

ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES HIV POSITIVOS/ AIDS DO MATO GROSSO DO SUL

Silveira, Alexsander Augusto; **Viegas**, Angela Alves; **Pereira**, Gisner Alves de Souza; **Visconde**, Ana Maria; **Stefani**, Mariane Martins de Araújo

Universidade Federal de Goiás
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Departamento de Imunologia

alekfarm2000@yahoo.com.br

Palavras-chaves: Diversidade genética do HIV-1, HMA

1. Introdução

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida-SIDA/aids foi primeiramente descrita na década de 80 e atualmente lidera a causa de mortes em países em desenvolvimento. Globalmente, acredita-se que existam 40 milhões de pessoas vivas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), 70% das quais vivem na África sub-Saariana (Peeters et al. 2003).

A epidemia da aids foi introduzida no Brasil através de homossexuais masculinos, na região sudeste do país, durante a primeira metade da década de 80. Em seguida expandiu-se para as outras regiões brasileiras e para outros grupos populacionais (usuários de drogas injetáveis, hemofílicos, crianças nascidas de mães infectadas e mulheres com parceiros infectados). Hoje, no Brasil, já foram notificados 362.364 casos de Aids (Ministério da Saúde 2005).

A aids é causada por um retrovírus da família lentivírus denominado Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Existem dois tipos de HIV: HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 o responsável pela pandemia global. Do ponto de vista imunológico a infecção pelo HIV-1 é caracterizada por uma perda progressiva dos linfócitos TCD4⁺, ativação crônica do sistema imune e uma falha na defesa contra outros microrganismos (Peeters et al.2003).

Uma das características marcantes do HIV-1 é a sua extensa diversidade genética. De acordo com as seqüências de nucleotídeos ou de aminoácidos dos genes env e gag, o HIV-1 compreende a três grupos distintos: o grupo M "major", Grupo O "outlier" e o grupo N "non-M, non-O". O grupo M possui nove subtipos e dois sub-subtipos (A1, A2, B, C, D, F, G, H, J, K) que são responsáveis pela epidemia de aids no mundo (Thonsom et al.2002, Perrin et al. 2003).

As recombinações genéticas entre formas virais distintas e mutações ocasionadas por erros no funcionamento da transcriptase reversa contribuem para a geração da diversidade. No HIV-1, as recombinações podem ocorrer entre diferentes fragmentos de um mesmo subtipo (recombinação intrasubtipo), entre diferentes subtipos (recombinação intersubtipo) ou ainda entre diferentes grupos (recombinação intergrupo) (Nájera et al. 2002). Eventos recombinantes entre variantes genéticas distintas, infectando uma única célula de um indivíduo têm

originado diferentes “Circulating Recombinant Forms” ou “CRFs”. Dezesesseis “CRFs” capazes de gerar microepidemias foram identificados até o momento e estas formas recombinantes vêm ocupando papel cada vez mais importante na epidemia da aids. No momento é pouco provável que novas variantes genéticas, não híbridas, sejam descritas (Nájera et al.2002, Perrin et al.2003).

Estudos genotípicos do HIV-1 realizados, principalmente em pacientes das regiões sul e sudeste do Brasil, revelaram a presença principalmente do subtipo B, seguido dos subtipos F e C, recombinante B/F e mais recentemente alguns casos do subtipo D (Tanuri et al. 1999, Guimarães et al. 2002, Morgado et al. 2002, Soares et al. 2003, Couto – Fernandez et al. 2006). O primeiro caso de recombinação intersubtipo foi publicado no Brasil em 1994, compreendendo a forma recombinante BF identificada em dois parceiros sexuais (Sabino et al.1994). Uma frequência aumentada de recombinantes intersubtipos do HIV-1, especialmente BF foi relatada em estudos subseqüentes (Robertson 1995).

2. Justificativa

O Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase do IPTSP/UFG, vem estudando as variantes genéticas predominantes do HIV-1 em pacientes soropositivos ou aids provenientes da região Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) e da região norte (Tocantins). O estado do Mato Grosso do Sul representa uma região geográfica estratégica para a rota de drogas, devido a sua proximidade com outros países da América Latina como Bolívia, Paraguai e conta com expressivo contingente de sulistas que para lá migraram com a abertura de uma nova fronteira agrícola. Sabemos que migrações e viagens favorecem disseminação e diversidade viral. Quanto maior o número de variantes do HIV -1 circulantes entre pacientes de uma região, maiores as chances de super-infecção e geração de recombinantes.

