

*TATIANE PEDROSO KITAMURA*

**PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM PAPEL FILTRO  
PARA A APLICAÇÃO EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE INFECÇÃO  
PERINATAL PELO HIV-1**

**CAMPINAS**

**2005**

**TATIANE PEDROSO KITAMURA**

**PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA EM PAPEL FILTRO  
PARA A APLICAÇÃO EM AMOSTRAS SUSPEITAS DE INFECÇÃO  
PERINATAL PELO HIV-1**

*Dissertação de mestrado apresentada à Pós Graduação em  
Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do  
Título de Mestre em Farmacologia*

**ORIENTADORA:** *Prof<sup>ª</sup>. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa*

**CAMPINAS**

**2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP**

Bibliotecária: Sandra Lúcia Pereira CRB 8ª /6044

K646p

KITAMURA, Tatiane Pedroso

Padronização da extração de DNA em papel filtro para a aplicação em amostras suspeitas de infecção perinatal pelo HIV-1/ Tatiane Pedroso Kitamura. Campinas, SP [s.n.], 2006.

Orientadora: Sandra Cecília Botelho Costa  
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Aids. 2. Reação em cadeia da polimerase. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título

slp/fcm

---

**Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**  
TATIANE PEDROSO KITAMURA

---

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Cecília B. Costa

---

---

**Membros:**

---

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa *Sandra Cecília Botelho Costa*

Profa. Dra. Maria Aparecida Barone Teixeira *Barone*

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela *M. Marluce*

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências  
Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 31/01/2005

---

## ***DEDICATÓRIA***

*Ao meu pai Mitsuo e minha mãe Noêmia, pelo amor, carinho, compreensão, apoio, incentivo ao estudo e por estarem sempre ao meu lado dando-me força e coragem para continuar meu caminho.*

*À minha irmã Tálita, pelo amor, companheirismo, paciência e conselhos.*

## ***AGRADECIMENTOS ESPECIAIS***

---

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa, pela orientação, carinho, confiança, conselhos, amizade e por ter tornado possível mais essa etapa da minha vida.*

## *AGRADECIMENTOS*

---

Ao Prof. José Benedito Fioravanti, pelo carinho e incentivo no início dessa jornada.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Edi Lúcia Sartorato, pela colaboração e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Eros Antonio de Almeida pela amizade, carinho, bom humor e palavras de apoio e incentivo.

À Fernanda Aparecida Costa, pela grande amizade, meiguice e por estar sempre ao meu lado nas dificuldades.

À Beatriz Bismara, pelo carinho, amizade, palavras de incentivo e companheirismo.

À Rosana Mara Molina Marçal, pelos ensinamentos, carinho, amizade, bom humor, palavras de incentivo e conselhos.

À Paula Durante de Andrade, pelos ensinamentos, cuidados, carinho e amizade.

Aos meus tios e primos que me acolheram tão carinhosamente.

Às amigas e companheiras de laboratório, Gláucia, Andréa, Keila, Anali, Rose, Cris, Bia, Ester, Dani, Gabi, Ana Maria.

Aos amigos, que mesmo de longe, acompanharam essa etapa da minha vida, Sassá, Érika Peral, Cris Biral, Mário Henrique Sanchez, Carlinhos Maquea, Cássio Rodrigo de Almeida, por compartilhar minhas alegrias e tristezas.

Aos secretários dos Departamentos de Farmacologia e Clínica Médica, Vanderley e Ademir, pela simpatia com que somos recebidos.

À auxiliar de enfermagem Elza e suas ajudantes, pela coleta das amostras, carinho e dedicação.

Às crianças e seus pais, que colaboraram com este estudo doando um pouquinho de si, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

À Deus, meu Pai, por atender minhas orações, ser a minha grande Luz.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado, e que talvez eu tenha esquecido de mencionar.

**RESUMO** .....xxxv

**ABSTRACT** .....xxxix

**1 INTRODUÇÃO** ..... 43

**1.1 Histórico** ..... 45

        1.1.1 A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids)..... 45

**1.2 Aids no Brasil** ..... 46

**1.3 Transmissão perinatal do HIV na cidade de Campinas e no Hospital das Clínicas da Unicamp** ..... 47

**1.4 O vírus da imunodeficiência humana** ..... 48

        1.4.1 Taxonomia viral ..... 48

        1.4.2 Estrutura viral ..... 48

        1.4.3 O genoma do vírus HIV-1 ..... 50

        1.4.4 Ciclo biológico do HIV-1 ..... 55

        1.4.5 Padrões de infecção causados pelo HIV ..... 56

**1.5 Diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em crianças com suspeita de transmissão perinatal** ..... 58

**2 OBJETIVOS** ..... 63

**3 CASUÍSTICA** ..... 68

**4 MÉTODOS** ..... 72

**4.1 Extração de DNA: Papel filtro** ..... 74

        4.1.1 Preparação das amostras ..... 74

<b>4.2</b>	<b>Extração do DNA - Sangue periférico coletado em tubo contendo EDTA: Método rápido TKM1- TKM2</b> .....	75
4.2.1	Preparação das amostras.....	75
4.2.2	Lise das hemácias.....	75
4.2.3	Lise de leucócitos.....	75
4.2.4	Precipitação do DNA.....	76
<b>4.3</b>	<b>Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</b> .....	76
4.3.1	Condições da reação.....	76
4.3.2	Detecção do fragmento amplificado pela "Nested-PCR".....	78
4.3.3	Amplificação gênica pela PCR para o gene da $\beta$ -globina humana como controle interno da reação.....	79
<b>4.4</b>	<b>Normas utilizadas para evitar contaminação nas amostras</b> .....	79
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	81
<b>5.1</b>	<b>Resultados da "Nested-PCR", tendo como controle interno de reação, a amplificação do gene humano da <math>\beta</math>-globina</b> .....	96
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	97
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	103
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	107
<b>9</b>	<b>APÊNDICES</b> .....	123
	<b>Apêndice 01 -</b> Dados pessoais das crianças e pais estudados.....	125
	<b>Apêndice 02 -</b> Resultados da "Nested - PCR" (regiões <i>gag</i> , <i>env1</i> e <i>env2</i> , <i>pol</i> ) em amostras obtidas em papel filtro, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).....	128

<b>Apêndice 03</b> - Resultados da "Nested - PCR" (regiões <i>gag</i> , <i>env1</i> e <i>env2</i> , <i>pol</i> ) em amostras obtidas de sangue total, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).....	131
<b>Apêndice 04</b> - Resultados da "Nested - PCR" (regiões <i>gag</i> , <i>env1</i> e <i>env2</i> , <i>pol</i> ) em amostras obtidas de sangue total, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).....	134
<b>Apêndice 05</b> - Resultados finais comparando as PCRs realizadas a partir de sangue coletado em papel filtro e com o sangue total coletado em tubo com EDTA. ....	137
<b>Apêndice 06</b> - Consentimento pós-informação. ....	140

## *LISTA DE ABREVIATURAS*

---

<b>AIDS</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>ARV</b>	Vírus relacionado à aids
<b>C</b>	Constante
<b>CD4</b>	Linfócito T auxiliar CD4
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Água destilada deionizada e estéril
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNTP</b>	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
<b>DST</b>	Doença sexualmente transmissível
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>ELISA</b>	Enzime Linked Immunosorbent Assay
<b>ENV</b>	gene estrutural comum a todos os retrovírus
<b>Gag</b>	gene estrutural comum a todos os retrovírus
<b>Gp</b>	glicoproteína
<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>HIV-1</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
<b>HIV-2</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 2
<b>HTLV-3</b>	Vírus linfotrópico T humano Tipo 3
<b>IgG</b>	Imunoglobulina da classe G

<b>kb</b>	Kilobases
<b>KCL</b>	Cloreto de potássio
<b>Kda</b>	Kilodaltons
<b>LAV</b>	Vírus associado a linfadenopatias
<b>LTR</b>	Long terminal repeats
<b>M</b>	Molar
<b>MgCL<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>MHC</b>	Complexo principal de histocompatibilidade
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NaCL</b>	Cloreto de sódio
<b>nef</b>	fator regulador negativo
<b>NH<sub>4</sub>CI</b>	Cloreto de amônio
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	Bicarbonato de amônio
<b>Nm</b>	Nanômetros
<b>P17</b>	glicoproteína P17
<b>P24</b>	glicoproteína P24
<b>P24</b>	Proteína de peso molecular de 24 kilodaltons
<b>P7</b>	glicoproteína P7
<b>pb</b>	Pares de bases

<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PF</b>	Papel filtro
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pol</b>	gene estrutural comum a todos os retrovírus
<b>rev</b>	regulador da expressão da proteína do vírion
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Duocil sulfato de sódio
<b>SSPE</b>	Tampão salino de fosfato de sódio e EDTA
<b>Taq</b>	Enzima taq DNA polimerase
<b>tat</b>	proteína transativadora
<b>TE</b>	Tampão de tris e EDTA
<b>TEB</b>	Tampão de tris aminometano, EDTA e ácido bórico
<b>TKM1</b>	Tampão de tris, cloreto de potássio e EDTA
<b>TKM2</b>	Tampão de tris, cloreto de potássio, EDTA e SDS
<b>TNE</b>	Tampão salino de tris aminometano e EDTA
<b>TRIS</b>	Tris (hidroximetil)
<b>tRNA</b>	RNA transportador
<b>U</b>	Unidade
<b>ul</b>	Microlitros
<b>V</b>	Variável

<b>V3</b>	terceiro domínio variável
<b>vif</b>	fator de infectividade viral
<b>vpu</b>	proteína viral U
<b>vpx</b>	gene regulatório específico do HIV-2

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 01.</b>	Casos de aids no Brasil segundo região de residência e por ano de diagnóstico, dados fornecidos pela Coordenação Nacional de DST e AIDS - Ministério da Saúde, Brasil.....	47
<b>Tabela 02.</b>	Casos de AIDS em menores de 13 anos de idade, segundo a categoria de exposição hierarquizada e ano de diagnóstico, dados fornecidos pela Coordenação Nacional de DST e AIDS - Ministério da Saúde, Brasil.....	59
<b>Tabela 03:</b>	Casuística da população de estudo.....	69
<b>Tabela 04.</b>	Seqüência dos nucleotídeos iniciadores ("Primers") utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR e "Nested-PCR") e sua localização no genoma do HIV-1.....	78
<b>Tabela 05.</b>	"Primers" externos e internos que flanqueiam uma região constante do gene da $\beta$ -globina utilizados como controle interno da PCR e "Nested-PCR".....	79
<b>Tabela 06.</b>	Resultados da "Nested-PCR" (regiões <i>gag</i> , <i>env1</i> e <i>env2</i> , <i>pol</i> ) em amostras coletadas em papel filtro, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).....	85
<b>Tabela 07.</b>	Resultados da "Nested - PCR" (regiões <i>gag</i> , <i>env1</i> e <i>env2</i> , <i>pol</i> ) em amostras obtidas de sangue total, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).....	86
<b>Tabela 08.</b>	Comparação dos resultados finais das PCRs para infecção pelo HIV-1 realizadas a partir de sangue coletado em papel filtro e sangue total coletado em tubo com EDTA.....	87

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 01.</b>	Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1(HIV-1).....	50
<b>Figura 02.</b>	Organização genômica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).....	54
<b>Figura 03.</b>	Reação em cadeia da polimerase (PCR) e "Nested-PCR". Cada ciclo consiste de desnaturação da fita molde, anelamento dos "primers" em cada fita-alvo complementar e síntese da seqüência entre os "primers" externos (PCR) e internos ("Nested-PCR").....	61
<b>Figura 04.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>gag</i> do HIV-1 ("primers" JA4-JA7), fragmento amplificado de 131 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA fixado em papel filtro.....	88
<b>Figura 05.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>gag</i> do HIV-1 ("primers" JA4-JA7), fragmento amplificado de 131 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA de sangue total.....	89
<b>Figura 06.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>env</i> (1) do HIV-1 ("primers" JA9-JA12), fragmento amplificado de 341 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA fixado em papel filtro.....	90
<b>Figura 07.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>env</i> (1) do HIV-1 ("primers" JA9-JA12), fragmento amplificado de 341 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA de sangue total.....	91
<b>Figura 08.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>env</i> (2) do HIV-1 ("primers" JA13-JA16), fragmento amplificado de 172 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA fixado em papel filtro.....	92
<b>Figura 09.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>env</i> (2) do HIV-1 ("primers" JA13-JA16), fragmento amplificado de 172 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA de sangue total.....	93
<b>Figura 10.</b>	Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene <i>pol</i> do HIV-1 ("primers" JA17-JA20), fragmento amplificado de 129 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA fixado em papel filtro.....	94

- Figura 11.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *pol* do HIV-1 ("primers" JA17-JA20), fragmento amplificado de 129 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA de sangue total.....95
- Figura 12.** Amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -globina humano (365pb). Controle de qualidade do DNA estudado.....96

*RESUMO*

A Aids é causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1). A infecção por este vírus tem diminuído significativamente entre a população pediátrica nos últimos anos, devido à atenção especial do Governo Brasileiro a pacientes infectados pelo HIV-1, entre eles as gestantes.

