a alta prevalência de mutações relacionadas com a sua resistência, como por exemplo, as mutações M41L, D67N, K70R, L210W e T215Y.

Outra mutação comum, que quando associada às mutações M41L e a T215Y, é a D67N, e geralmente vem acompanhada de mutações nas posições 70 e 215. Das seqüências estudadas foram encontradas 17 (27,8%) seqüências com esta mutação, e destas, 38,8% apresentaram também a mutação na posição 70 e 50% na posição 215.

Analizando a resistência associada às mutações dos inibidores do gene da transcriptase reversa foi observada que a mutação M41L foi prevalente entre os subtipos B e não-B. Esta mutação geralmente vem acompanhada da mutação T215Y, que quando juntas, conferem alta resistência a zidovudina e a estavudina (SHAFER *et al.,* 1998). As associações detectadas entre mutações e exposição a uma droga específica foram estatisticamente significantes: o uso da zidovudina está associado à mutação M41L.

Em outros estudos, pacientes que estavam recebendo a zidovudina apresentaram risco de selecionar variantes com mutações de resistência no códon *pol* 215 ou nos códons *pol* 215/ *pol* 41 (LARDER and KEMP, 1989; RICHMAN, 1993; RICHMAN *et al*., 1994; SHAFER *et al.,* 1994; BRUN-VÉZINET *et al.,* 1997; REY *et al.,* 1998). No nosso estudo, treze pacientes apresentaram a mutação *pol* 41 associadas à mutação *pol* 215. Alguns estudos, como por exemplo, BOUCHER *et al.* (1992), RICHMAN (1993) e BRUN-VÉZINET *et al*. (1997), mostraram que estas mutações surgem em seqüência. Pacientes que carregam as mutações de resistência a zidovudina apresentam carga viral alta, indicando que os mutantes se replicam em um alto nível *in vivo*. De acordo com JAPOUR *et al.* (1995), a presença destas mutações em ambos os códons *pol* 215 e *pol* 41 também conferem um aumento do risco de progressão da doença e morte. Em nossa pesquisa, três pacientes com estas mutações foram a óbito.

Neste estudo, as principais mutações referentes ao gene da transcriptase reversa, em pacientes que estavam recebendo a terapia antiretroviral, ocorreram nos códons M41L, M184V, D67N, T215Y, L210W, K70R, E44D, V118I e K103N. Foram encontradas

39 seqüências com pelo menos uma destas mutações. Em trabalho realizado com a população da Bahia (BAHIA *et al*., 2004), as principais mutações encontradas foram M184V, M41L, D67N, L210W, K70R, V118I, T215Y e E44D, nesta ordem de prevalência. Em estudo envolvendo pacientes do Estado do Rio de Janeiro, realizado por Simonetti (SIMONETTI *et al.,* 2003), foram descritas estas mesmas mutações, com exceção da K70R, demonstrando que provavelmente estas mutações são prevalentes no Brasil.

Treze pacientes apresentaram a mutação L210W, observando uma relação entre esta mutação e as drogas zidovudina/lamivudina, pois dez receberam estas duas drogas. Por outro lado, um estudo realizado por CARIDE *et al*. (2000), realizado no Brasil demonstrou que esta mutação estava presente em 67% dos isolados, estando associada à resistência a todos os inibidores da transcriptase reversa, com excecção da lamivudina e ocorre geralmente com as mutações M41L e T215Y simultaneamente. Em nosso estudo, das 13 seqüências com a mutação L210W, sete delas apresentavam a M41L e uma apresentava a T215Y.

Outra droga muito usada no Brasil é a lamivudina, devido a sua praticidade e baixa toxicidade (WAINBERG *et al.,* 1995). A mutação primária selecionada por esta droga (HAVLIR *et al.,* 2000), a M184V foi encontrada em grande número nas amostras estudadas (42,6%) e sua freqüência é alta na maioria dos estudos como descritos de pacientes com falha do tratamento do HIV, como o estudo de WAINBERG *et al*. (2004). Dos dezessete pacientes com estas mutações, para nove crianças administrou-se a droga lamivudina em sua terapia e três fizeram uso desta droga em terapias anteriores.

No estudo de Karmochkine *et al.* (2000), foram estudados 13 pacientes, onze apresentavam mutações primárias nos códons 46 e 82, e um paciente com a mutação D30N. Neste mesmo estudo, também foi encontrada a mutação L90M em 23% dos pacientes.

Em nosso estudo foram encontradas, em pacientes tratados exclusivamente com nelfinavir e ritonavir, dezenove seqüências com a mutação L90M. Nosso trabalho apresentou resultados semelhantes ao de Karmochkine (2000), pois quando feita análise nas seqüências de pacientes que receberam tratamento com base em apenas um tipo de inibidor

de protease verificou-se a presença de três mutações descritas, como críticas para a resistência aos inibidores utilizados: D30N, V82A, L90M. Entre elas, a D30N, que foi encontrada em seis seqüências. A mutação V82A, considerada a principal para a maioria dos inibidores da protease, foi encontrada em dez seqüências. Segundo HERTOGS *et al.,* (1998), ela é freqüentemente selecionada pelo ritonavir, indinavir e lopinavir. As mutações V82A e L90M foram encontradas em cinco seqüências e o L90M e D30N em apenas uma. Mutação no códon 46 foi encontrada em seis seqüências.

Segundo o estudo de WU *et al.* (2003), algumas posições são conhecidas por estarem associadas a diferentes níveis de resistência a IPs para o subtipo B: L10I, K20R/T, D30N, E53D, M46L, I54V, D60E, L63P, A71V, V82A, I84V, N88D, L90M e I93L. Comparando este estudo com o nosso trabalho, foram encontradas 33 seqüências com pelo menos duas destas mutações e 20 seqüências com pelo menos três destas mutações.

Algumas mutações secundárias do gene da protease foram observadas em alta freqüência em nosso trabalho, como, a M36I e L90M (32,8%), V77I (29,5%) e I93L (24,6%). As mutações mais importantes deste gene foram detectadas em 52,4% das amostras, na qual a L90M e a M36I foram as mais prevalentes (32,8%). A mutação descrita V77I está presente neste estudo, e é um polimorfismo comum associado com a resistência ao nelfinavir.

Analisando o perfil do genótipo de resistência aos inibidores da protease a mutação L63P foi a mais prevalente em nosso estudo. Trata-se de um polimorfismo (RHEE *et al.,* 2003), associado à resistência em presença de outras mutações. Ela foi observada na maioria das amostras com freqüência de 42,6%, entre elas apenas uma não estava acompanhada de outras mutações.

Um estudo realizado com amostras de pacientes não tratados no Rio de Janeiro (DURMANS *et al*., 2002) demonstrou um grupo capaz de conferir resistência moderada ao nelfinavir, constituído por quatro mutações secundárias - M36I, L63P, A71V e V77I.

Nosso estudo comprovou estes resultados apresentando mutações em quarenta e seis das sessenta e uma seqüências analisadas, observando a presença de pelo menos uma delas nas seqüências analisadas. Em uma seqüência foi encontrada a presença concomitante

das mutações M36I, L63P e V77I, em duas verificou-se a presença destas mesmas mutações, com exceção da V771, no lugar dela a V71A e em outras oito verificou-se a presença da combinação M36I e L63P consideradas mutações acessórias na protease do subtipo B. V77I, é um polimorfismo relacionado com a resistência ao nelfinavir e foi encontrada em dezessete seqüências.

Como citado por HIRSCH *et al*. (1999), os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa, selecionam mutações em duas regiões diferentes da transcriptase reversa, que geralmente estão associadas aos códons 98 a 108 e 179 a 190. Em nosso estudo vinte e seis pacientes (42,6%) apresentaram estas mutações, sendo que para dezessete pacientes já havia sido administrado medicamento desta classe de drogas.