A principal justificativa para este estudo é contribuir para o mapeamento genético molecular do HIV-1, na região do Centro-Oeste do Brasil-MS. Estudos nesta área são importantes na identificação de possíveis sítios para testagem de candidatos à vacina contra infecção pelo HIV-1. Há consenso de que na busca de uma vacina eficaz contra o HIV-1, deve-se testar protótipos vacinais semelhantes às formas virais circulantes na região.

A extrema variabilidade genética do HIV-1 representa um dos maiores desafios para a produção de uma vacina profilática que seja eficaz em nível global. Nos ensaios clínicos de fase 3 já realizados foram utilizados protótipos genéticos semelhantes as variantes genéticas predominantes nos sítios de testagem (Harro et al. 2004)

3. Objetivo

Caracterização da diversidade genética do HIV-1 incluindo identificação dos subtipos em duas regiões distintas do genoma viral, env e gag em amostras de pacientes HIV positivos ou com aids provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul.

4. Materiais e Métodos

Os pacientes foram recrutados no Laboratório Central (LACEN) de Campo Grande/ MS onde fazem acompanhamento de carga viral e contagem de CD4.

A caracterização genética do HIV-1 foi realizada pelo Ensaio de Mobilidade do Heteroduplex (HMA), utilizando-se como regiões alvo parte dos genes env e

gag. A técnica se baseia na mobilidade eletroforética de “heteroduplexes” de DNA obtidos através da associação de DNA do HIV-1 de pacientes infectados com seqüências de DNA do vírus de cepas de referências¹⁵. A técnica consiste de três etapas: extração do DNA genômico do HIV-1 através da lise de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs); amplificação viral pela técnica de “nested-PCR” para gerar fragmentos de cDNA a serem empregados no HMA e para a identificação dos “heteroduplexes” através da eletroforese em gel de poliacrilamida.

A lise das células mononucleares foi realizada pela utilização da solução lítica DNAzol – Tiocianato de guanidina, Isocianato de guanidina, Monotiocianato de guanidina e ácido tiocianato (Molecular Research Center Inc.Cincinatti, Ohio, USA), utilizando também etanol 100%, para precipitação do DNA genômico e solubilizado com água miliQ.

O “nested-PCR” consistiu em amplificação realizada em duas etapas, para a geração de fragmentos em quantidades suficientes para a realização do HMA. A primeira etapa para env emprega os primers ED5/ED12 e amplificam um fragmento gênico de 1,25Kb, que compreende as áreas que codificam as regiões variáveis V1-V5 da proteína gp120. Na segunda etapa os primers utilizados são os ES7/ES8, que amplificam um fragmento gênico de 666pb compreendendo as áreas que codificam as regiões variáveis V3-V5.

Na amplificação do gene gag, na primeira etapa são empregados os primers H1G777/H1P202 que amplificam um fragmento de 1,1kb. O fragmento gerado compreende a região que codifica a partir do aminoácido 16 da proteína do capsídeo p24 até o aminoácido 33 da enzima protease. Na segunda etapa os primers utilizados são H1Gag1584/g17 que amplificam um fragmento de 460 pb correspondendo à região que codifica para o aminoácido 132 da proteína p24 até o aminoácido 40 da proteína do nucleocapsídeo p7.

Cepas de referência dos subtipos A-D, F-H, J e K contidas em plasmídeos são amplificadas com os primers do segundo ciclo “nested- PCR” para serem utilizados no HMA.

Todos os produtos das reações do “nested-PCR” e dos plasmídeos foram avaliadas em gel de agarose antes da realização do HMA. A formação dos “heteroduplexes” ocorre após a desnaturação da mistura (amostras de HIV-1 desconhecidas com os plasmídeos de referência) por calor e a renaturação rápida por resfriamento em gelo. Durante este procedimento são gerados “homoduplexes” (renaturação das fitas originais da amostra com ela mesma) e “heteroduplexes” (renaturação de uma das fitas da cepa de referência com uma das fitas da amostra desconhecida).