A transmissão perinatal do HIV-1 pode ocorrer durante a gestação, na hora do parto ou após o parto, através do aleitamento materno.

O diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em adultos e em crianças com idade superior a 18 meses é usualmente estabelecido por ensaios sorológicos que identificam anticorpos específicos contra o HIV-1. Entretanto, o recém - nato adquire os anticorpos maternos da classe IgG, durante a gestação, o que pode levar a um diagnóstico falso-positivo nessa criança.

O Ministério da Saúde no Brasil recomenda que o diagnóstico em crianças com idade inferior a 18 meses, seja feito através de técnicas de biologia molecular, pois estes detectam partículas virais e não os anticorpos contra o HIV-1. Um teste bastante eficiente é a reação em cadeia da polimerase (PCR), por ser um método de diagnóstico precoce, rápido, sensível, e que pode ter sua sensibilidade e especificidade elevada ainda mais com a realização de uma segunda reação de amplificação ("Nested-PCR").

A PCR detecta fragmentos - alvo do genoma viral, porém, para que as realizações das amplificações sejam satisfatórias, é necessária uma quantidade de sangue considerada de grande volume para recém - natos. Com base na necessidade de um diagnóstico precoce do HIV-1 e de uma melhor qualidade da amostra em pequenos volumes sangüíneos, este projeto teve como objetivo principal, a padronização da técnica de extração do DNA através de amostras sangüíneas colhidas em papel filtro, com utilização do kit FTA Cards (Life Technologies). Para confirmação da eficácia do método proposto foi realizada a técnica da "Nested-PCR", já previamente padronizada no laboratório onde foi desenvolvida a pesquisa, a partir de sangue periférico colhido com EDTA.

Para a realização da PCR e "Nested-PCR" foram utilizados quatro pares de "primers" externos (PCR) e internos ("Nested-PCR") para genes que flanqueiam regiões conservadas do HIV-1 (gene *gag*, gene *pol* e duas regiões do gene *env*).

Foram analisados 71 pacientes, sendo: 43 crianças com suspeita de infecção perinatal pelo HIV-1, 11 crianças e 14 adultos soropositivos (para controle positivo da reação) e 03 crianças negativas para infecção pelo HIV-1 (controle negativo da reação).

Os resultados obtidos mostraram concordância entre os dois métodos de extração estudados, confirmando dados da literatura, onde há a afirmação de que a extração de DNA colhido em papel filtro é uma técnica que pode ser aplicada com sucesso para a realização da "Nested-PCR" em diagnóstico de crianças com suspeita de infecção perinatal pelo HIV-1.

*ABSTRACT*

AIDS is caused by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). The infection by this virus is significantly falling between pediatric patients in the last years, mainly because the special interest of the Brazilian Government to the HIV-1 infected patients, especially the pregnant woman.

The perinatal HIV-1 transmission may occur during the pregnancy, at the time of the birth, or after the birth during breast feeding.

The diagnosis of HIV-1 infection in adults and children older than 18 months is usually defined by serological assays, which identify specific antibodies against HIV-1. However, the newborn acquire the IgG maternal antibodies during the pregnancy, which can result in a false positive diagnosis.

The Brazilian Department of Health suggests that the diagnosis in patients younger than 18 months old could be defined with molecular biology, because these tests usually detects viral particles and not the HIV-1 antibodies. A very efficient test, the polimerase chain reaction (PCR), can define the diagnosis precocious, quick and sensible, and, in addition, the performance of a second amplification reaction ("Nested-PCR") may elevate the sensibility and specificity of this test.

The PCR detects fragments of the viral genoma, however, to obtain satisfactory amplifications, it is necessary a large volume of blood of the newborn.

Based on the necessity of precocious diagnosis of HIV-1 and better quality of small blood volume sample, this project aim to standardize the technique of DNA extraction of blood sample obtained with filter paper, with the utilization of FTA Card kits (Life Technologies). To confirm the accuracy of this proposed method, it was applied the "Nested-PCR" technique, previously standardized in our laboratory, based on peripheral blood obtained with EDTA.

To perform the PCR and "Nested-PCR", there were utilized four pairs of external (PCR) and internal ("Nested-PCR") primers to genes which flank conserved regions of HIV-1 (*gag* gene, *pol* gene and two regions of the *env* gene). There were studied 71 patients: 43 children with suspicious HIV-1 perinatal infection, 11 children and 14 adults, who were HIV-1 seropositive, and three children HIV-1 negative (control group).

The results showed concordance between the two extraction methods studied, corroborating with the literature, which affirms that the DNA extraction obtained with filter paper is a technique that could be applied with success to perform "Nested-PCR" to the diagnosis of children with suspicious HIV-1 perinatal infection.

## 1 - INTRODUÇÃO



## 1.1 Histórico

### 1.1.1 A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS)

Em junho de 1981, o Centro para Controle de Doenças dos Estados Unidos relatou que cinco homossexuais jovens do sexo masculino haviam contraído *Pneumocystis carinii*, sendo que dois deles haviam morrido. Marcou-se assim, o início de uma epidemia conhecida como aids, caracterizada por imunossupressão grave associada a infecções oportunistas, neoplasias secundárias e manifestações neurológicas (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996).

Foram identificados cinco grupos de risco entre a população adulta para essa epidemia, homossexuais ou bissexuais do sexo masculino, usuários de drogas intravenosas, hemofílicos, receptores de sangue e hemoderivados e contatos heterossexuais entre membros de alto risco (GALLO & MONTÀIGNIER, 1988; SCHLEUPNER, 1988; CLEWLEY, 1989; LIFSON *et al.*, 1990; RUBINI, 1995; GALEL, LIFSON, ENGLEMAN, 1995; COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996). Porém, a partir de 1983, tem-se observado um grande número de casos na população pediátrica (COWAN *et al.*, 1984; CURRAN *et al.*, 1988).

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) é causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (GREENE, 1991), sendo que até o momento, foram isoladas duas formas geneticamente diferentes, HIV-1 e HIV-2 (POLLET *et al.*, 1991); porém, a maior parte dos casos em todo o mundo, tem como o principal causador o HIV-1 e não o HIV-2. A infecção pelo HIV-2 provoca uma infecção semelhante ao HIV-1, porém encontra-se principalmente limitada à África Ocidental (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996)

## 1.2 AIDS no Brasil

A epidemia no Brasil iniciou-se na região Sudeste, provavelmente pela cidade de São Paulo, onde os primeiros casos de aids foram documentados, em 1982 (SABINO *et al.*, 1996; BASTOS & BARCELLOS, 1995).

Em uma recente análise feita pelo Ministério da Saúde, desde o início da década de 80 até setembro de 2003, foram notificados 277.154 casos, sendo desse total, 197.340 para o sexo masculino e, 79.814 para o sexo feminino (TEIXEIRA, 2004), sendo que o maior número de casos prevalece na região sudeste (tabela 01). No ano de 2003, foram notificados 5.762 novos casos, desses 3.693 foram verificados em homens e 2.069 em mulheres, mostrando que atualmente, a epidemia tem mostrado a tendência de crescer mais entre as mulheres (TEIXEIRA, 2004). Preocupados com essa "epidemia" da aids, considerada uma "emergência global", o governo brasileiro quebrou patentes e começou a fabricar alguns dos medicamentos anti-retrovirais utilizados no tratamento da aids, fornecendo-os gratuitamente em sua rede pública. Criou, também, centros especializados que atendem mulheres soropositivas, entre elas as gestantes, visando diminuir a transmissão perinatal do vírus.

Devido a essa atenção especial dedicada aos indivíduos soropositivos, o Brasil tornou-se uma referência mundial no tratamento e prevenção da transmissão do vírus HIV-1 e, a epidemia pôde ser considerada estável no país (TEIXEIRA, 2004). Porém, muitos indivíduos infectados não sabem que contraíram o vírus, por deixarem de fazer o exame ou por não terem acesso a ele. Para reverter esse quadro o governo brasileiro intensificou a divulgação dos testes para detecção do HIV-1, gratuitos e sigilosos, feitos na rede pública (TEIXEIRA, 2004).

**Tabela 01.** Casos de aids no Brasil segundo região de residência e por ano de diagnóstico, dados fornecidos pela Coordenação Nacional de DST e AIDS - Ministério da Saúde, Brasil.

<b>Região Brasil</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>
<b>Norte</b>	837	1058	1219	620
<b>Nordeste</b>	2962	3400	3351	1473
<b>Sudoeste</b>	<b>15481</b>	<b>17580</b>	<b>18515</b>	<b>7814</b>
<b>Sul</b>	6223	7047	6963	2849
<b>Centro-oeste</b>	1633	1962	2478	1177

### **1.3 Transmissão perinatal do HIV na cidade de Campinas e no hospital das Clínicas da UNICAMP**

Segundo o Ministério da Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS, na cidade de Campinas - SP foram registrados entre os anos de 2000 a 2002, 450 novos casos entre adultos e crianças; desses, 20 casos eram em crianças (TEIXEIRA, 2004). Observa-se que esse número vem decrescendo ao longo dos anos, possivelmente devido ao fato das mulheres soropositivas grávidas estarem aderindo ao uso da terapia anti-retroviral, os partos estarem sendo realizados por cesarianas e o aleitamento materno também estar sendo suspenso.

Em relação ao Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, o primeiro caso relatado de transmissão perinatal do HIV-1 ocorreu em 1989. A partir daí diversos novos casos fazendo parte do seu Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica.

## 1.4 O vírus da imunodeficiência humana

### 1.4.1 Taxonomia Viral

Sabe-se que o HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) é a causa da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids), que envolve uma deficiência progressiva do sistema imunológico e conseqüentemente o aparecimento de infecções oportunistas, tumores e doenças neurológicas (COTRAN, KUMAR, ROBBINS, 1996; FANNING, 1997; LEVINSON & JAWETZ, 1998).

O HIV é um vírus que pertencente à família *Retroviridae*, subgrupo dos lentivírus (VARMUS, 1988; LEVINSON & JAWETZ, 1998); antigamente conhecido como Vírus Linfotrópico T Humano tipo 3 (HTLV-III), associado a linfonodopatias e posteriormente vírus relacionado a AIDS (ARV) (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; LEVINSON & JAWETZ, 1998). Possui uma enzima, transcriptase reversa, capaz de copiar o ácido ribonucleico viral (RNA) e transcrevê-lo para ácido desoxirribonucleico (DNA), inserindo-o no genoma da célula hospedeira (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; LEVINSON & JAWETZ, 1998).