Um estudo realizado por DEEKS *et al.* (2001), avaliou algumas mutações, revelando uma significante associação entre a exposição da nevirapina com as mutações nos códons 98G, 181I e 190A/S, causando resistência a esta droga. A avaliação associada à resistência aos inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa revelou uma forte associação entre a Nevirapina, Efavirenz e Kaletra (Lopinavir+Ritonavir) com as mutações encontradas nos códons K101E, K103N, Y181CYS, pois em todos os pacientes que receberam estas drogas foram encontradas estas mutações.

A seleção e circulação de cepas resistentes podem representar um sério problema de saúde pública, comprometendo todo o programa brasileiro de apoio aos pacientes com AIDS, que controla a transmissão e a morbidade/mortalidade do HIV pelo uso dos agentes antiretrovirais. Além disso, estas cepas de resistência podem ser transmitidas a pessoas não infectadas, contribuindo para disseminação dessa resistência para toda população brasileira (BRENNER *et al.,* 2000; LITTLE *et al*., 2002; TANURI *et al*., 2002; HIRSCH *et al.,* 2003). É fundamental a manutenção de programas de genotipagem para detectar resistência do HIV-1 em pacientes com falha terapêutica, pois é uma importante ferramenta para o manejo da Terapia Antiretroviral Altamente Ativa.

Em resumo, todas as mutações detectadas pela análise genotípica de resistência foram associadas ao tratamento prescrito e quase 100% das crianças portadoras do HIV-1 com falha no tratamento apresentaram diversas mutações no genoma viral associadas a resistência as drogas utilizadas na terapia.

6- CONCLUSÃO

O subtipo mais encontrado foi o subtipo B, em 83,6% das crianças, o subtipo F em 6,6% e o recombinante B/F em 9,8%. Em relação ás drogas inibidoras da transcriptase reversa, a mutação mais encontrada foi a M184V que confere alto índice de resistência a droga lamividina, evidente em 26 pacientes (42,6%). As mutações M41L e a T215Y, geralmente encontram-se acompanhadas, foram também muito encontradas, a primeira em 39,3% das amostras e a segunda em 26,2%. Entre os inibidores da protease, o polimorfismo L63P teve uma taxa de incidência de 42,6%, presentes em 26 pacientes. As mutações mais encontradas relacionadas com os inibidores da protease foram a L90M e a M36I, que estão relacionadas com todos os inibidores de protease.

Foram utilizados os métodos da PCR, Nested- PCR, seqüenciamento e análise das seqüências obtidas para a detecção de mutações que conferem resistência aos agentes antiretrovirais. Em seu conjunto, os dados deste trabalho, aliados à literatura, indicam que o emprego desta técnica mostrou ser adequada para a análise dessas mutações do HIV-1, auxiliando o clínico na escolha da terapia ideal para cada paciente.

7- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em percentagem e proporção (número de amostras positivas/ total de amostras testadas). Foram utilizadas tabelas de freqüência para as diversas mutações ocorridas no gene da Transcriptase Reversa e da Protease. Os resultados foram definidos como estatisticamente significantes em relação à quantidade de amostras testadas em nosso estudo.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, J. & FENYO, E.M. – Simple, Sensitive, and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Clinical Specimens by Polimerase Chain Reaction with Nested Primers. **Journal of Clinical Microbiology**, 28: 1560-1564, 1990.

ANTONI, B.A.; STEIN, S.B.; RABSON, A.B. - Regulation of Human Immunodeficiency Vírus Infection: Implications for Pathogenesis In: MOROSCH, K. M.; MURPHY, F.A.; SHATKIN, A. J. Advance in Vírus Research. San Diego, California, Academic Press, Inc, 1994. P. 53-145.

BMB.PHARMA.HR/PREDAWANJA/MOLMED/SLD

BAHIA, F.; PEDROSO C.; NETTO, E.M.; FIGUEIREDO, R.; NETO, L. P.; BRITES, C. Evaluation of the Genotypic Pattern of HIV-1 Resistance in AIDS Patients Failing Antiretroviral Therapy. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases.** 8: 281-289, 2004.

BARIN, F.; COUROUCE, A. M.; PILLONEL, J.; BUZELAY, L. – Retrvirus Group of the French Society of Blood Transfusion- Increasing Diversity of HIV-1 M Serotypes in French Blood Donors over a 10 –year period (1985-1995). **AIDS,** 11: 1503-1508, 1997.

BAXTER, J.D.; MAYERS, D.L.; WENTWORTH, D.N.;NEATON, J.D.; HOOVER, M. L.; WINTERS, M.A.; MANNHEIMER, S.B.; THOMPSON, M.A.; ABRAMS, D.I.; BRIZZ, B.J.; IOANNIDIS, J.P.A; MERIGAN, T.C. A Randomized Study of Antiretroviral Managemente Based on Plasma Genotypic Resistance Testing in Patients Failing Therapy. **AIDS**, 14: F83-F93, 2000.

BIRK, M.; ALEMAN, S.; COMANDINI, V.U.; SONNERBORG, A.- Proviral HIV- 1 Dynamics and Evolution in Patients Receiving Efficient Long-term Antiretroviral Combination Therapy. **HIV Med**, 1:205-875, 2000.

BIRK, M.; SVEDHEM, V.; SONNERBORG, A. Kinects of HIV-1 RNA and Resistance-Associated Mutations After Cessation of Antiretroviral Combination Therapy. **AIDS**, 15:1359-1368, 2001.

BOUCHER, C. A. B., O'SULLIVAN, E., MULDER, J. W., RAMAUTARSING, C., KELLAM, P., DARBY, G., LANGE, J.M.A., GOUDSMIT, J., LARDER, B.A. Ordered Appearance of Zidovudine Resistance Mutations During Treatment of 18 Human Immunodeficiency Virus-positive Subjects. **Journal of Infectious Diseases,** 165:105-110, 1992.

BRENNER B., WAINBERG M.A., SALOMON H., ROULEAU D., DASCAL A., SPIRA B., SEKALY R-P, CONWAY B., ROUTY J-P, Investigators of the Quebec Primary Infection Study. Resistance to Antiretroviral Drugs in Patients with Primary HIV-1 Infection. **Int. J. Antimicrobiology Agents,** 16: 429-434, 2000.

BRINDEIRO P. A., BRINDEIRO R.M., MORTENSEN C., HERTOGS K., De VROEY V., RUBINI N.P., SION F.S., De SA CA, MACHADO D.M., SUCCI R.C., TANURI A. Testing Genotypic and Phenotypic Resistance in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates of Clade B and other Children Failing Antiretroviral Therapy**. Journal of Clinical Microbiology,** 40: 4512-4519, 2002.

BRINDEIRO R., DIAZ R., SABINO E., MORGADO M., PIRES I., BRÍGIDO L., DANTAS M., BARREIRA D., TEIXEIRA P., TANURI A and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BresNet): a Survey of Chronically Infected Individuals**. AIDS,** 17: 1063-1069, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de tratamento clínico da infecção pelo HIV em crianças. Brasília, DF, 2001. 36p.

BRUN-VÉZINET F., BOUCHER C., LOVEDAY C., DESCAMP D., FAUVEAU V., IZOPET J., JEFFFIRES D., KAYE S., KRZYANOWSKI C., NUNN A.SHUURMAN R., SEIGNEURIN J.M., TAMALET C., TEDDER R., WEBER J., WEVERLINGG.J., the National Virology Groups, the Delta Virology Working Group and Coordinating Committee. HIV-1 Viral Load, Phenotype and Resistance in a Subset of Drug-Naive Participants from the Delta Trial. **Lancet,** 350: 983-990, 1997.