Os “homoduplexes” e “heteroduplexes” são separados por eletroforese em gel de poliacrilamida, corados com brometo de etídio e visualizado no transluminador (UV). Os “heteroduplexes” formados entre a amostra desconhecida e a de referência com maior homologia genética exibem uma rápida mobilidade no gel de poliacrilamida.

A relação do HMA para os genes env e gag do HIV-1, permite uma correta caracterização dos subtipos e “CRFs”. Porém, o HMA é uma técnica de triagem molecular, sendo necessário sequenciamento genômico para análise filogenética (Delwart et al.1993, Heyndrickx et al. 2000).

5. Resultados

Avaliando - se os resultados da subtipagem genética do HIV-1 nas regiões env e gag por HMA das 160 amostras, foi observado o predomínio do subtipo B em ambas as regiões env e gag em 44,4% das amostras (71). O perfil F^{env}/F^{gag} foi observado em 2,5% das amostras (4), o perfil C^{env}/C^{gag} foi observado em 1,2% das amostras (2). Em 8,1% (13) das amostras foram subtipadas com o perfil B, apenas na região de env. Quatro amostras (2,5%) foram subtipadas com o perfil F, apenas na região de gag e duas amostras (1,2%) foram subtipadas com o perfil C, apenas na região de gag. As outras amostras apresentaram um padrão genotípico híbrido, com subtipos distintos detectados em env e em gag: o perfil híbrido B^{env}/F^{gag} foi observado em 11 amostras (6,9%), o perfil F^{env}/B^{gag} em 10 amostras (6,2%), B^{env}/C^{gag} em uma amostra (0,6%), C^{env}/D^{gag} em uma amostra (0,6%) e por último o perfil híbrido C^{env}/B^{gag} em uma amostra (0,6%). Em 33 amostras não foi possível determinar o subtipo do HIV-1 pela técnica HMA gag e em 46 amostras pela técnica HMA env.

6. Conclusão

A caracterização da diversidade genética do HIV-1, pelo Ensaio de Mobilidade de Heteroduplexes (HMA), incluindo identificação dos subtipos em duas regiões distintas do genoma viral, env e gag em amostras de pacientes HIV positivos ou com aids provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul, é de extrema relevância e elucidação do vírus na região central do país. Uma vez que a extrema variabilidade genética do HIV-1 representa um dos maiores desafios para a produção de uma vacina profilática e para o auxílio de possíveis testes de protótipos vacinais semelhantes às formas virais circulantes na região.

7. Referências Bibliográficas

Clayton D. Harro, Franklyn N. Judson, Geoffrey J. Gorse, Kenneth H. Mayer, Jay R. Kostman, Stephen J. Brown, Beryl Koblin, Michael Marmor, Bradford N. Bartholow, Vladimir Popovic. Recruitment and baseline epidemiologic profile of participants in the first phase 3 HIV vaccine efficacy trial. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37: 1385-1392, 2004.

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

Delwart EL, Shpaer EG, McCutchan FE et al. Genetic relationships determined by heteroduplex mobility assay: analysis of HIV env genes. *SCIENCE* 262: 1257-1261, 1993.

Guimaraes ML, Moreira AS, Morgado MG 2002. Polymorphism of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Brazil: genetic characterization of the nef gene and implications for vaccine design. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 523-526.

Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay. *Journal of Virology* 74: 363-370, 2000.

Luc Perrin, Laurent Kaiser, Sabine Yerly. Travel and spread of HIV-1 genetic variants. *The Lancet Infectious Diseases* 3: 22-23, 2003.

Martine Peeters, Coumba Toure-Kane, John N. Nkengasong. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS* 17: 2547-2560, 2003.

Michael M Thomsom, Lúcia Pérez-Álvarez, Rafael Nájera. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *The Lancet Infectious Diseases* 2: 461-470, 2002.

Ministério da Saúde 2005 – MS Webpage <http://www.aids.gov.br>

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

Rafael Nájera, Elena Delgado, Lúcia Pérez-Álvarez, Michael M Thomsom. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 16: S3-S6, 2002.

Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. *Nature* 374: 124-126, 1995.

Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 68: 6340-6346, 1994.

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

Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M 1999. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20(1): 60-6.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/ Bolsa Mestrado, CNPq # 474174/03-4