### 1.4.2 Estrutura Viral

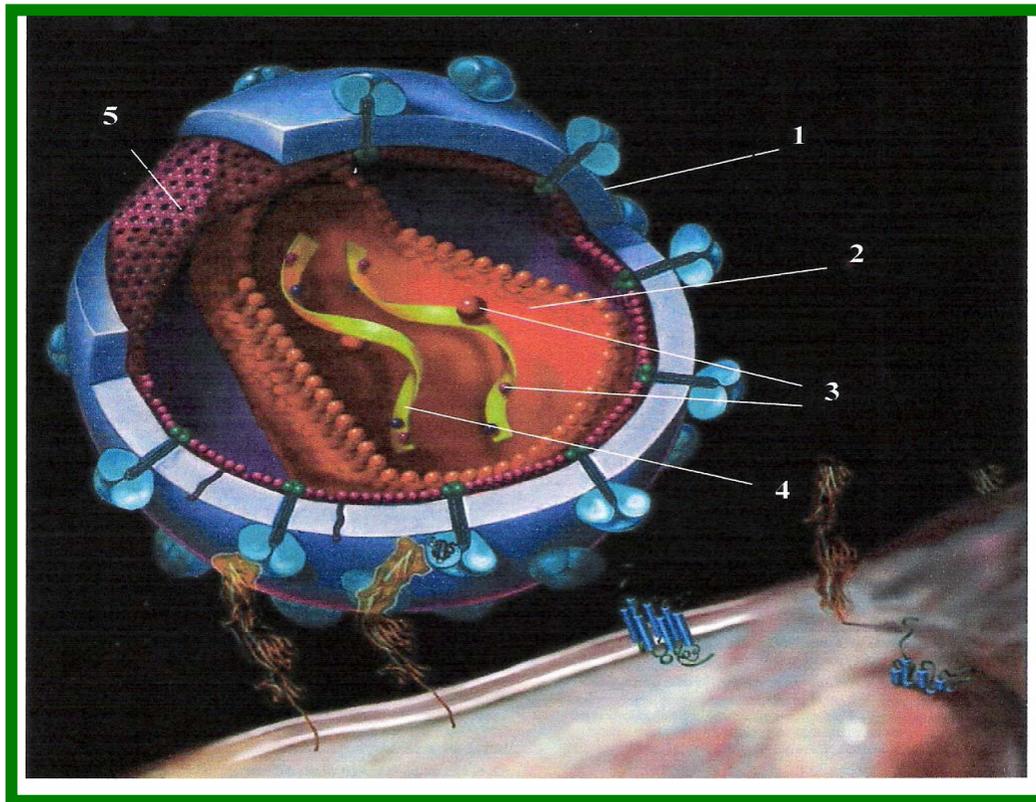
O HIV é um vírus de formato esférico, com aproximadamente 10nm de diâmetro, que consiste em uma membrana lipídica ou envelope, que circunda o nucleocapsídeo viral de formato cônico (LUCIW, 1996). O envelope é composto por glicoproteínas específicas do vírus, a gp120 e gp41. A gp120 é mais externa e está ligada ao vírus através da gp41, que fica inserida no envelope. A função da gp120 é a de projetar-se do envelope e interagir com o receptor de CD4, que é o receptor de superfície da célula alvo para o vírus (ANTONI, STEIN, RABSON, 1994); já a gp41, tem a função de mediar a fusão do envelope viral com a membrana celular no momento da entrada na célula (LEVINSON & JAWETZ, 1998).

As regiões das duas glicoproteínas, particularmente a gp120, são altamente variáveis, resultando em muitas cepas diferentes de HIV, dificultando o emprego de uma vacina eficaz contra o agente (PLANTIER *et al.*, 1998).

Dentro do envelope viral, o núcleo em forma de cone consiste, na proteína p24, considerada um antígeno específico que não apresenta variações significativas, e envolve o RNA diplóide genômico do vírus. A proteína da matriz p17 cobre o capsídeo viral e a p7 está associada ao RNA genômico viral. 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).

A integrase, a RNase (LUCIW, 1996) e protease (99 aminoácidos) são partes da transcriptase reversa. Trata-se de um complexo protéico, pertencente ao gene *pol* do HIV e são necessárias para a replicação viral, estando localizadas no interior do nucleocapsídeo (ANTONI *et al.*, 1994) (figura 01).

Os genes *gag*, *env* e *pol* são comuns a todos os retrovírus (ROSEN & PAVLAKIS, 1990). Os genes *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpu* e *vpx* são genes estruturais e regulam a replicação do HIV através da produção de suas próprias proteínas características (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).



**Figura 01.** Estrutura do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

1. Envelope proteico viral composto por uma bicamada lipídica, onde estão as glicoproteínas virais: gp120 - mais externa; gp41 - liga a gp120 ao vírus.
2. Capsídeo viral, composto pela proteína p24.
3. Enzimas pertencentes ao gene *pol* do HIV-1, essenciais à replicação viral (transcriptase reversa e protease).
4. Material genético do HIV, composto pela dupla fita de RNA.
5. Matriz p17, que envolve a proteína p24.

#### 1.4.3 O genoma do vírus HIV-1

O DNA genômico do HIV-1 apresenta uma estrutura de aproximadamente 9.7kb (ANTONI *et al.*, 1994).

O HIV é composto por genes regulatórios (*nef*, *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *vpx*, *vpr*), estruturais (*gag*, *env*), e que codificam enzimas - transcriptase reversa - (*pol*) (GALVÃO-CASTRO, JÚNIOR, BONGERTZ, 1994). Os genes *gag*, *env*, *pol*, são comuns à todos os retrovírus (ROSEN & PAVLAKIS, 1990; LEVINSON & JAWETZ, 1998).

### **Genes regulatórios:**

- Gene *tat* (proteína transativadora): apresenta uma seqüência de 16kDa (kilodalton) (figura 2); codifica uma proteína de 86 aminoácidos com localização nuclear e função essencial para replicação do HIV (ROSEN & PAVLAKIS, 1990); reprime a síntese de proteínas MHC classe I, reduzindo, portanto a capacidade das células T citotóxicas de destruir as células infectadas pelo HIV-1 (LEVINSON & JAWETZ, 1998), acelerando a produção de partículas virais (HANSELTINE, 1989).

- Gene *rev* (regulador da expressão da proteína do vírion): trata-se do segundo transativador da expressão viral; apresenta uma seqüência de 19kDa (figura 2); e codifica uma proteína de 116 aminoácidos que possui localização nuclear (ROSEN & PAVLAKIS, 1990). Esta proteína está ligada ao ciclo replicativo e de produção de todas as partículas virais. O resultado final da expressão do gene *rev* é a produção de altos níveis de proteínas estruturais do HIV (ANTONI *et al.*, 1994).

- Gene *nef* (fator regulador negativo): a proteína de localização citoplasmática codificada pelo gene *nef*, possui entre 25 a 27kDa (figura 2). Anticorpos contra a proteína do gene *nef* são encontrados em pacientes com AIDS, logo após o início da infecção (ANTONI *et al.*, 1994). A função do gene *nef* apresenta controvérsias, pois pode atuar indiretamente para reduzir a transcrição do terminal longo do HIV-1; em outros casos, atua aumentando a expressão gênica do HIV-1; e em algumas situações demonstrou estimular habilidade do vírus em infectar uma variedade de células (COFFIN, 1990).

- Gene *vif* (fator de infectividade viral): a proteína codificada pelo gene *vif* possui de 23 – 27kDa (figura 2), e está relacionada à replicação viral do HIV (LUCIW, 1995).

O gene *vif* parece capacitar eficientemente o virion para infectar células livres e também permite a esses, infectar mais eficientemente através do contato célula/célula, *in vitro* (ANTONI *et al.*, 1994), ou seja, é responsável pelo aumento da infectividade viral fora da célula (HOGLUND *et al.*, 1994).

- Gene *vpu* (proteína viral U): o gene *vpu* codifica uma proteína de aproximadamente 16kDa (LUCIW, 1995) (figura 2). O produto do gene *vpu* parece ter como função, a maturação e liberação do vírion (ANTONI *et al.*, 1994).

- Gene *vpx*: o gene *vpx* codifica apenas uma proteína de aproximadamente 14 a 16kDa. Este gene é encontrado apenas no vírus da imunodeficiência tipo 2 (HIV-2) (LUCIW, 1995).

- Gene *vpr*: o gene *vpr* codifica uma proteína de aproximadamente, 15kDa, que facilita o transporte do DNA do HIV e regula o ciclo celular.

### **Genes estruturais:**

- Gene *gag*: grupo específico de antígeno, região do capsídeo. Este gene codifica proteínas que formarão a estrutura do capsídeo, dentro dos virions envelopados.

A proteína precursora codificada pelo gene *gag* apresenta 55kDa (p55). Esta é clivada em etapas que originam fragmentos de 17kDa (p17), 24kDa (p24), 9kDa (p9) e 7kDa (p7).

A p17 ou proteína matriz (MA) (figura 1) é localizada na superfície interna da membrana do envelope, e parece ser o maior componente da cápsula protéica, apresentando simetria icosaédrica (ANTONI *et al.*, 1994). Apresenta 130 aminoácidos e está relacionada ao ciclo de vida viral (LUCIW, 1995).

A proteína p24 ou capsídeo (CA) (figura 1), considerada a mais importante das proteínas (LEVINSON & JAWETZ, 1998), é uma partícula nuclear que apresenta de 24 a 27kDa e 240 aminoácidos. Os anticorpos contra a p24 não neutralizam a infectividade do HIV, mas servem como importantes marcadores em testes sorológicos (LEVINSON & JAWETZ, 1998).

- Gene *env*: este gene codifica para a gp160, uma glicoproteína precursora que é clivada para formar as duas glicoproteínas de superfície específicas do envelope, a gp120 e gp41 (LEVINSON & JAWETZ, 1998). A gp120 é a proteína mais externa do HIV sendo responsável pela interação viral com a molécula de CD4 do linfócito T auxiliador e macrófagos, principais células hospedeiras do HIV; sendo, portanto, responsável pela fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira no momento da infecção (ANTONI *et al.*, 1994; LEVINSON & JAWETZ, 1998).

A gp41 é uma proteína transmembrana com função de ligar a gp120 ao vírus. Ambas, são alvos para anticorpos neutralizadores, que impedem os vírus de penetrarem nas células e replicarem-se dentro delas, muitas vezes prevenindo a ligação à proteína CD4 (CUNNINGHAM *et al.*, 1996).

O gene do envelope é mais variável do que os genes *gag* e *pol*, sendo estes dois últimos mais conservados. A variação do *env* ocorre com mais frequência em algumas regiões, resultando divisões na gp120: regiões constantes (c) e variáveis (v), conhecidas como domínios. É no terceiro domínio variável (V3), que se encontra a região mais imunogênica, a alça V3 (GALVÃO-CASTRO *et al.* 1994, LEVINSON & JAWETZ, 1998).