CARIDE, E.; BRINDEIRO, R. HERTOGS, K.; LARDER, B.; DEHERTOGH, P.; MACHADO, E.; SÁ, C.A. M.; SILVA, W.A.E.; SION, F.S. ; PASSIONI, L.F.C.; MENEZES, J.A. ; CALAZANSA A.R.;TANURI, A. – Drug-Resistance Reverse Transcriptase Genotyping and Phenotyping of B and Non-B Subtypes (F and A) of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Found IN Brazilian Patients Failing HAART. **Virology**, 275: 107-115, 2000.

CASTRO, B.A.; CHENG-MAYER, C.: EVANS, L.A.: LEVY, J.A. HIV Heterogeneity and Viral Pathogenesis. **AIDS**, 2: S17-27, 1988.

CASTRO, B.M.; FERREIRA, O.C.; BONGERTZ, V. – Vacinas contra HIV/AIDS Desenvolvimento e Perspectivas. Cadernos Técnicos do programa Nacional de doenças sexualmente transmissíveis e AIDS. Secretaria de Assistência à Saúde. Ministério da Saúde. Ano 1, jul **01**: 5-9, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. – Interpretation and Use of the Western Blot Assay for Serodiagnosis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. **Morbidity and Mortality Weekly Report, 38**: 1-7, 1989.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL - 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Surveillance Case Definitions for AIDS Among Adolescents and Adults. **Mobidity and Mortality Weekly Report,** 41: RR-17, 1992.

CERQUEIRA D. M., AMORIN R. M. S., SILVA R.R, CAMARA G.N.L., BRÍGIDO M.M., MARTINS C.R.F. Antiretroviral Resistance and Genetic Diversity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from the Federal District, Central Brazil. **Memórias da Instituto Oswaldo Cruz,** 99 (8): 877-882, 2004.

CERQUEIRA D.M., RAMALHO, E.D., OLIVEIRA C.P., SILVA R.R., FRANCHINI M., FELIPE M.S.S., MARTINS C.R.F. HIV-1 Subtypes and Mutations Associated to Antiretroviral Drug Resistance in Human Isolates from Central Brazil. **Brazilian Journal Microbiology,** 35, 2004.

CHIANG, C.S.; GROVE, T.; COOPER, M.; CUAN, J.; KOWALSKI, A.; PARCELLS, K.; TSUNOKAWA, M.; ROSENBERG, M.; ARCURI, E.; FRANKLIN, S.; SMITH, T.; DEBOUCK, C. – Development of a Confirmatory Enzyme –Linked Immunosorbent Assay for HIV-1 Antibodies. **Clinical Chemistry**, 35: 946-952, 1989.

CLEWEY, J.P. – The Polymerase Chain Reaction, a Review of the Pratical Limitations for Human Immunodeficiency Virus Diagnosis. **Journal of Virological Methods,** 25: 179-188, 1989.

COFFIN, J.M. – The Virology of AIDS. **AIDS** 4 (suppl. 1): S1-8, 1990.

COHEN N.J., ORAM R., ELSEN C., ENGLUND J.A. Response to Changes in Antiretroviral Therapy after Genotyping in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children**. Journal. Pedriatrics Infectious. Diseases,** 21: 647-53, 2002.

COSTA, F.F.L; COSTA, S.C.B. – Reação em cadeia da polimerase (PCR) Princípios e Aplicações Clínicas. **Revista Brasileira. Reumatologia**, 32: 142-146, 1992.

COUTO-FERNADEZ J.C., SILVA-de-JESUS C., VELOSO V.G., RACHID M., GRACIE R.S.G., CHEQUER-FERNANDEZ S.L., OLIVEIRA S.M., ARAKAKI-SANCHEZ D., CHEQUER P.J.N., MORGADO M.G. Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: Assenssing Subtype and Drug-Resistance Associated Mutations in HIV-1 Infected Individuals Failing Highly Active Antiretroviral Therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2005.

COWAN, M. J.; HELLMANN, D.; CHUDWIN, D.; WARA, D. W.; CHANG, R. S.; AMMANN, A.J. Maternal Transmission of Acquired Immune Deficiency Syndrome. **Pedriatrics,** 73: 382-386, 1984.

CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E.; MILLS, J.; MONTAIGNIER, L. –Structure and Function of HIV. **MJA**, 164:161-171, 1996.

CUNNINGHAM, P.H.; SMITH, D.G.; SATCHELL, C.; COOPER, D.A.; BREW, B. Evidence for Independent Development of Resistance to HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors in the Cerebrospinal Fluid. **AIDS,** 14: 1949-1954, 2000.

CURRAN, J. W.; JAFFE, H.W.; HARDY, A.M.; MORGAN, W. M.; SELIK, R. M.; DONDERO, T. J. – Epidemiology of HIV Infection and AIDS in the United States. **Science,** 239: 610-616, 1988.

DEEKS S. G. Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance. **Journal of AIDS** 26: S25-S33, 2001.

DETELS, R.; MUNOZ, A.; MCFARLANE, G.; ET AL. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. Multicenter AIDS Cohort Study Investigatiors. **JAMA**, 280:1497-1503, 1998.

DOMINDO, E.; HOLLAND, J.J.- Complications of RNA Heterogeneity for the Engineering of Virus Vaccines and Antiviral Agents. **Genetic engineering, principles and methods,** 14: 13-31, 1992.

DORENBAUM, A.; VENKATESWARAN, K.S.; YANG, G.; COMEAU, A.M.; WARA, D.; VYAS, G.N. Transmission of HIV-1 in Infants Born to Seropositive Mothers: PCR-Amplified Proviral DNA Detected by Flow Cytometric Analysis of Immunoreactive Beads. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology,** 15: 35-42, 1997.

DUARTE, E.A.; NOVELLA, I.S.; WEAVER, E.; DOMINGO, S.; WAIN-HOBSON, D.K.; CLARKE, D.K.; MOYA, A.; ELENE, S.F.; DE LA TORRE, J.C.; HOLLAND, J.J.- RNA Virus Quasiespecies: Significance for Viral Disease and Epidemiology. **Infectious Agents Diseases**, 1994.

DUMANS A.T., SOARES M.A., PIENIAZEK D., KALISH M.L., DeVROEY V., HERTOGS K., TANURI A. Prevalence of Protease and Reverse Transcriptase Drug Resistance Mutations Over time in Drug-Naive Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob. Agents Chemotherapy,** 46: 3075-3079, 2002.

DURANT J., CLEVENBERG P., HALFON P., DELGIUDICE P., PORSIN S., SIMONET P., MONTAGNE N., BOUCHER C.A., SCHAPIRO J.M., DELLAMONICA P. Drug-Resistance Genotyping in HIV-1 Therapy: the Viracept Randomized Controlled Trial. **Lancet,** 1999; 353: 2195-2199.

EDWARDS, J.R.; ULRICH, P.P; WEINTRUB, P.S.; COWAN, M.J.; LEVY, J.A.; WARA, D.W.; VYAS, G.N. – Polymerase Chain Reaction Compared with Concurrent Viral Cultures for Rapid Identification of Human Immunodeficiency Virus Infection Among High-Risk Infants and Children. **The Journal of Pediatrics**, 115: 200-203, 1989.

EASTMAN, P.S.; SHAPIRO, D.E.; COOMBS, R.W.; FRENKEL, L.M.; McSHERRY, G.D.; BRITTO, P.; HERMAN, S.A.; SPERLING, R.S. Maternal Viral Genotypic Zidovudine Resistance and Infrequent Failure of Zidovudine Therapy to Prevent Perinatal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076. **Journal of Infectious Diseases**, 177:557-564, 1998.

FALLON, J.; EDDY, J.; WIENER, L.; PIZZO, P.A.- Human Immunodeficiency Virus Infection in Children. **The Journal of Pediatrics**, 114: 1: 30, 1989.

FERREIRA, A.W. & ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico Laboratorial**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. P.18-21.

FITZGIBBON, J.E.; FARNHAM, A.E.; SPERBER, S.J.; KIM, H.; DUBIN, D.T.- Human Immunodeficiency Virus Type 1 *Pol* Gene Mutations in an AIDS Patient Treated with Multiple Antiretroviral Drugs. **Journal of Virology**, 67: 7271-7275, 1993.

