

## CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DO HIV-1 EM PACIENTES DOS ESTADOS DO TOCANTINS E DO MATO GROSSO.

**VIEGAS**, Ângela Alves<sup>1</sup>; **SILVEIRA**, Alexsander Augusto<sup>1</sup>; **VISCONDE**, Ana Maria Rodrigues<sup>1</sup>; **SOARES** Maria Selma<sup>2</sup>; **MUSSI**, Aparecida DH<sup>3</sup> & **STEFANI**, Mariane Martins de Araújo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás-UFG Goiânia-Goiás; LACENs: <sup>2</sup>Palmas-TO, <sup>3</sup>Cuiabá-MT.

Palavras-chave: HIV, HMA, Genotipagem

### 1.INTRODUÇÃO

Em 1983 foi identificado o Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA/AIDS). O HIV-1 é considerado um dos patógenos emergentes de maior polimorfismo genético que se conhece (Gallo et al., 1983; Barre-Sinoussi et al., 1983). Estudos baseados em sequenciamento, análises filogenéticas e modelos matemáticos estimam que o HIV começou a se diversificar na população humana em torno de 1931 (Korber et al., 2000). Os reservatórios naturais do HIV-1 são os chimpanzés da sub espécie *Pan troglodites troglodites* e a introdução do HIV-1 na espécie humana ocorreu por pelo menos eventos de transmissão zoonótica (Gao et al., 1999). O HIV-1 pode ser classificado em três grupos principais: M (Major/Main), N (Non-M, Non-O/ New) e O (Outlier) (Simon et al., 1998; Gurtler et al., 1994). O grupo M é o mais prevalente e pode ser subdividido em nove subtipos (A-D, F-H, J, K) originários da África Central. Os subtipos A e F apresentam sub-subtipos A1, A2 e F1, F2 que divergem de 10 a 15% na seqüência de nucleotídeos (Thomson et al., 2002; Kandathil et al., 2005). Entre os subtipos do grupo M observa-se 25-35% de diferença entre os nucleotídeos do gene env e no gene gag esta diferença é de aproximadamente 15% (Robertson et al., 2000; Takebe et al., 2004).

A circulação de vários subtipos do HIV-1 em uma mesma região geográfica favorece a co-infecção ou superinfecção. Eventos de recombinação entre o mesmo subtipo (intrasubtipo) ou entre dois ou mais subtipos diferentes (intersubtipo) que infectam uma mesma célula pode resultar em vírus mosaicos. Dois tipos principais de HIV-1 recombinantes têm sido identificados: CRFs – formas recombinantes circulantes e as URFs- formas recombinantes únicas (Thomson et al., 2002). Se o recombinante for identificado em no mínimo três indivíduos sem vínculo epidemiológico e caracterizado pelo sequenciamento completo do genoma, ele é designado CRF. Mas dois genomas completos e a seqüência parcial de uma terceira cepa são suficientes desde que a seqüência parcial confirme a estrutura mosaica do CRF (Peters et al., 2000). Há atualmente 32 CRFs reconhecidos (Los Alamos - HIV Sequence database 2005).

No Brasil, o maior país da América do Sul e o mais afetado pela epidemia do HIV/AIDS, a taxa de prevalência é em torno de 0,6% (AIDS Boletim Epidemiológico, 2005). Diversos estudos sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil principalmente do sul e do sudeste mostram a predominância do subtipo B e a

presença dos subtipos F (Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization, 2000), C (Csillag et al., 1994), D (Morgado et al., 1998) e A (Caride et al., 2001), e dos recombinates B/F e B/C (Sabino et al., 1994; Sanabani et al., 2006). Sabe-se que viagens e migrações populacionais contribuem para a diversidade genética do HIV-1. A diversidade populacional e o forte componente migratório presente nos estados do Tocantins e Mato Grosso contribuíram para a formação de populações heterogêneas, principalmente no recém criado estado do Tocantins. Até o momento pouco se conhece sobre a diversidade genética do HIV-1 no estado do Mato Grosso e não existem relatos referentes ao estado do Tocantins. O objetivo deste estudo é realizar triagem molecular de amostras de HIV-1 de pacientes dos estados do Tocantins e do Mato Grosso.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. População de estudo

A população alvo deste estudo consiste de pacientes infectados pelo HIV-1 atendidos no Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN, de Palmas no estado do Tocantins (n=84) e em Cuiabá no Mato Grosso (n=67), onde são realizados os testes de Carga Viral e contagens de linfócitos TCD4+. Após assinatura do termo de consentimento informado pelo paciente, foi realizada entrevista através de questionário padronizado para obtenção de dados sócio demográficos, categoria de exposição e tratamento antiretroviral. Amostras de sangue EDTA foram coletadas, alíquotadas e congeladas a -80°C até o processamento.