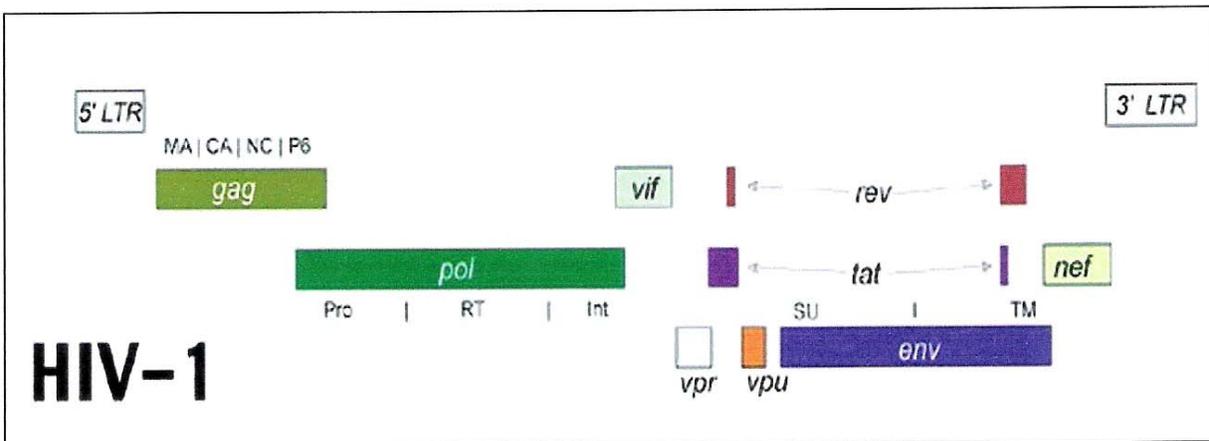
- Gene *pol*: os produtos deste gene são a integrase, a RNase e protease, partes da transcriptase reversa, pois trata-se de um complexo protéico (ANTONI *et al.*, 1994).

A transcriptase reversa (51-66kDa) traduz o RNA viral em DNA, logo após a entrada do HIV na célula, para posteriormente, esse DNA ser inserido em cromossomos da célula hospedeira. A integrase (31kDa), integra o DNA viral ao genoma da célula

hospedeira; e a RNase degrada a fita de RNA viral, quando, num momento da replicação, há uma fita de DNA e uma de RNA; isso é realizado, a fim de deixar presente apenas a fita de DNA viral, que, posteriormente, terá sua fita complementar (ANTONI *et al.*, 1994).

A protease, apresenta peso molecular de aproximadamente 10 kDa, sendo constituída por 99 aminoácidos (LUCIW, 1995). A protease cliva os diversos polipeptídeos precursores das proteínas ativas, dos genes *gag* e *pol* do HIV-1.

- Regiões LTR (Long terminal repeats): trata-se das duas extremidades do código genético viral (extremidade inicial e terminal), que são idênticas, ou seja, repetidas (GALLO, 1991). Funciona como um promotor/enhancer, para os genes do HIV; interage com as proteínas celulares que modulam a replicação viral (CUNNINGHAM, 1996).



**Figura 02.** Organização genômica do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).

*gag* e *env*: genes estruturais do HIV-1

*pol*: gene codificador do complexo protéico da transcriptase reversa (integrase, protease e RNase):

*vif*, *vpr*, *rev*, *tat*, *vpu*, *nef*: genes regulatórios do HIV-1.

LTR: extremidades inicial e final do genoma do HIV-1, que é construído por seqüências longas repetidas.

#### 1.4.4 Ciclo biológico do HIV-1

O HIV-1 infecta uma ampla variedade de células que expressam a molécula protéica CD4. Assim temos, a células T auxiliares, monócitos, macrófagos, células microgliais especializadas do cérebro, células Hofbauer da placenta, células dendríticas (incluindo as células dendríticas foliculares, encontradas nos nódulos linfáticos e nas células de Langerhans na pele). Em pacientes assintomáticos encontramos o vírus nos linfonodos, estes, servindo como reservatórios virais.

O HIV-1 infecta e destrói as células T auxiliares, resultando em supressão da imunidade mediada por células, o que deixa o hospedeiro susceptível a várias infecções oportunistas e determinados tipos de câncer, como o Sarcoma de Kaposi e linfomas. O HIV, porém, não é encontrado nas células cancerosas, sendo a causa indireta do câncer (LEVINSON & JAWETZ, 1998).

O HIV-1 também infecta monócitos e macrófagos do cérebro, produzindo células gigantes multinucleadas e sintomas significativos no sistema nervoso central (CASTRO *et al.* 1988, LEVINSON & JAWETZ, 1998).

Os principais eventos do ciclo de replicação do vírus incluem entrada, síntese e integração do DNA viral, expressão deste DNA como RNA e proteínas virais e a congregação e saída do vírus (COFFIN, 1990).

A junção do HIV-1 à célula hospedeira é mediada por uma interação entre a glicoproteína gp120 do gene *env* do HIV com a molécula protéica de 55 kDa, denominada CD4, que é encontrada na membrana plasmática dos linfócitos T auxiliares e macrófagos, e funciona como receptor à entrada do HIV-1 na célula. Após a entrada do vírus na célula CD4 positiva, o HIV-1 pode estabelecer uma latência ou então, uma persistente forma de infecção (GREENE, 1991). Após a ligação e penetração do vírus na célula, o capsídeo viral desintegra-se parcialmente, sendo que a etapa seguinte do ciclo envolve a ação da enzima transcriptase reversa, que converte o RNA viral dimérico, em DNA linear fita dupla. Para essa etapa de replicação são necessários: (a) 2 cópias do RNA

genômico do HIV-1, para a partir dessas, ser formada a fita de DNA; (b) o "primer" tRNA do hospedeiro, para iniciar a transcrição; (c) atividade das proteínas transcriptase reversa para transcrever o RNA viral em DNA e a RNase que degrada o RNA do vírus pós transcrição. Após a entrada no núcleo da célula, o DNA proviral é inserido ao genoma da célula hospedeira pela enzima viral integrase (LUCIWI, 1995). Após a integração do código genético viral ao DNA da célula infectada, o provírus é transcrito em cópias de RNA, que são ou incorporadas em novas partículas do vírus como genoma, ou funciona como RNA mensageiro (mRNA); sendo traduzidos em proteínas virais regulatórias, estruturais e enzimáticas. A partir daí, a partícula viral surge através da membrana da célula hospedeira, para infectar outras células CD4 positivas (CUNNINGHAM *et al.*, 1996). Ao irromperem da célula infectada, os vírus recém formados estão envoltos por um envelope protéico que é similar ao da membrana celular humana.

#### 1.4.5 Padrões de infecção causados pelo HIV

Desde 1989, estudos têm demonstrado que pacientes em estágios avançados da aids apresentam altas concentrações do vírus circulantes no sangue (HO, 1996).

A imunopatogênese da aids não está completamente entendida, e a sua infecção leva a múltiplos defeitos imunológicos, causando, imunossupressão no hospedeiro infectado, através da depleção dos linfócitos CD4 positivos (DONATELLA *et al.*, 1998). A infecção pelo HIV pode ser classificada em padrões de infecção, que são definidos desde o contato do hospedeiro com o vírus, até a fase final da doença, aids.

#### **Primeiro padrão**

Nesse primeiro padrão de infecção, que ocorre de 3 a 6 semanas após exposição ao vírus, ocorre uma replicação viral intensa (PANTALEO *et al.*, 1993), e são

encontrados vírus infecciosos e proteínas virais no sangue e no fluido cerebrospinal.

O nível de RNA viral apresenta um aumento após a contaminação e logo em seguida decai, devido à concentração de anticorpos que aumenta, combatendo a infecção (FFRENCH *et al*, 1996), tendo seus níveis altamente elevados aproximadamente na sexta semana, permanecendo elevados durante toda a infecção (HANSELTINE, 1989).

Há um período denominado de latência clínica caracterizado, por ser assintomático, e com nível viral circulante muito baixo (PANTALEO *et al*, 1993) e que pode durar até 11 anos (MELLORS *et al*, 1996). Após esta etapa, o nível viral vai aumentando gradativamente no soro, e o indivíduo infectado torna-se sintomático.

### **Segundo padrão**

Nesse padrão de infecção, que é bastante raro, um estado inicial soropositivo é acompanhado pela perda de anticorpos virais, como determinado pelos métodos imunoenzimático (ELISA) e Western Blot.

A informação genética do HIV-1, na forma de DNA proviral, está presente nos linfócitos circulantes e pode ser detectada pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Nesses casos, a perda de anticorpos antivirais, provavelmente reflete a suspensão, ou pelo menos uma restrição grave, na produção ou liberação do vírus (HANSELTINE, 1989).

### **Terceiro padrão**

Nesse padrão, há uma infecção prolongada sem a formação de anticorpos

antivirais. Esse padrão implica que, ou a infecção sistêmica pelo HIV-1 pode ser estabelecida sem estimular o sistema imune ou a perda de anticorpos antivirais pode ocorrer após uma produção transitória tanto do vírus como dos anticorpos virais (HANSELTINE, 1989). Esta fase é caracterizada pelo início da doença aparente (GOUDSMIT, *et al* 1987), em que surgem as manifestações clínicas da AIDS (EMINI, 1995). Após o aparecimento dos sintomas, a doença desenvolve-se rapidamente, podendo, em curto prazo, levar o indivíduo à morte.

A diminuição dos linfócitos CD4 positivos, para valores inferiores a  $200/\text{mm}^3$  (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1992) caracteriza a fase terminal da doença.

### **1.5 Diagnóstico da infecção pelo HIV-1 em crianças com suspeita de transmissão perinatal**

Desde o início de 1980 até setembro de 2003, o Ministério da Saúde notificou cerca de 9.775 novos casos de AIDS no Brasil, em pacientes menores de 13 anos de idade (TEIXEIRA, 2004), sendo a morte comum entre crianças de 1 a 4 anos (DORENBAUN *et al*, 1997).

A transmissão perinatal é responsável por praticamente todas as infecções novas pelo HIV-1 em crianças (tabela 01), podendo ocorrer em qualquer estágio da gestação, durante o parto através do contato com sangue ou secreções de mucosa materna, ou aleitamento materno (NEWELL *et al*, 1995; MACDONALD *et al*, 1998; WILFERT & MCKINNEY, 1998).

**Tabela 02.** Casos de AIDS em menores de 13 anos de idade, segundo a categoria de exposição hierarquizada e ano de diagnóstico, dados fornecidos pela Coordenação Nacional de DST e AIDS - Ministério da Saúde, Brasil.

<b>Categoria de exposição</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>
<b>Sexual</b>	02	01	04	02
<b>Homossexual</b>	01	01	01	-
<b>Bissexual</b>	-	-	-	01
<b>Heterossexual</b>	01	-	03	-
<b>Sangüínea</b>	01	01	-	-
<b>Hemofílico</b>	-	-	-	-
<b>Transfusão</b>	-	-	-	-
<b>Perinatal</b>	<b>752</b>	<b>579</b>	<b>372</b>	<b>107</b>
<b>Ignorada</b>	115	74	57	21
<b>Total</b>	<b>872</b>	<b>656</b>	<b>437</b>	<b>131</b>

A busca por métodos de diagnóstico precoce e específico para a infecção tornou-se uma importante ferramenta para, se necessário, iniciar rapidamente a terapia antiretroviral e tratamento profilático das infecções oportunistas (ROUZIOUX, 1996).

Entre os testes mais utilizados no diagnóstico da infecção pelo HIV-1 estão o ELISA, Western Blot e a reação em cadeia da polimerase (figura 03).

O ELISA identifica exclusivamente anticorpos contra o vírus, mas pode apresentar resultado falso positivo, pela presença das imunoglobulinas da classe G (IgG), que são passivamente ou ativamente transportadas através da mãe para o feto na placenta

(EDWARDS *et al*, 1989; MADURAI *et al*, 1997; KLINE *et al*, 1993), podendo persistir circulante na criança até aproximadamente os dezoito meses de idade (MOODLEY *et al*, 1995; KELLÖGG & KWOK, 1990). Esse método não diferencia anticorpos da mãe transferidos à criança, dos anticorpos da própria criança.