GADELHA S.R., SHINDO N., CRUZ J.N.M., MORGADO M.G., GALVÃO-CASTRO B. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-1 in the State of Ceará, Notheast, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** 98 ;461-464, 2003.

GALEL, S. A.; LIFSON, J. D.; ENGLEMAN, E. G. – Prevention of AIDS Transmission Through Screening of The Blood Supply. **Anu. Ver. Immunology,** 13: 201-227, 1995.

GALLO, C. R.; MONTAIGNER, L. AIDS in 1988. **Scientific American**, 259: 41-71, 1988.

GALLO, R. C. – Human Retroviruses: A Decade of Discovery and Link with Human Disease. **The Journal of Infectious Diseases**; 164: 235-243, 1991.

GALVÃO-CASTRO, B; JR, O. F. C.; BONGERTZ, V.- Vacinas contra HIV/AIDS: Desenvolvimento e Perspectivas. Programa nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Secretaria de Assistência à Saúde. Ministério da Saúde Cadernos Técnicos, 1: 5-9, 1994.

GANEN, T & GANEN, M.O. Interference of the riboflavin in the fluorimetric analysis. XX Congresso Mundial de Patologia e Medicina Laboratorial em São Paulo, 1999.

GARCIA-LERMA, J.G; HENEINEA, W. Cuantificación de la Carga Viral Circulantedel Virus de la Inmunodeficiência Humana Mediante la Medida de la Actividad de Transcriptase Inversa. **Med Clin (Barcelona)**, 100: 453-454, 1998.

GARCIA-LERMA, J.G.; NIDTHA, S.; BLUMOFF, K.; WEINSTOCK,H.; HENEINE, W. –Increased Ability for Selection of Zidovudine Resistance in a Distinct Class of Wild-Type HIV-1 from Drug-Naive Person. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 24: 13097, 1998.

GREENE, W.C. – The Molecular Biology of Imunnodeficiency Virus Type 1 Infection. **The New England Journal of Medicine**, 321:308-324, 1991.

GUERREIRO, J. G.; HERRERO, A; BEDIA, M.; ARAÚJO, R.; CASTELLANO, J.C. – Resistências Primarias de HIV en una Población Penitenciaria. **Jueves**, 22 (01): 29-31, 2004.

HAMPL, H.; SAWITZKY, D.; STÖFFLER-MEILICKE, M.; GROH, A.; SCHMITT, M.; EBERLE, J.; GURTLER, L. – First Case of HIV–1 Subtype O Infection in Germany. **Infection**, 23: 369-370, 1995.

HASELETINE, W.A. – Silent HIV Infections. – **The New England Journal of Medicine**, 320: 1487-1489, 1989.

HAYNES, B. F. HIV Vaccines: Where We Are and Where We Are Going. **Lancet**, 348:933:937, 1996.

HAVLIR D.V., HELLMANN N.S., PETROPOULOS C.J., WHITCOMB J.M., COLLIER A.C., HIRSCH M.S., TEBAS P., SOMMADOSSI J.P., RICHMAN D.D. Drug Susceptibility in HIV Infection after Viral Rebound in Patients Receiving Indinavir-Containing Regimens. **JAMA,** 283: 229-234, 2000.

HENRY, J.B. Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por Métodos Laboratoriais 19.ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 862-867.

HERTOGS, K.; DEBÉTHUNE, M.P.; MILLER, V.; IVENS, T.; SCHEL, P.; CAUWENBERGE, A.V.; EYNDE, C.V.D.; GERWEN, V.V.; AZIJN, H.; HOUTTE, M.V.; PEETERS, F.; STASZEWSKI, S.; CONANT, M.; BLOOR, S.; KEMP, S.; LARDER, B.; PAUWELS, R. A Rapid Method for Simultaneous Detection of Phenotypic Resistance to Inhibitors of Protease and Reverse Transcriptase in Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates from Patients Treated with Antiretroviral Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 42: 269-276, 1998.

HEYNDRICKX, L.; ALARY, M.; JANSSENS, W.; DAVO, N.; VAN DER GROEN, G. – HIV-1 Group O and Group M Dual Infection in Bénin. **The Lancet**, 347:902-903, 1996.

HIRSCH M.S., CONWAY B., DÁQUILA R.T. et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults with HIV Infection: Implications for Clinical Management. **Jama,** 279: 1984-1991, 1998.

HIRSCH, M.S.; CONWAY, B.; DÁQUILA, R.T.; JOHNSON, V.A.; VÉZINET, F.B.; CLOTET, B.; DEMETER, L.M.; HAMMER, S.M.; JACOBSEN, D.M.; KURITZKES, D,R.; LOVEDAY, C.; MELLORS, J.W.; VELLA,S.; RICHMAN,D.D..-Testes de Resistência aos Agentes Anti-retrovirais nos Adultos HIV-Positivos. **JAMA Brasil**, 1: 1642-1655, 1999.

HIRSCH, M.S.; BRUN-WEZINET, F.; D'ÁQUILA, R.T. e cols.- Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: Recommendation of an International AIDS Society-USA Panel. **Jama**, 283: 2417-2426, 2000.

HIRSCH M.S., BRUN-VÉZINET F., CLOTET B., CONWAY B., KRUITZKES D.R., D'AQUILA R.T., DEMETER L.M., HAMMER S.M., JONHSON V.A., LOVEDAY C., MELLORS J.W., JACOBSEN D.M., RICHMAN D.D. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adults Infected with Humman Immunodeficiency Virus Type1: 2003 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. **Clinical Infectious Diseases,** 37: 113-128, 2003.

HÖGLUND, S.; OHAGEN, A.; LAWRENCE, K.; GABUZDA, D.; -Role of during the packing of the core of HIV-1. **Virology,** 201: 349-355, 1994.

HOLGUÍN A., ÁLVAREZ A., SORIANO V. High Prevalence of the HIV-1 Subtype G and Natural Polymorphisms at the Protease Gene Among HIV-Infected Immigrants in Madrid. **AIDS,** 16: 1163-1170, 2002.

HOU, T.C.; HUANG, W.K.; LIU, Y.C. Laboratory Evaluation of Automated Enzyme Linked Fluorescent Assay for Detecting Serum Specific IgG Antibodies Aganist Rubella Virus. Zhonghua Min Guo Wei ShengWhu Ji Mian Yi Xue Za Zhi, 29 (1): 45-56, 1996.

HUSSON, R.N.; COMEAU, A.M.; HOFF, R. – Diagnosis of Human Immunodeficiency Virus Infection in Infants and Children. **Pedriatrics**, 86: 2-10, 1990.

KANKI P.J., HAMEL D.J., SANKALE J.L., HSIEH C.C., THIOR I., BARIN F., WOODCOK A.S., GUEYE-NDIAYE A., ZHANG E., MONTANO M., SIBY T., MARLINK R., NDOYE I., ESSEX M.E., MBOUP S. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtypes Differ in Disease Progression. **The Journal of Infectious Diseases**. 179: 68-73, 1999.

KALEEBU P., FRENCH N., MAHE C., YIRREL D., WATERA C., LYAGOBA F., NAKIYINGI J., RUTEBEMBERWEA A., MORGAN D., WEBER J., GILKS C., WHITWORTH J. Effect of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Envelopes Subtypes A and D on Disease Progression in a Large Cohort of HIV -1 Positive Persons in Uganda. **The Journal Infectious Diseases,** 185: 1244-1250, 2002.

KAMMERER, R.; BURGISSER, P.; FREI, P.C.- Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibodies of Noninfected Subjects Are Not Related to Autoantibodies Occuring in Systemic Diseases. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 2: 458-461, 1995.