### 2.2. Processamento das amostras

Após lise das hemáceas (Triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 1M, Tris-HCl 1M, Sucrose 1M) extraímos DNA genômico (DNAzol, Molecular Research Center Inc., Cincinnati, Ohio, USA). O DNA precipitado pelo etanol foi ressuscitado no tampão TE (Tris-EDTA) e estocado a -80°C. O gene gag do HIV-1 foi amplificado por nested polymerase chain reaction (Nested PCR) usando os seguintes pares de iniciadores: H1P202/H1G777 e H1Gag1584/g17 para o gene gag. A determinação dos subtipos do HIV-1 no gene gag foi realizada pela Heteroduplex Mobility Analysis empregando reagentes providos pelo NIH/AIDS Reagent Program (HIV-1 gag HMA subtyping kit, protocol version 5).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quarenta e oito isolados de HIV-1 de pacientes do Tocantins foram analisados quanto à diversidade genética do HIV-1 no gene gag, na região que codifica o aminoácido 132 da p24 até o aminoácido 40 da p7. Utilizando-se os pares de iniciadores H1P202/H1G777 e H1Gag1584/g17, obtivemos amplificação em 48/48 amostras (100%). Os subtipos do HIV-1 identificados na região gag, indicam predominância do subtipo B (n=41). Outros subtipos do HIV-1 também foram encontrados na região de gag: C (n=2) e F (n=3). Dois isolados apresentaram perfil eletroforético compatível com BD.

Das amostras de Mato Grosso 41 isolados de pacientes do Mato Grosso foram analisados quanto à diversidade genética do HIV-1 no gene gag. Utilizando os mesmos pares de iniciadores obtivemos amplificação em 28/41 amostras (%). Treze amostras foram amplificadas com os iniciadores alternativos (HGHMA822 e g17). Os subtipos do HIV-1 identificados na região gag, indicam predominância do subtipo B (n=23). Outros subtipos do HIV-1 também foram encontrados na região de gag: C (n=5), F (n=3). Dez isolados apresentaram perfil eletroforético compatível com BD.

Há diferenças na distribuição dos subtipos entre as regiões geográficas. Em estudos realizados no norte e sudeste mostram a predominância do subtipo B seguido pelo subtipo F (Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization, 2000; Vicente et al., 2000). O subtipo B também é predominante no nordeste (Couto-Fernandez et al., 1999) e no centro-oeste (Stefani et al., 2000) com casos limitados dos subtipos F e C. O subtipo C foi primeiramente detectado no sul do Brasil em amostras coletadas em Porto Alegre, RS (Csillag et al., 1994). Amostras retrospectivas de 1991 e 1992 foram seqüenciadas pela WHO HIV Network (WHO Network for HIV Isolation and Characterization, 1994), mostrando que desde 1992 este subtipo já estava no país (Soares et al., 2003). É na região sul que ocorre o maior número de infecções pelo subtipo C em contraste com o padrão de distribuição do resto do país (Morgado et al., 2002). A detecção do HIV-1 subtipo C no estado do Tocantins indica sua dispersão e interiorização pelo país.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados da triagem molecular do HIV-1 na região gag indicam que o subtipo B é o mais prevalente nos Estados do Tocantins e Matos Grosso, seguido do subtipo F. HIV-1 subtipo C que é prevalente no sul onde foi introduzido no país, já está circulando em pacientes da região centro oeste e no Estado do Tocantins na região norte indicando sua dispersão e interiorização pelo país.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIDS Boletim Epidemiológico, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS Ministério da Saúde. **AIDS Boletim Epidemiológico, Ano I 2005; 1 : 26-33.**

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** 1983; 220 : 868-71.

Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization (Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigod LFM, Caseiro M, Couto-Fernandez JC, Ferreira PC, Freitas CO, Galvão-Castro B, Greco D, Guimarães ML, Linhares de Carvalho MI, Morgado MG, Oliveira CAF, Osmanov S, Ramos CA, Rossini M, Sabino E, Tanuri A, Ueda M). HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biological and immunological characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. **J AIDS** 2000; 23 : 184-93.

Caride e,I Brindeiro r, Hertogs K, Larder B, Cehertogh P, Machado e, sá CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazanz A, Tanuri A. Drug-resistant reverse transcriptase

genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients falling HAART. **Virology** 2001; 275 : 107-115.

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

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

Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science** 1983; 220: 865-7.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature** 1999; 397 : 436-41.

Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, *et al.* A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **J Virol** 1994, 68 : 1581-5.

Kandathil AJ, Ramalingam S, Kannangai R, David S, Sridharan G. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J Med Res* 2005; 121 : 333-44.

Korber B, Muldoon, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science** 2000; 288: 1789-96.

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

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

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

Peters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. **AIDS** 2000; 14 (Suppl 3) : S129-40.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B 2000. HIV-1 nomenclature proposal: A reference guide to HIV-1 classification. <http://hivweb.lanl.gov/immunology/articles/nomenclature/Nomen.html>.

Sabino E, Shpaer E, Morgado MG, Kober BT, Diaz RS, Bongertz V, Cavalcante S, Galvão-Castro B, Mullins JI, Mayer A. Identification of a new HIV-1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. **J Virol** 1994; 68 : 6340-6.

Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol** 2006; 6 (5) : 368-77.

Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vézinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Med** 1998; 4 : 1032-7.

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

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

Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. **Pediatrics International** 2004; 46 : 236-44.

Thomson MM, Casado G, Posada D, Sierra M, Nájera R. Identification of novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18\_cpx) of Central African origin in Cuba. **AIDS** 2005; 19 : 1155-63.

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

Vicente ACP, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, Hu D, Rayfield MA, Bretas G, Tanuri A. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B e F. **J AIDS** 2000; 23 : 327-31.

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

WHO Network for HIV Isolation and Characterization. HIV-1 type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. **AIDS Res Hum Retroviruses** 1994; 10 : 1327-43.