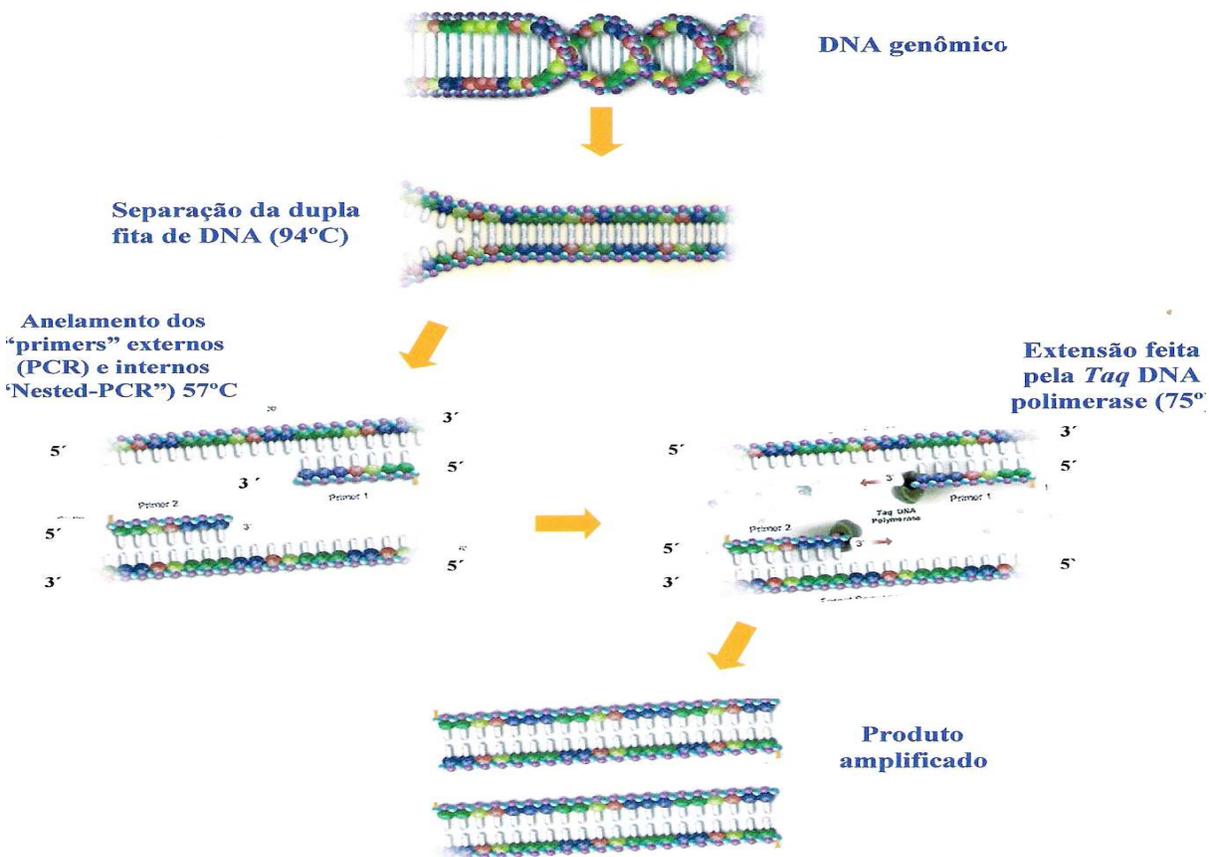
O Western Blot é utilizado como teste confirmatório do ELISA (CARVALHO *et al*, 1996), detectando também anticorpos da classe IgG.

A PCR (figura 03) permite detecção de infecção pelo HIV antes da soroconversão, pois detecta partículas virais circulantes no sangue. É considerado um teste excelente no diagnóstico precoce do HIV-1, principalmente em crianças com suspeita de infecção perinatal (DUNN *et al*, 1995; WILLIAMS *et al*, 1990) visto que, tais crianças apresentam anticorpos maternos circulantes em sua corrente sanguínea (NEWELL *et al*, 1995). Entretanto, as técnicas utilizadas para obtenção do DNA para realização da PCR, podem apresentar dificuldade quando o volume sanguíneo coletado é insuficiente, comum em muitos casos de recém-natos (PANTELEEFF *et al*, 1999).

Uma outra maneira para se obter a amostra com qualidade e em menor volume sanguíneo, é fazer a coleta em papel filtro, onde somente algumas gotas de sangue são necessária para a posterior realização da PCR. O uso do papel filtro tem apresentado muitas vantagens na detecção perinatal da infecção pelo HIV-1. A coleta da amostra é mais segura, de fácil obtenção, não necessitando de pessoas treinadas para sua realização; a sua estocagem e transporte não necessitam de maiores cuidados (CHAMBANCHERD, *et al*, 1999; COMEAU *et al*, 1996), podendo ser utilizado para coletas em locais de difícil acesso; e seu método de extração é mais rápido e não envolve todas as etapas para a remoção de possíveis inibidores da PCR (PANTELEEFF *et al*, 1999).

Com o diagnóstico precoce da infecção pode-se iniciar mais rapidamente uma terapia antiviral; prevenir possíveis infecções oportunistas; tratamento agressivo a infecções bacterianas; e, evitar procedimentos desnecessários em pacientes não infectados.

Segundo Coordenação Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde - Brasil - estabeleceu que para as crianças com idade inferior a 18 meses de idade, expostas ao HIV por transmissão perinatal, a infecção é configurada quando houver presença RNA ou DNA viral, detectados por métodos de diagnóstico por técnicas de biologia molecular. As amostras testadas devem ser coletadas após o segundo mês de vida da criança, visando aumentar a sensibilidade do teste (TEIXEIRA, 2004). Para crianças com idade igual ou superior a 18 meses de idade, expostas ao HIV por transmissão perinatal, a infecção é estabelecida através de dois testes laboratoriais sorológicos de triagem e pelo menos um teste confirmatório (TEIXEIRA, 2004).



**Figura 03.** Reação em cadeia da polimerase (PCR) e "Nested-PCR". Cada ciclo consiste de desnaturação da fita molde, anelamento dos "primers" em cada fita-alvo complementar e síntese da seqüência entre os "primers" externos (PCR) e internos ("Nested-PCR").

## **2 - OBJETIVOS**

- Padronizar e aplicar a técnica de extração de DNA colhido em papel filtro em crianças nascidas de mães infectadas pelo HIV-1, em seguimento no Ambulatório de Imunodeficiência Pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
- Comparar a extração de DNA do papel filtro, com extração obtida de maneira clássica, a partir de sangue periférico em EDTA, pela realização da "Nested-PCR" em quatro regiões do genoma do HIV-1 (*gag*, *env-1*, *env-2* e *pol*).

### **3 - CASUÍSTICA**

## CASUÍSTICA

Durante o período de setembro de 2001 a outubro de 2002 selecionou-se:

- 43 crianças com suspeita de infecção perinatal pelo HIV-1,
- 11 crianças soropositivas,
- 14 adultos soropositivos (pais das crianças),
- 03 crianças negativas pra infecção pelo HIV-1.

Todas as crianças estavam em seguimento no ambulatório de imunodeficiência pediátrica do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, na cidade de Campinas, SP.

Os adultos e crianças soropositivos foram incluídos no estudo para servirem como controle positivo das reações de PCR e "Nested- PCR".

As crianças negativas para a infecção pelo HIV-1 foram incluídas no estudo para servirem como controle negativo para das reações de PCR e "Nested- PCR".

Todos os indivíduos ou seus responsáveis legais assinaram o termo de consentimento, permitindo o uso de suas amostras sanguíneas para o estudo, previamente aprovado no Comitê de Ética da Unicamp.

**Tabela 03:** Casuística da população de estudo.

	<b>Adultos</b>	<b>Crianças menores 24 meses</b>	<b>Crianças maiores 24 meses</b>
<b>Masculino</b>	05	20	06
<b>Feminino</b>	09	21	09
<b>Idade média</b>	30 anos	06 meses	06 anos
<b>Situação diagnóstica para o HIV</b>	Todos positivos	40 sem resultados anteriores 01 negativo	11 positivos 03 sem resultados anteriores 02 negativos

## **4 - MÉTODOS**

As amostras de sangue suspeitas de contaminação pelo HIV-1 foram obtidas no laboratório de coleta geral do Hospital de Clínicas da Universidade Estadual de Campinas por solicitação do ambulatório de imunodeficiência pediátrica, após informações e autorizações dos respectivos pais ou responsáveis pelas crianças.

A coleta foi feita por punção venosa, sendo colocado em um tubo com EDTA e volume de 3 a 5ml de sangue. Colocaram-se algumas gotas do mesmo sangue no papel filtro FTA cards ®.

As amostras de sangue foram submetidas a métodos de extração de DNA (TKMI-TKM2 para sangue total, e papel filtro), para posterior diagnóstico de infecção pelo HIV-1, através da reação em cadeia da polimerase tipo "Nested" utilizando os "primers" descritos na tabela 04, onde o resultado "positivo" indicou presença de partículas virais no sangue do paciente.

## **CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO**

Foram sugeridos como sendo pacientes positivos para a infecção pelo HIV-1, os indivíduos que apresentaram positividade em pelo menos três das quatro regiões amplificadas do HIV-1 (genes *gag*, *pol* e 2 regiões do *env*), para cada coleta de amostra de sangue periférico e papel filtro.

Como pacientes negativos à infecção pelo HIV-1, foram sugeridos aqueles que apresentaram resultado negativo para todas as quatro regiões testadas do HIV-1, pela "Nested-PCR", em todas as coletas de sangue realizadas.

## 4.1 Extração do DNA: papel filtro

### 4.1.1 Preparação das amostras

O sangue periférico foi gotejado diretamente sobre o FTA card. A amostra permaneceu secando por 01 hora prévio ao seu processamento.

Usando um picotador ou furador estéril, a amostra foi removida do meio da mancha do papel e colocada dentro de um tubo de amplificação com capacidade, para no mínimo 300  $\mu$ L. A cada tubo adicionaram-se 200  $\mu$ L do FTA Purification Reagent®, e dado um vórtex de 01 a 02 segundos em velocidade baixa. Os tubos descansaram por 05 minutos à temperatura ambiente. Após isso, foi colocado em um vórtex e então, o reagente foi removido ao máximo, cuidadosamente. Esta operação foi repetida mais duas vezes, totalizando 03 lavagens, porém nestas últimas foram dispensados os 05 minutos de descanso dos tubos. Completada esta etapa, depois da remoção do FTA Purification Reagent pela terceira vez, foi adicionado 200  $\mu$ L de TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA]. Em cada tubo, após ser fechado, colocou-se em vórtex de 01 a 02 segundos em velocidade baixa. Os tubos descansaram por 05 minutos em temperatura ambiente. Após este tempo, colocou-se novamente um breve vórtex, retirando-se o sobrenadante de cada tubo. Repetiu-se essa operação por mais duas vezes - totalizando 03, dispensando nestas últimas os 05 minutos de descanso dos tubos. Após a remoção total do sobrenadante dos tubos, estes foram mantidos em banho seco a 60°C aproximadamente por 45 minutos ou até que os picotes de papel dentro dos tubos estivessem completamente secos. Os reagentes para amplificação do PCR foram adicionados diretamente ao tubo que continha os picotes de papel com o DNA imobilizado e purificado.

## 4.2 Extração do DNA - sangue periférico coletado em tubo com EDTA: Método rápido TKM1 - TKM2

### 4.2.1 Preparação das amostras:

As amostras de sangue periférico foram centrifugadas a 2.500 rpm (centrífugas Fanem®) por dez minutos, para a separação do plasma, sendo este descartado.