KARMOCHKINE, M.; SI MOHAMED, A; PIKKETY, C.; GINSBURG, C.; RAGUIN, C.; SCHNEIDER- FAUVEAU, V.; GUTMANN, L.; KAZATCHKINE, M. D.; BELEC, L. The Cumulative Occurrence of Resistance Mutations in the HIV-1 Protease Gene is Associated with Failure of Salvage Therapy with Ritonavir and Saquinavir in Protease Inhibitor-Experienced Patients. **Antiviral Resistance;** 43(3): 179-188, 2000.

KELLOG, D.E. & KWOK, S. Detection of Human Immunodeficiency Virus. In: INNIS, M.A.; GELFAND, A.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. PCR **Protocols: a Guide to Methods and Applications** 1° edition, California Academic Press, Inc., 1990.Cap 40, p. 337-347.

KIFFER, C.R.V.; LINS, A.L.G.P.; BARONE, M.A.; FELIP, Y.X. – Aconselhamento e exames para o HIV. In: LIMA, A.L.M.; KIFFER, C.R.; UIP, D.; OLIVEIRA, M.S.; LEITE, O.M. **HIV/AIDS: perguntas e respostas**. São Paulo Atheneu, 1995. p 75-92.

JACKS, T.; POWER, M.D.; MASIARZ, F.R.; LUCIW, P.A.; BARR, P.J.; VARMUS, H.E. Characterization of Ribossomal Frameshift in HIV-1 *Gag-pol* Expression. **Nature,** 331: 280-283, 1998.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WLAPORT, M.; CAPRA, J.D. O Sistema Imunológico na Saúde e na Doença. **Imunobiologia,** 441-455, 2000.

JAPOUR, A.J.; MAYERS, D.L.; JOHSON, V.A.; KURITZKES, D.R.; BECKETT, L.; ARDUINO, J.M.; LANE, J.; BLACK, R.J.; REICHELDERFER, P.S.; D'AQUILA, R.T.; CRUMPACKER, C.S.- Standardized Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay for Determination of Drug Susceptibilities of Clinical Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy,** 37: 1095-1101, 1993.

JAPOUR A.J., WELLES S., DÁQUILA R.T., JONHSON V.A., RICHMAN D.D., COOMBS R.W., REICHELDERFER P.S., KAHN J.O., CRUMOACKER C.S., KURITZKES D.R. Prevalence and Clinical Significance of Zidovudine Resistance Mutations in Human Immunodeficiency Virus Isolated from Patients after long-trm Zidovudine Treatment. **Journal of Infectious Diseases,** 171: 1172-1179, 1995.

JONHSON V. A., BRUN-VÉZINET F., CLOTED B., CONWAY B., D'AQUILA R.T., DEMETER L.M., KURITZKES, D.R., PILLAY, D., SCHAPIRO J.M., TELENTI A., RICHMAN D.D. International AIDS Society-USA Drug Resistance Mutations Group 2003. Drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in HIV-1 Medicine,** 11:215-221, 2003.

JOSEPHSON, S.L.; SWACK, N.S.; RAMIREZ, M.T.; HAUSLER, W.J.J.- Investigation of Atypical Western Blot (Immunoblot) Reactivity Involving Core Proteins of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **Journal of Clinical Microbiology**, 27: 932-937, 1989.

LACKRITZ, E. M.; SATTEN, G.A.; GRASSE, J.A.; DODD, R.Y.; RAIMONDI, V.P.; JANSSEN, R.S.; LEWIS, W.F.; NOTARI, E.P.; PETERSEN, L.R. – Estimated Risk of Transmission of the Human Immunodeficiency Virus by Screened Blood In The United States. **The New England Journal of Medicine**, 333: 1721-172, 1995.

LANGE I.A.; PARRY, I.V.; WOLF,F. et al. Diagnostic Value of Specific IgM Antibodies IN Primary HIV Infection. **AIDS**, 2:31-35, 1988.

LARDER, B.A.; KEMP, S.D. Multiple Mutations in HIV-1 Reverse Transcriptase Confer High-Level Resistance to Zidovudine (AZT). **Science,** 246: 1155-1158, 1989.

LEVY, J.A. Heterogeneity in Transmission and Pathogenesis. In AIDS in the World II. Edited by Mann J.M., TARANTOLA D.J.M. New York: Oxford University Press 177-185, 1996.

LIFSON, A. R.; STANLEY, M.; PANE, J.; O'MALLEY, P. M.; WILBER, J. C.; STANLEY, A.; JEFFERY, B.; RUTHERFORD, G. W.; SOHMER, P. R.- Detection of Human Immunodeficiency Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction in a Well-Characterized Group of Homossexual and Bissexual men. **The Journal of Infectious Diseases,** 161: 436-439, 1990.

LITTLE S.J., HOLTE S., ROUTY J.P., DAAR E.S., MARKOWITZ M., COLLIER A.C., KOUP R.A., MELLORS J.W., CONNICK E., CONWAY B., KILBY M., WANG L., WHITCOMB J.M., HELLMANN N.S., RICHMAN D.D. Antiretroviral Drug Resistance Among Patients Recently Infected with HIV. **New England Journal Medicine,** 347: 385-394, 2002.

LOUSSERT-AJAKA, I.; CHAIX, M.L.; KORBER, B.; LETOURNEUR, F.; GOMAS, E.; ALLEN, E.; LY, T.D.; BRUN-VÉZINET, F.; SIMON, F.; SARAGOSTI, S. – Variability of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Strains Isolated from Cameroonian Patients Living in France. **Journal Virology,** 69: 5640-5649, 1995.

LUCIW, P. A. – Human immunodeficiency Viruses and Their Replication. In: Fields, B.N.; HOWLEY, P.M.; KNIPE, D.M. (ed). Fundamental Virology. 3 ed.; Lippincott-Raven publishers, Philadelphia, p. 845-916, 1996.

MACHTINGER E. L.; BANGSBERG, D.R.. Adherence to HIV Antiretroviral Therapy. InSite Knowledge Base [textbook online]; San Francisco: UCSF Center for HIV Information; 2005.

MADURAI, S.; MOODLEY, D.; COOVADIA, H.M.; GOPAUL, W.; SMITH, A.N.; YORK, D.F. Infant -Maternal HIV- Specific Immunoglobulin G1 Antibody Ratios as an Indicator of Vertical Transmission. **AIDS**, 11: 1191-1193, 1997.

MAGUIRE, M.; GARTLAND, M.; MOORE, S.; HILL, A.;TISDALE,M.; HARRIGAN,R.; KLEIM, J. – Absence of Zidovudine Resistance in Antiretroviral -Naive Patients Following Zidovudine/Lamivudine/Protease Inhibitor Combination Therapy: Virological Evaluation of the AVANTI 2 and AVANTI 3 Studies. **AIDS,** 14:1195-1201, 2000.

Manual de instruções- Kit DIA (Dot Immuno Assay HIV1+ HIV2) – Wiener Lab.

MANSKY L.M. Retrovirus Mutation Rates and their Role in Genetic Variation. **J. Gen. Virology.** 79: 1337-1345, 1998.

MARGNI, R.A. **Imunologia e Imunoquímica Fundamentos.** 5.ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1996. p.798-819.

MARINS J.R., JAMAL L.F., CHEN S.Y., BARROS M.B., HUDES E.S., BARBOSA A.A., CHEQUER P., TEIXEIRA P.R., HEARST N. Dramatic Improvement in Survival Among Adult Brazilian AIDS Patients. **AIDS,** 17: 1675-1682, 2003.

MATHESON, P.B.; ABIAMS, E.J.; THOMAS, P.A.; HERNÁN, M.A.; THEA, D.M.; LAMBERT, G.; KRASINSKIR, K.; BAMJI, M.; ROGERS, M.F.; HEAGARTY, M. The New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group – Efficacy of Anteneonatal Zidovudine in Reducing Perinatal Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **The Journal of Infectious Diseases**, 172: 353-358, 1995.