### 4.2.2 Lise das hemácias:

As hemácias foram lisadas com uma mistura de soluções de cloreto de amônio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), a 0,0114M (05 vezes o volume de células) e bicarbonato de amônio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) a 0,01 M (0,5 vezes o volume de células). Após quinze minutos em repouso à temperatura ambiente, centrifugou-se o hemolisado duas vezes, por vinte minutos a 2.500 rpm; o sobrenadante foi removido e o precipitado de leucócitos sofreu lise, conforme item a seguir.

### 4.2.3 Lise de leucócitos:

Os leucócitos foram lisados com solução de Tris-HCl 10mM (pH=7,6); KCl 10mM;  $\text{MgCl}_2$  10mM e EDTA 20mM, sendo centrifugados por dez minutos a 2.500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foi adicionado, aproximadamente, três gotas de Triton X-100 nuclear, na primeira lavagem. O sobrenadante foi descartado e após essa etapa, foi acrescentado ao precipitado, 800 $\mu\text{L}$  da solução TKM2 (contendo Tris-HCl 10mM (pH=7,6); KCl 10mM; NaCl 0,4M;  $\text{MgCl}_2$  10mM; EDTA 2mM; 50 $\mu\text{L}$  de duodecil sulfato de sódio (SDS) 10%). Em seguida o material foi incubado durante quarenta minutos a temperatura de 56°C. Após a incubação, foi adicionado ao mesmo, 150 $\mu\text{L}$  de NaCl 5M gelado; e então, centrifugado a 3.300 rpm por dez minutos. Nessa etapa, o precipitado foi

descartado e fez-se uso do sobrenadante, após transferência para outro tubo (falcon) estéril.

#### 4.2.4 Precipitação do DNA:

Ao sobrenadante, referido no item anterior, foi adicionado 4ml de etanol absoluto (gelado), havendo assim a precipitação do DNA. Após essa etapa, o DNA foi removido e colocado em tubo tipo "eppendorf" e seco a temperatura ambiente, posteriormente solubilizado em água destilada, deionizada e estéril (dH<sub>2</sub>O); e incubado a 4°C.

### 4.3 Amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

#### 4.3.1 Condições da reação:

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu, com algumas modificações, o método descrito por Saiki *at al* (Saiki *at al*,1985). Em tubo tipo "eppendorf", foi adicionado 1.0 µl do DNA a ser estudado (ou um pedaço do papel filtro contendo o DNA, cerca de 2mm); 50 mM de cloreto de potássio; 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4); 2,5 mM de cloreto de magnésio; 0,1 mM de cada "primer"; 200 mM da mistura desoxirribonucléica - dNTPs (dATP, dGTP, dCTP; dTTP) e 2.0 U de Taq DNA polimerase. À mistura final de 20µl, foi adicionada 01 gota de óleo mineral para evitar a evaporação dos reagentes.

A reação foi conduzida inicialmente, por 01 ciclo a 94°C durante 05 minutos e posteriormente por 30 ciclos de amplificação em ciclador automático (RoboCycler®, Stratagene) e cada ciclo sob as seguintes condições:

- Separação das hélices de DNA por aquecimento em temperatura de 94°C durante 30 segundos;

- Ligação complementar entre os "primers" e o DNA em temperatura de 57°C durante 30 segundos;
- Síntese de DNA pela Taq DNA polimerase em temperatura de 75°C durante 30 segundos.

Ao término dos 30 ciclos, o produto da amplificação foi mantido a 75°C durante 05 minutos por 01 ciclo.

Foram utilizados como controle positivo da reação, amostras de pacientes com desenvolvimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids), e como controle negativo, amostras de indivíduos com ausência de infecção pelo HIV e água.

O protocolo de amplificação para a "dupla PCR", segue o descrito anteriormente, porém foi usada na reação, uma alíquota de 0,4 µI do DNA amplificado na primeira PCR, onde houve uma reamplificação com pares de "primers" internos aos primeiros.

**Tabela 04.** Seqüência dos nucleotídeos iniciadores ("Primers") utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR e "Nested-PCR") e sua localização no genoma do HIV-1.

<b>Primers</b>	<b>Seqüência dos nucleotídeos(5´ - 3´)</b>	<b>Gene e localização</b>
JA4	GAAGGCTTTCAGCCCAGAAG	Gag (1319 – 1338)*
JA5	ACCATCAATGAGGAAGCTGC	Gag (1446 – 1465)**
JA6	TATTTGTTCTCCTGAAGGGTAC	Gag (1577 – 1558)**
JA7	TCTCCTACTGGGATAGGTGG	Gag (1615 – 1596)*
JA9	CACAGTACAATGTACACATG	Env (7137 – 7156)*
JA10	AAATGGCAGTCTAGCAGAAG	Env (7191 – 7210)**
JA11	ACAATTTCTGGGTCCCCTCC	Env (7532 – 7513)**
JA12	ACAGTAGAAAAATTCCCCTC	Env (7572 – 7533)*
JA13	TTCCTTGGGTTCTTGGGAGC	Env (8004 – 8023)*
JA14	GCAGCAGGAAGCACTATGGG	Env (8022 – 8041)**
JA15	CCAGGACTCTTGCCTGGAGC	Env (8194 – 8175)**
JA16	AGGTATCTTTCCACAGCCAG	Env (8209 – 8190)*
JA17	TACAGGAGCAGATGATACAAG	Pol (2431 – 2450)*
JA18	GGAAACCAAAAATGATAGGG	Pol (2481 – 2500)**
JA19	ATTATGTTGACAGGTGTAGG	Pol (2610 – 2591)**
JA20	CCTGGCTTTATTTTACTGG	Pol (2697 – 2678)*

Os "primers" foram descritos por ALBERT, J. & FENYÖ, E. M., 1990.

\* "Primers" utilizados na primeira PCR

\*\* "Primers" utilizados na "Nested-PCR".

#### 4.3.2 Detecção do fragmento amplificado pela "Nested-PCR"

Após as reações de amplificação e reamplificação, 05µl do produto da "dupla PCR" foi submetido à eletroforese em gel de agarose 02% com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Em amostras positivas, observamos fragmentos de 131, 341, 172 e 129 pares de bases, sendo esses, originados de seus respectivos genes

selecionados: *gag*; *env*, (2 regiões do gene *env*) e *pol*. Nas amostras negativas não houve fragmento amplificado. Para cada amostra, foram amplificadas as quatro regiões citadas.

#### 4.3.3 Amplificação gênica pela PCR para o gene da $\beta$ -globina humana como controle interno da reação

Para cada amostra estudada foi feita a PCR e "Nested-PCR" em pelo menos uma das quatro regiões testadas do HIV-1, com a utilização de "primers" que flanqueiam o gene da  $\beta$ -globina humana (tabela 05), para funcionar como um controle interno da reação e ter-se uma maior confiabilidade nos resultados. O fragmento utilizado foi de 365 pb.

**Tabela 05.** "Primers" externos e internos que flanqueiam uma região constante do gene da  $\beta$ -globina, utilizados como controle interno da PCR e "Nested-PCR".

"Primers"	Seqüência dos nucleotídeos (5' - 3')	Sentido
*P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	"sense"
*P5	TCATTCGTCTGTTTCCCATTC	"anti-sense"
**P3	AGACAGAGAAGACTCTTG	"sense"
**109	CCCTTCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT	"anti-sense"

O método foi descrito por SAIKI *et al*,1985.

\* "primers" utilizados na primeira PCR.

\*\* "primers" utilizados na "Nested-PCR"

#### 4.4 Normas utilizadas para evitar contaminação nas amostras

Durante a execução da reação em cadeia da polimerase, vários cuidados foram tomados, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação nas amostras manipuladas. Os cuidados utilizados foram:

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em uma sala diferente (sala pré-PCR) daquela onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR).
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes.
- Antes da abertura dos tubos tipo "eppendorf" foi efetuada uma rápida centrifugação em microcentrífuga (em temperatura ambiente) para concentrar o líquido, contido no tubo, na região inferior deste e evitar a dispersão do mesmo por aerosol.
- Todo material plástico (ponteiras e tubos do tipo "eppendorf") utilizado era novo, estéril e não autoclavado.
- Durante todo e a cada procedimento procedeu-se trocas de luvas constantes.
- Jogo de pipetas para cada área.
- Ponteiras com filtro, para se evitar contaminação via aerosol.
- Uso de hipoclorito 10% e etanol 70% antes e após o uso da bancada.
- Prática laboratorial meticulosa.

## **5 - RESULTADOS**

Os "primers", utilizados neste trabalho, foram escolhidos para as regiões conservadas do HIV-1.

A mais eficiente amplificação dos fragmentos foi encontrada com concentração de MgCl<sub>2</sub> de 2,5 mM, e foi possível uma única padronização de programação (temperaturas, períodos, número de ciclos) para os dois passos (1ºPCR e "Nested-PCR") da reação de amplificação gênica, para ambas as extrações utilizadas neste estudo. O programa de amplificação foi anteriormente descrito em Casuística e Métodos, no item 3.3.

De acordo com os parâmetros adotados para positividade e negatividade para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR", estabelecidos neste trabalho, obteve-se neste estudo, de um total de 71 indivíduos: 28 positivos e 43 negativos para o HIV-1. Destes:

- 25 indivíduos eram soropositivos, utilizados como controle positivo do teste,
- 03 indivíduos com resultados positivos diagnosticados por este estudo,
- 03 indivíduos com resultado negativo, utilizados como controle negativo do teste,
- 40 indivíduos com resultados negativos diagnosticados por este estudo.

Nas 71 amostras estudadas, todos os conjuntos de "primers" funcionaram com êxito, permitindo resultados confiáveis e não duvidosos para a "Nested-PCR", em ambas extrações, principalmente os conjuntos de "primers" para o gene gag (JA4 - JA7), gene env 2 (JA13 - JA16) e pol (JA17 - JA20). Estes mostraram uma concordância maior de resultados, quando comparados a região amplificadas do gene env 1, "primers" (JA9 - JA12).

O par de "primer" da região env 1 (JA9 -JA12), apresentou resultado negativo discordando dos demais "primers". O paciente 02, do resultado em questão, era um adulto, com carga viral indetectável (< 1000 cópias virais por ml).

Somente dois novos casos de transmissão perinatal foram diagnosticados. O primeiro caso foi o paciente 08, com apenas 01 dia de vida, cuja mãe não fez uso de terapia anti-retroviral durante a gestação. O resultado positivo foi repetido após sete dias, constando nas tabelas 02, 05, 06 e 07, como paciente 11, e a positividade pode ser confirmada. O segundo paciente positivo por transmissão perinatal do vírus, foi o paciente 38, cuja mãe era ex-usuária de drogas como maconha, cocaína e crack.

Não ocorreu, em nenhum paciente estudado, amplificação pela "Nested-PCR" em apenas uma ou duas regiões do vírus testadas; o mínimo para pacientes positivos foram três regiões virais amplificadas, das quatro testadas pela "Nested-PCR".

Os resultados da "Nested-PCR", para as amostras sanguíneas coletadas em papel filtro estão demonstrados na tabela 06, os resultados em sangue periférico estão demonstrados na tabela 07, ambas contendo as quatro regiões do HIV-1 escolhidas para a amplificação gênica.

A comparação entre o método de extração de DNA coletado em papel filtro com a extração a partir de sangue total, está demonstrada na tabela 08.

Os resultados finais das PCR e "Nested-PCR" de todas as regiões gênicas amplificadas do HIV-1 para os dois tipos de extrações testadas estão demonstrados através de fotodocumentação, nas figuras 04 a 11.

Foi realizada a "Nested-PCR" com "primers" que flanqueiam a região do gene da  $\beta$ -globina humano, como controle interno da reação, em ambas extrações de DNA, a fim de confirmar a confiabilidade da positividade ou negatividade para a infecção pelo HIV-1, por detecção pela PCR (figura 12). Todos os pacientes apresentaram positividade para este teste.

**Tabela 06.** Resultados da "Nested-PCR" (regiões *gag*, *env1* e *env2*, *pol*) em amostras coletadas em papel filtro, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus)

	<b>Adultos</b>	<b>Crianças soropositivas</b>	<b>Crianças com suspeita de infecção perinatal</b>
<b><i>Gag</i></b>	14 resultados (+)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)
<b><i>Env – região 1</i></b>	13 resultados (+) 01 resultados (-)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)
<b><i>Env – região 2</i></b>	14 resultados (+)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)
<b><i>Pol</i></b>	14 resultados (+)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)

**Legenda tabela 06:**

(+): positivo para a infecção pelo HIV-1

(-): negativo para a infecção pelo HIV-1

**Tabela 07.** Resultados da "Nested - PCR" (regiões *gag*, *env1* e *env2*, *pol*) em amostras obtidas de sangue total, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).

	<b>Adultos</b>	<b>Crianças soropositivas</b>	<b>Crianças com suspeita de infecção perinatal</b>
<b><i>Gag</i></b>	14 resultados (+)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)
<b><i>Env – região 1</i></b>	13 resultados (+) 01 resultados (-)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)
<b><i>Env – região 2</i></b>	14 resultados (+)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)
<b><i>Pol</i></b>	14 resultados (+)	11 resultados (+)	03 resultados (+) 40 resultados (-)

**Legenda tabela 07:**

(+): positivo para a infecção pelo HIV-1

(-): negativo para a infecção pelo HIV-1

**Tabela 08.** Comparação dos resultados finais das PCRs para infecção pelo HIV-1 realizadas a partir de sangue coletado em papel filtro e sangue total coletado em tubo com EDTA.

---

---

	<b>Adultos</b>	<b>Crianças soropositivas</b>
<i>Adultos</i>	14 (+)	14 (+)
<i>Crianças</i>	14 (+)	14 (+)
	41 (-)	41 (-)

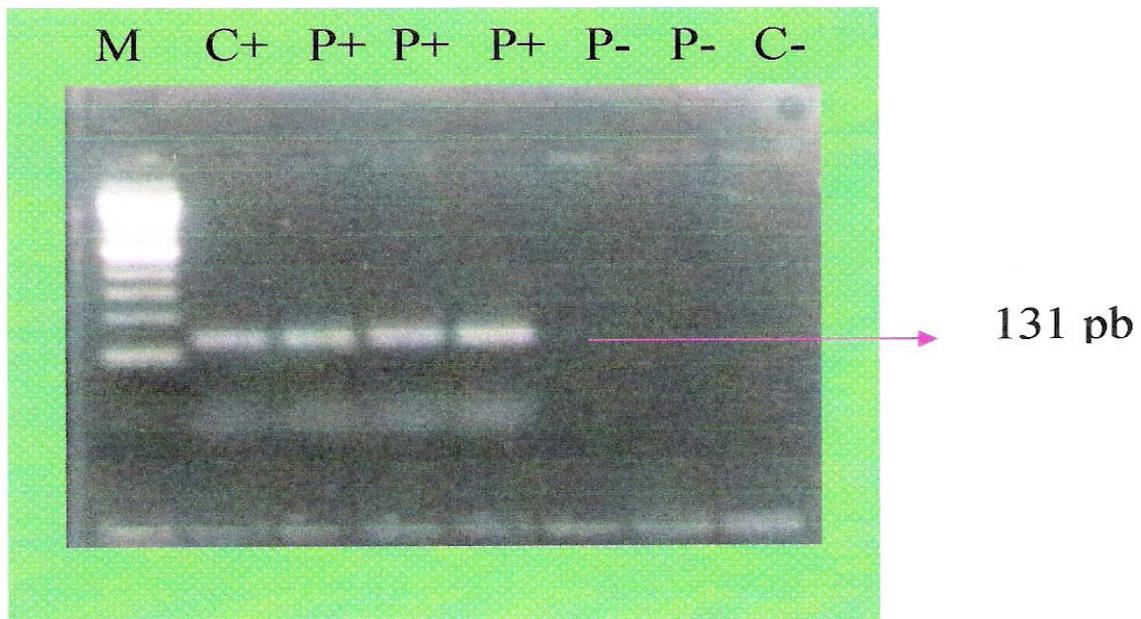
---

---

**Legenda tabela 08:**

(+): positivo para a infecção pelo HIV-1

(-): negativo para a infecção pelo HIV-1



**Figura 04.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *gag* do HIV-1 ("primers" JA4-JA7), fragmento amplificado de 131 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA fixado em papel filtro.

**Legenda da figura 04:**

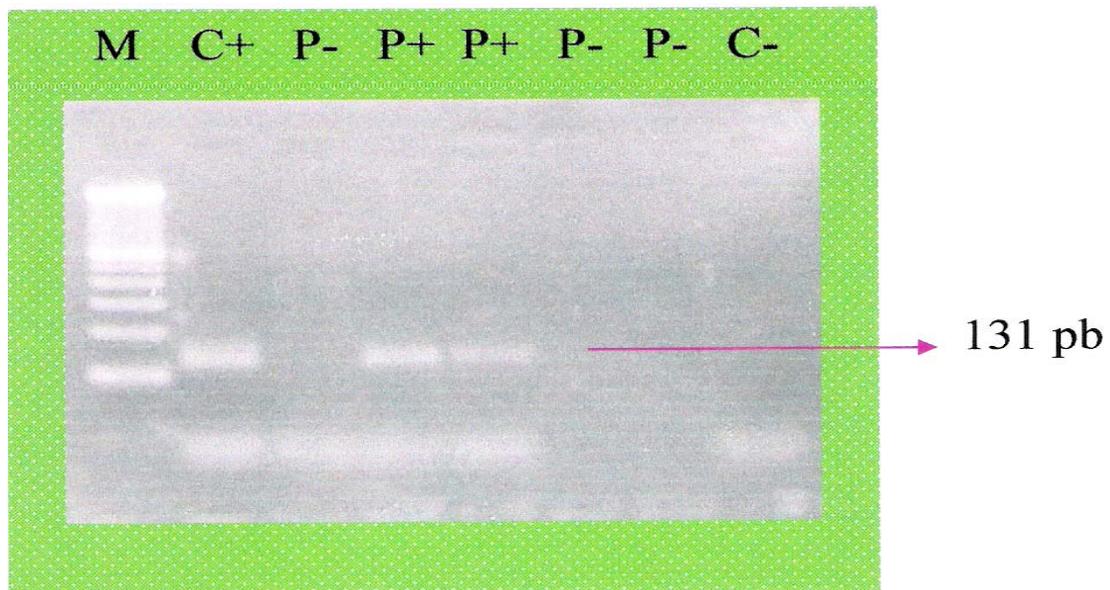
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA)

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS).

P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1)



**Figura 05.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *gag* do HIV-1 ("primers" JA4-JA7), fragmento amplificado de 131 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA de sangue total.

**Legenda da figura 05:**

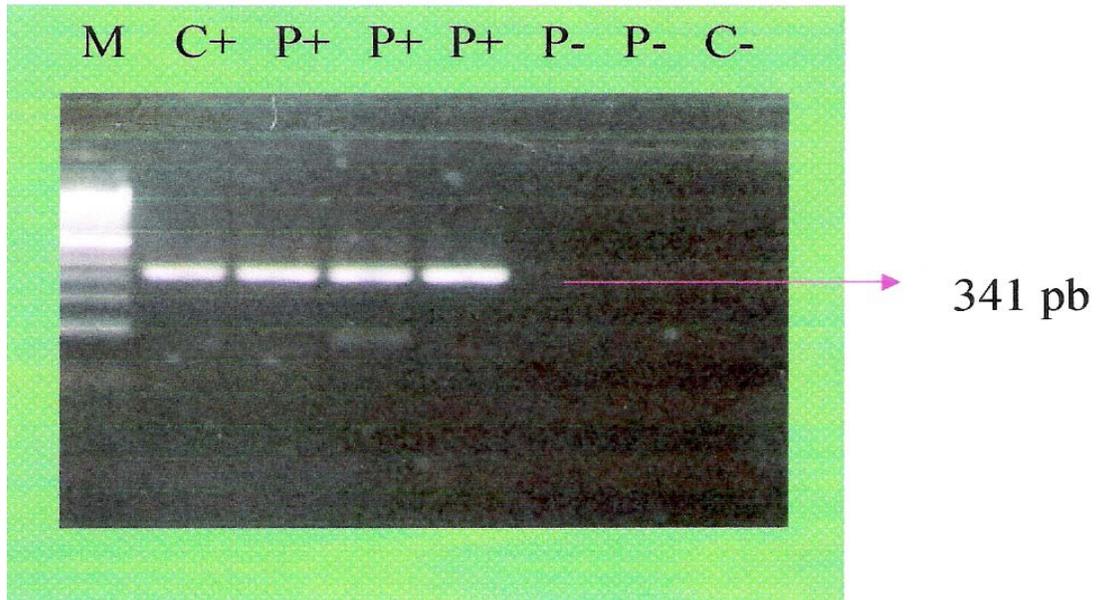
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA)

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivlduo com AIDS).

P+: Indivlduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivlduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivlduo não infectado pelo HIV-1)



**Figura 06.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *env* (1) do HIV-1 ("primers" JA9-JA12), fragmento amplificado de 341 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA fixado em papel filtro.

**Legenda da figura 06:**

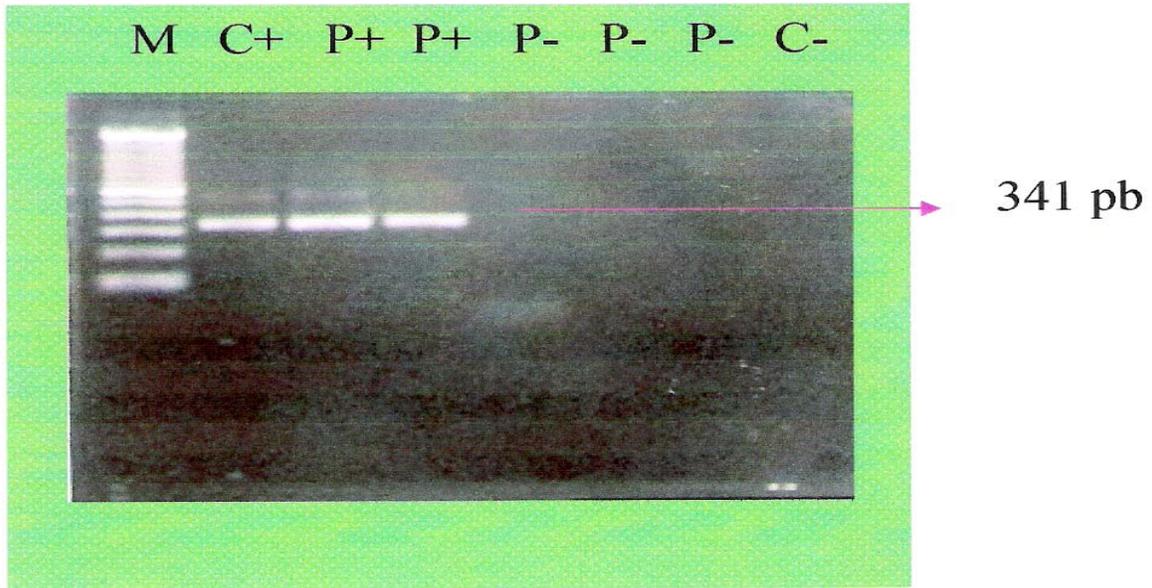
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA)

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS)

P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1)



**Figura 07.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *env* (1) do HIV-1 ("primers" JA9-JA12), fragmento amplificado de 341 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA de sangue total.