METZNER, K.J; BONHOEFFER, S.; FISCHER, M.; KARANICOLAS, R.; ALLERS, K.; JOOS, B.; WEBER, R.; HIRSCHEL, B.; KOSTRIKIS, L.G.; GUNTHARD, H.F.; and the Swiss HIV Cohort Study. Emergence of Minor Populations of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Carrying the M184V and L90M Mutations in Subjects Undergoing Structured Treatment Interruptions. **The Journal of Infectious Diseases.** 188 ; 1433-1443,2003.

MITSUYA,H.; YARCHOAN,R.; BRODER,S.;-Molecular Targets for AIDS Therapy. **Science**, 249: 1553-1544, 1990.

MOHAMED, A.Si.; KAZATCHKINE,M.; PIKETTY, C.; COTIGNY, S.; GILQUIN, J.; WEISS, L. MATTA, M.; GUTMANN, L.; BELEC, L. –The Sequencial Ocurrence of *Pol* 215 and *P*ol 41 Zidovudine Resistance Mutations is Associated in na Additive Fashion with low CD4 cell Counts and High Plasma and Cellular HIV Viral Load. **Antiviral Research**, 39: 47-53, 1998.

MOHRU, H.; SINGH, M. K.; CHING, W.T.W.; HO, D.D.- Quantification of Zidovudine-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 in the Blood of Treated and Untreated Patients. **Proc. Natl. Acad. Sci**, 90: 25-29, 1993.

MOLINA, R.M.; TORO, A.P.C.; SILVA, M.T.N.; VILELA, M.M.S.; COSTA, S.C.B. – Early Diagnosis of HIV-1: Infected Infants in Brazil Using Nested-PCR. Journal of **Tropical Pediatrics**, 50 (2): 107-113, 2004.

MOLINA, R.M.M. Subtipagem do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) EM Crianças Infectadas Via Perinatal [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

MORGADO M.G., GUIMARÃES M.L, GALVÃO-CASTRO B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development- A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** 97: 143-150, 2002.

NÁJERA, I.; HOLGUÍN, A.; QUIÑONES-MATEU, M.E.; FERNÁNDEZ, M.A.M.; NÁJERA, R.; GALÍNDEZ, C.L.; DOMINGO E. – Pol Gene Quasiespécies of Human Immunodeficiency Virus: Mutations Associated with Drug Resistance in Virus from Patients Undergoing NO drug Therapy. **Journal of Virology**, 69: 23-31, 1995.

NETTLES, R.E.; KIEFFER, T.L.; SIMMONS, R.P.; COFRANCESCO, J.J.; MOORE, R.D.; GALLANT, J.E.; PERSAUD, D.; SILICIANO, R.F. Genotypic Resistance in HIV-1 Infected Patients with Persistently Detectable Low-Level Viremia while Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, 39: 1030-1037, 2004.

NIELSEN, K.; WEI, L. S.; SIM, M.S.; DEVEIKIS, A.; KELLER, M.; STIEHM, E. R.; FRENKEL, L. M.; BRYSON, Y. J. – Correlation of Clinical Progression in Human Immunodeficiency Virus- Infected Children with In Vitro Zidovudine Resistance Measured by a Direct Quantitative Peripheral Blood Lymphocyte Assay. **The Journal of Infectious Diseases**, 172: 359-364, 1995.

PALADIN, F.J.E; MONZON, O.T.; TSUCHIE, H.; APLASCA, M.R.A.; LEARN JR, G.H.; KURIMURA, T. – Genetic Subtypes of HIV-1 in the Philippines. **AIDS**, 12: 291-300, 1998.

PARKIN, N.; LIE, Y.; HELLMANN, N.; et al.- Phenotypic Changes in Drug Susceptibility Associated with Failure of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Triple Combination Therapy. **Journal Infectious Diseases**, 180: 865-870, 1999.

PARKIN, N.T.; DEEKS, S.G.; WRIN, M.T.; YAP, J.; GRANT, R.M.; LEE, K.H.; HEEREN, D.; HELLMANN, N.S.; PETROPOULOS, C.J. Loss of Antiretroviral Drug Susceptibility at Low Viral Load During Early Virological Failure in Treatment-Experienced Patients. **AIDS**, 14: 2877-2887, 2000.

PERRIN L., KAISER L., YERLY S. Travel and the Spread of HIV-1 Genetic Variants. **Lancet Infectious Disease** 3: 22-27, 2003.

PERSAUD, D.; PIERSON, T.; RUFF, C.; FINZI, D.; CHADWICK, K.R.; MARGOLICK, J.B.; RUFF, A.; HUTTON, N.; RAY, S.; SILICIANO, R.F. **A Stable Latent Reservoir for HIV-1 in Resting CD4+T Lymphocytes in Infected Children.** 105: 995-1003.

PERSAUD, D.; SIBERRY, G.K.; AHONKHAI,A.; KAJDAS, J.; MONIE, D.; HUTTON, N.; WATSON, D.C.; QUINN, T.C.; RAY, S.C.; SILICIANO, R.F. Continued Production of Drug-Sensitive Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Children on Combination Antiretroviral Therapy Who Have Undetectable Viral Loads. **Journal of Virology.** 78: 968-979, 2004.

PLANTIER, J. C.; POGAM, S. L.; POISSON, F.; BUZELAY, L.; LEJEUNE, B.; BARIN, F. – Extent of Antigenic Diversity in the V3 Region of the Surface Glycoprotein, gp 120, of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M and Consequences for Serotyping. **Journal of Virology,** 72: 677-683, 1998.

PLANTIER, J.C.; VERGNE, L.; DAMOND,F.; BOUP, S.M.; MPOUDI-NGOLE, E.; BUZELAY, L.; FARFARA, I.; BRAND, D.; PEETERS, M.; BRUN-0VÉZINET, F.; DELAPORTE, E.; BARIN, F. – Development and Evaluation of a DNA Enzyme Immunoassay Method for *env* Genotyping of Subtypes A through G of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M, with Discrimination of the Circulating Recombinant Forms CRF01_AG. **Journal Clinical Microbiology,** 40 (3): 1010-1022, 2002.

POLLET, D. E.; N SAMAN, E. L.; PEETERS, D. C.; WARMEBOL, H. M.; HEYNDRICKX, L. M.; WOUTERS, C. J.; BEELAERT, G.; GROEN, G.; HEUVERSWYN, H.V.- Confirmation and Differentiation of Antibodies to Human Immunodeficiency Virus 1 and 2 with a Strip-Based Assay Including Recombinant antigens and Synthetic Peptides. **Clinical Chemistry**, 37: 1700-1707,1991.

PRESTON, B.D.; POIESZ, B.J.; LOEB, L.A. Fidelity of HIV-1 Reverse Transcriptase. **Science**, 242: 1168-1170, 1998.

QUIÑONES-MATEU, M.E.; SORIANO, V.; DOMINGO, E.; MENÉNDEZ-ARIAS, L. Characterization of the Reverse Transcriptase of a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group O Isolate. **Virology**, 236: 364-373, 1997.

RACE, E.; DAM, E.; OBRY, V.; PAULOUS, S.; CLAVEL, F. Analysis of HIV Cross Resistance to Protease Inhibitors Using a Rapid Single-Cycle Recombinant Virus Assay for Patients Failing on Combination Therapies. **AIDS**, 13: 2061-2068, 1999.

RAMOS A., TANURI A., SCHECHTER M., RAYFIELD M.A., HU D.J., CABRAL M.C., BANDEA C.I., BAGGS J., PIENIAZEK D. Dual and Recombinant Infections: an Integral Part of the HIV-1 Epidemic in Brazil. **Emergence Infectious Diseases,** 5: 65-74, 1999.

RESNICK, L.; BERGER, J.R.; SHAPSHAK, P.; TOURTELLOTTE, WW. Early Penetration of the Blood-Brain-Barrier by HIV. **Neurology**, 38: 9-14, 1988.

REY D., HUGHES M., PI J.T., WINTERS M., MERIGAN T.C., KATZENSTEIN.D.A. HIV-1 Reverse Transcriptase Codon 215 Mutation in Plasma RNA: Immunologic and Virologic Responses to Zidovudine. **J. Acquired. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology,** 17: 203-208, 1998.

RHEE S.Y., GONZALES M.J., KANTOR R., BETTS B.J., RAVEL J. SHAFER R.W. Human Immunodeficiency Virus Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database. **Nucleic Acids Res.** 31: 298-303, 2003.

RICHMAN D.D. Resistance of Clinical Isolates of Human Immuondeficiency Virus to Antiretroviral Agents. **Antimicrob. Agents Chemotherapy,** 37: 1207-1213, 1993.

RICHMAN D.D., MENG T.C., SPECTOR S.A., FISCHI M.A., RESNICK L., LAI S. Resistance to AZT and ddC During Long-Term Combination Therapy in Patients with Human Immunodeficiency Virus J. **Acquired. Immune Defic. Syndr**. 7: 135-138, 1994.

ROBERTS, J.D., BEBENEK K., KUNKEL, T.A. The Accuracy of Reverse Transcriptase of HIV-1 in vitro. **Science**; 242: 1170-1173, 1998.

ROSEN, C.A.& PAVLAKIS, G.N.- *Tat* e *rev*: Positive Regulators of HIV-1 Gene Expression. **AIDS,** 4: 499-509, 1990.

ROSSINI M.A.A., DIAZ R.S., CASEIRO M., TURCATO G., ACCETTURI C.A., SABINO E.C. HIV-1 Subtypes Among Intravenous Drug Users from two Neighboring Cities in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal Medicine,** 34: 45-47, 2001.

RUBINI, N.P.- Avaliação Laboratorial na Infecção pelo HIV. **Prática Hospitalar,** 33-40, 1995.

SANDSTROM, P. A. & FOLKS T.M. New Strategies for Treating AIDS. **BioEssays,** 18: 343-346, 1996.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.;ERLICK, H.A.; ARNHEIM, N. – Enzymatic Amplification of Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analyses for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. **Science**, 230: 1350-1354, 1985.

SAYRE, K. R.; DODD, R.Y.; TEGTMEIER, G.; LAYUG, L.; ALEXANDER, S.S.; BUSCH, M.P.- False-Positive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Western Blot Tests in Noninfected Blood Donors. **Transfusion**, 36: 45-52, 1996.

SCHINAZI, R.B.; LARDER, B.; MELLORS, J. Mutations in Retroviral Genes Associated with Drug Resistance. **International Antiviral News**, 4: 95-107, 1998.

SCHLEUPNER, C.J. Diagnosis Tests for HIV-1 Infection. **Principles and Pratice of infectious Disease,** 1: 1-15, 1988.

SHAFER, R.W.; KOZAL, M.J.; WINTERS, M.A. et al., Combination Therapy woth Zidovudine and Diadanosine Selects for Drug-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains with Unique Patterns of *Pol* Gene Mutations. **The Journal of Infectious Diseases,** 169: 722-729, 1994.

SHAFER, R. W.; WINTERS, M.A.; PALMER, S.; MERIGAN, T.C. – Multiple Concurrent Reverse Transcriptase and Protease Mutations and Multidrug Resisntance of HIV-1 Isolates from Heavily Treated Patients. **Annals of Internal_Medicine**, 128: 906-911, 1998.

SHAFER R.W. Genotypic Testing for HIV-1 Drug Resistance. 2003. Available at http://hivdb.stanfor.edu

SHARP, P.M.; ROBERTSON, D.L.;GAO, F.;HAHN, B. Origins and Diversity of Human Immunodeficiency Viruses. **AIDS**, 8: S27:S42, 1994.

SHAW, M. M.; LI, Y.; CHRISTENSEN. –Effects of Perinatal Zidovudine on Hematopoiesis: a Comparison of Effects on Progenitors From Human Fetuses Versus Mothers. **AIDS,** 10: 1239-1247, 1996.

SHEREFA, K.; SALLBERG, M.; JOHANSSON, B.; SALMINEN, M.; SONNERBORG, A.- Subtyping of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains by using Antibodies Specific for the Third Variable Domain (V3) of gp 120: Results May Be Affected By Divergenet V3 Sequences. **Journal Clinical Microbiology**, 35: 2419-2421, 1997.

SHIRASAKA, T.; YARCHOAN, R.; O' BRIEN, M.C. et. al. Changes in Drug Sensitivity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 During Therapy with Azidothymidine, Dideoxycytidine, and, Dideoxynosine: an *in Vitro* Comparative Study. **Proc Natl Acad Sci USA**, 90: 562-566, 1993.

SIMONI J.M., FRICK P.A., PANTALONE D.W., TURNER B.J. Antiretroviral adherence Interpretations: A review of Current Literature of Ongoing Studies**. Topics in HIV Medicine, IAS- Drug resistance mutations group** 11: 185-199, 2003.

SIMONETTI, S.R.R.; SCHATZMAYR, H.G.; SIMONETTI, J.P. – human Immunodeficiency Virus Type 1: Drug Resistance in Treated and Untreated Brazilian Children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz,** 98: 831-837, 2003.

SLAVIK, T.; WOLFAARDT, M.; ZYL, H.V.; SIMSON, I.W. Retrospective Determination of HIV1 Status by a PCR Method on Paraffin Wax Embedded Sections. **Journal of Clinical Pathology**, 48: 733-736, 1995.

SOARES E.A.J.M., SANTOS R.P., PELLEGRINI J.A., SPRINZ E., TANURI A., SOARES M.A. Epidemiologic and Molecular Characterization of Human Immunodeficiency virus type 1 in Southern Brazil. **J AIDS,** 34: 520-526, 2003.

SONGOK,E.M; LIBONDO, D.K.; ROTICH, M.C.; OOGO, S.A.; TUKEI, P.M. – Surveillance for HIV –1 Subtypes O and M in Kenya. **Lancet**, 347: 1700, 1996.

ST. CLAIRE, M.H; MARTIN, J.L.; WILLIAMS, G.T.; BACH, W.C.; VAVRO, C.L.;KING, D.M.; KELLAM, P.; KEMP, S.D.; LARDER, A.B. –Resistance to ddI and Sensivity to AZT Induced by a Mutation in HIV-1 Reverse Transcriptase. **Science,** 253: 1557-1559, 1991.

STINGELE, K.; HAAS, J.; ZIMMERMANN, T.; STINGELE, R.; HUBSCH-MULLER, C.; FREITAG, M.; STORCH-HAGENLOCHER, B.; HARTMANN, M.; WILDEMANN, B. – Independent HIV Replication in Paired CSF and Blood Viral Isolates during Antiretroviral Therapy. **Neurology**, 56 (3): 335-361, 2001.

STITES, D. Imunologia Médica, 9.edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 181-182.

STRATHDEE, S.A.; FRANK, J.W.; MCLAUGHLIN, J.; LEBLANC, M.; MAJOR, C.; O'SHAUGHNESSY, M.V.; READ, S.E. Quantitative Measures of Human immunodeficiency Virus-Specific Antibodies Predict Progression to AIDS. **The Journal of Infectious Diseases**, 172: 1375-1379, 1995.

TANTILLO, C.; DING, J.; JACOBO- MOLINA, A.; NANNI, R.G.; BOYER, P.L.; HUGHES S.H.; PAWWELLES, R.; ANDRIES, K.; JANSSEN, P.A.; ARNOLD, E. Locations of Anti-AIDS Drug Binding Sites and Resistance Mutations in the Three-Dimensional Stricture of HIV-1 Transcriptase Reverse Implications for Mechanisms of Drug Inhibition and Resistance. **Journal Molecular Biology**, 243: 369-387, 1994.

TANURI A., CARIDE E., DANTAS M.C., MORGADO M.G., MELLO D.L., BORGES S., TAVARES M., FERREIRA S.B., SANTORO-LOPES G., MARTINS C.R., ESTEVES A.L., DIAZ R.S., ANDREO S.M., FERREIRA L.A., RODRIGUES R., REUTER t., CAVALCANTI A.M., de OLIVEIRA S.M., de BARBOSA H.B., de TEIXEIRA P.R., CHEQUER P.N. Prevalence of Mutations Related to HIV-1 Antiretroviral Resistance in Brazilian Patients Failing HAART. **Journal Clinical Virology,** 25: 39-46, 2002.

THOMSON M.M., PÉREZ-ÁLVAREZ L., NÁJERA R. Molecular Epidemiology of HIV-1 Genetic Forms and its Significance for Vaccine Development and Therapy. **Lancet Infectious Diseases,** 2: 461-471, 2002.

TUDOR, W.G.; St. CLAIR, M.; McKINNEY, R.E.; MAHA, M.; WALTER, E.; SANTACROCE, S.; MINTZ, M.; O'DONNELL, K.; RUDOLL, T.; VARRO, C.L.- HIV-1 Sensitivity to Zidovudine and Clinical Outcome in Children. **Lancet,** 339: 15-19, 1992.

VELLA S., PALMISANO L. Antiviral Therapy: State of the HAART. **Antiviral Res 2:** 147-151.

VELLA S. Antiretroviral Drug Resistance and HIV/AIDS in Developing World. **J HIV Therapy, 7**: 53-55, 2002.

VILLALBA N., GÓMEZ-CANO M., HOLGUIN A., et al. Multiple Drug Resistance Genotype Causing Failure of Antiretroviral Treatment in an HIV-Infected Patient Heavily Exposed to Nucleoside Analogues. **Eur. J. Clinical Microbiology Infectious Diseases.**18: 327-5, 1999.

WWW.AIDS.GOV.BR

WWW.GOOGLE.COM.BR

WWW.MISCHICAGO.ORG/EXHIBIT/AIDS /AIDS/C5.HTML

WWW.AJC.PT/CIENCIAJ/N23/INVIVO/PHP

WWW.ROCHE.COM.BR

WANG, Y.M.; DYER A., W.B.; WORKMAN, C.; WANG, B.; SULLIVAN A., J.S.; SAKSENA, N.K.- Molecular Evidence for Drug-Induced Compartmentalization of HIV-1 Quasiespecies in a Patient with Periodic Changes to HAART. **AIDS**, 14:2265-2272, 2000.

WAINBERG M.A., SALOMON H., GU Z., MONTANER J.S., COOLEY T.P., MCCAFFREY R., RUEDY J., HIRST H.M., CAMMACK N., CAMERON J. Development of HIV-1 Resistance to (-)2'-Deoxy-3'-Thiacytidine in Patients with AIDS or Advanced AIDS-Related Complex. **AIDS,** 9:351-357, 1995.

WAINBERG, M.A.; FRIEDLAND, G. – Public Implications of Antiretroviral Therapy and Drug Resistance. **JAMA**, 279: 1977-1983, 1998.

WAINBERG, M.A, WHITE A.J. Current Insights into Reverse Transcriptase Inhibitor-Associated Resistance. **Antivir Therapy,** 6: 11-19, 2001.

WAINBERG M.A.The Impact of the M184V Substitution on Drug Resistance and Viral Fitness**. Expert. Rev. Infect. Therapy,** 2: 147-151, 2004.

WEBER, B.; FALL, E.H.M.; BERGER, A.; DOERR, H.W. Reduction of Diagnostic Window by New Fourth Generation Human Immunodeficiency Virus Screening Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, 36: 2235-2239, 1998.

WEGNER, S.A.; BRODINE, S.K.; MASCOLA, J.R.; TASKER, S.A.; SHAFFER, R.A.; STARKEY, M.J.; BARILE, A.; MARTIN, G.J.; ARONSON, N.; EMMONS, W.W.; STEPHAN, K.; BLOOR, S.; VINGERHOETS, J.; HERTOGS, K.; LARDER, B. Prevalence of Genotipyng and Phenotyping Resistance to Anti-Retroviral Drugs in a Cohort of Therapy-Naive HIV-1 Infected US Military Personnel. **AIDS**, 14: 1009-1015, 2000.

WIGG, M.D.- Antivirais.In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M. D. – **Introdução a Virologia Humana.** Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2002. p - .

WILLIAMS, P; SIMMONDS, P.; YAP, P.L.; BALFE, P.; BISHOP, J.; BRETTLE, R.; HAGUE, R.; HARGREAVES, D.; INGLIS, J.; BROWN, A.L.; PEUTHERER, J.; REBUS, S.; MOK, J. – The Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Vertically Transmitted HIV Infection. **AIDS,** 4: 393-398, 1990.

WU, T. D.; SCHIFFER, C. A.; GONZALES, J. M.; TAYLOR, J.; RAMI-KANTOR; CHOU; S; ISEAELSKI, D.; ZOLOPA, A. R.; JEFFREY-FESSEL, W.; SHAFER, R. W. Mutation Patterns and Structural Correlates in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Folowing Different Protease Inhibitor Treatments. **Journal of Virology,** 77: 4836-4847, 2003.

ZAZZI, M.; ROMANO, L.; CATUCCI, M.; DE MILITO, A.; ALMI, P.; GONELLI, A. RUBINO, M.; VALENSIN, P.E. – Low Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) DNA Burden as a Major Cause for Failure to Detect HIV-1 DNA in Clinical Specimens by PCR. **Journal of Clinical microbiology**, 33: 205-208, 1995.

ZIEGLER, J.B.; BLANCHE, S.; LOH, R. – Children with HIV. **JAMA**, 164: 672-679, 1996.

ZOLLNER, B.; FEUCHT, H-H.; MATTNER, U.M.; HELLING-GIESE, G.; BAUMGARTNER, E.M; LAUFS, R. – Better Prediction of Vertical HIV-1 Transmission From Maternal Blood at Delivery Compared with cor Blood Sample. **AIDS,** 10: 1600-1601, 1996.

9- ANEXOS

CONSENTIMENTO PÓS - INFORMAÇÃO

Título do Projeto: Resistência à drogas antiretrovirais em crianças infectadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

- Pesquisadores: Beatriz Aparecida Passos Bismara, Dra. Sandra Cecília B. Costa
- Paciente:
- HC:
- Idade:
- Endereço:

Eu,....., RG....., responsável ou tutor legal da criança....., aceito que esta venha a colaborar com um estudo que está sendo realizado na Universidade Estadual de Campinas, para a Resistência a drogas antiretrovirais em crianças infectadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1). para sua detecção precoce. Sei que será realizada de uma a quatro coletas de sangue periférico (por punção venosa, de 03 a 05 ml)) para realização de PCR (método mais sensível e mais rápido para o diagnóstico). Essa investigação não acarretará gastos à minha pessoa nem riscos à saúde da criança. Foi assegurado que os resultados serão fornecidos quando for de minha vontade, bem como foi garantido sigilo quanto às informações. Poderei suspender a participação da criança no projeto se assim desejar, sem prejuízo do atendimento normalmente feito pelos profissionais responsáveis.

Qualquer esclarecimento, entrar em contato com os responsáveis pelo estudo, nos telefones:
* Beatriz Aparecida Passos Bismara- (0XX15) 9719-3373 ou no Lab. de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular - (0XX19) 3788-7095, Dra. Sandra C. B. Costa - (0XX19) 9605-3494 ou, com o Comitê de Ética em Pesquisa - (0XX19) 3788-8936.

Campinas, ____ de _____ de 2003.

_____ _____

Responsável ou tutor legal pelo paciente **Pesquisador**