**Legenda da figura 07:**

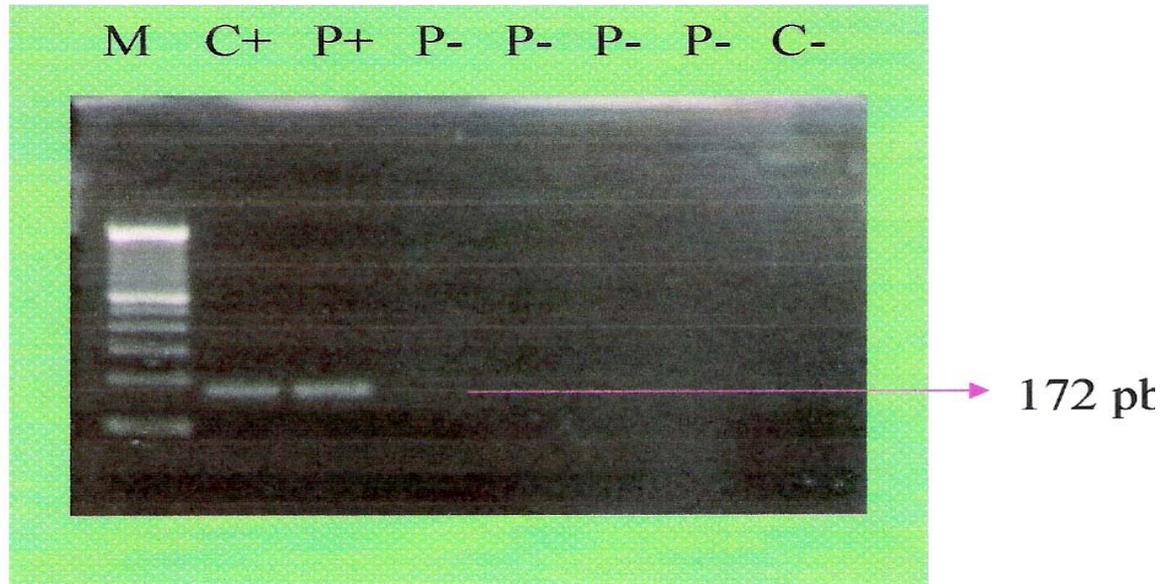
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA).

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS).

P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1)



**Figura 08.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *env* (2) do HIV-1 ("primers" JA13-JA16), fragmento amplificado de 172 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA fixado em papel filtro.

**Legenda da figura 08:**

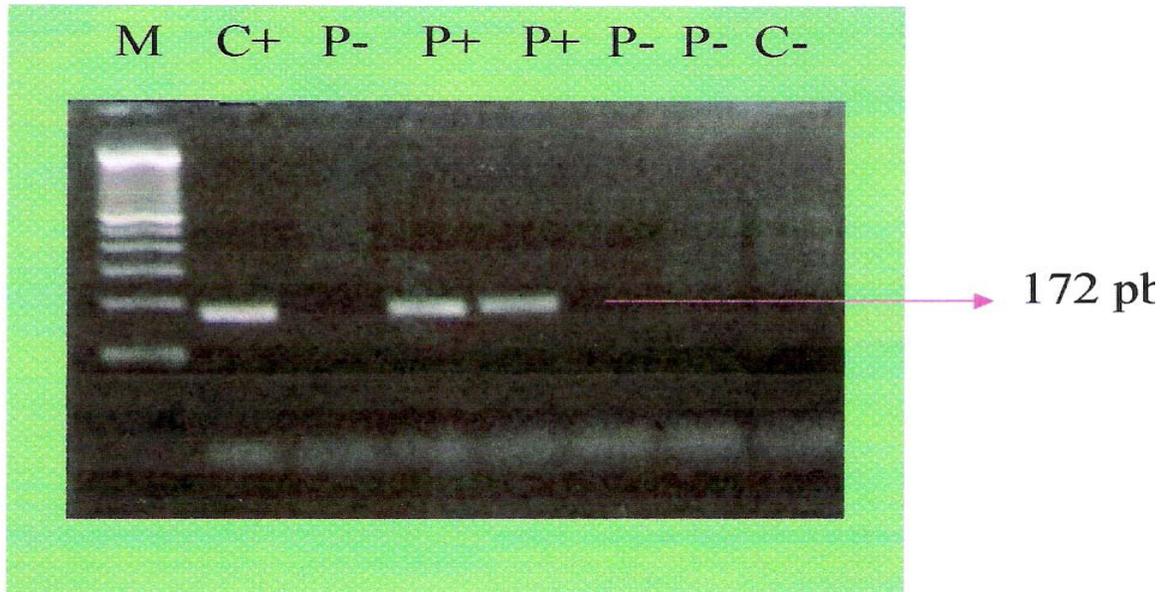
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA)

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS).

P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1)



**Figura 09.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *env* (2) do HIV-1 ("primers" JA13-JA16), fragmento amplificado de 172 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA de sangue total.

**Legenda da figura 09:**

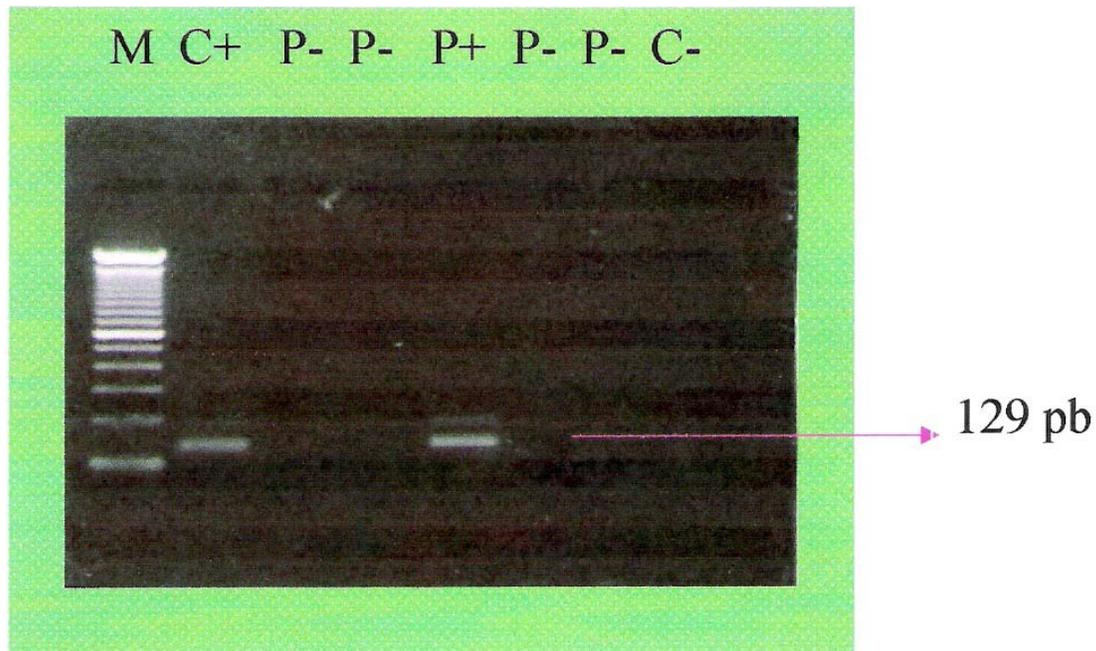
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA).

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS).

P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1)



**Figura 10.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *pol* do HIV-1 ("primers" JA17-JA20) , fragmento amplificado de 129 pb, de amostras obtidas a partir da extração do DNA fixado em papel filtro.

**Legenda da figura 10:**

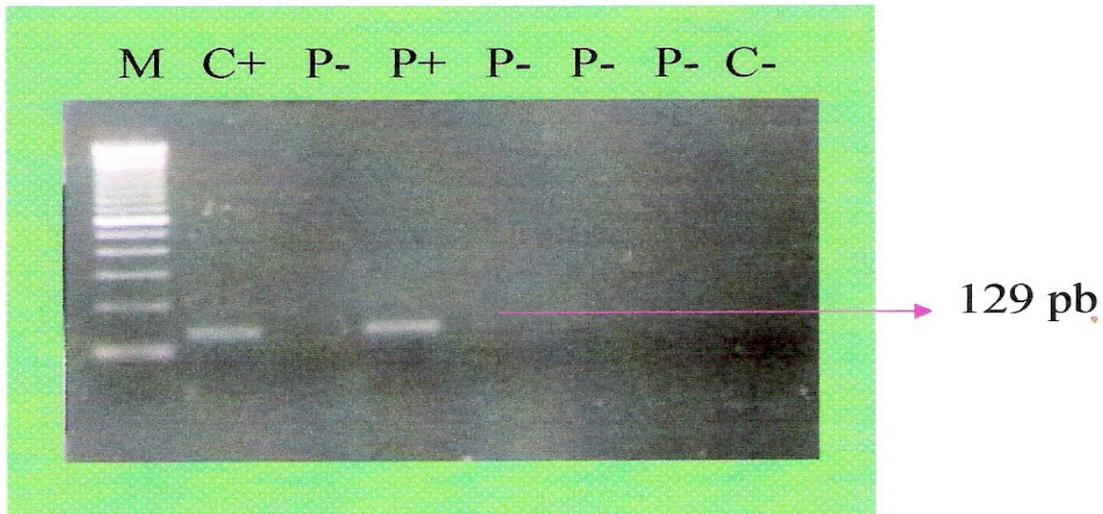
M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA).

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS).

P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1).



**Figura 11.** Produto da amplificação de uma região flanqueada do gene *pol* do HIV-1 ("primers" JA17-JA20), fragmento amplificado de 129 pb, de amostras obtidas a partir da extração de DNA de sangue total.

**Legenda da figura 11:**

M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®. USA)

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (indivíduo com AIDS).

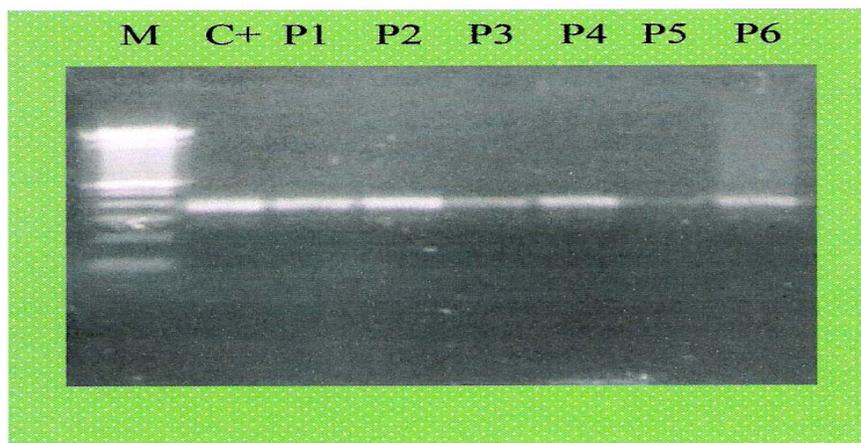
P+: Indivíduo positivo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

P-: Indivíduo negativo para infecção pelo HIV-1, pela "Nested-PCR".

C-: Controle negativo para "Nested-PCR" (indivíduo não infectado pelo HIV-1).

## 5.1 Resultados da "Nested-PCR", tendo como controle interno de reação, a amplificação do gene humano da $\beta$ -globina.

Como já foi mencionado no item Casuística e Métodos, o DNA dos indivíduos estudado foi submetido à amplificação com "primers" que flanqueiam a região do gene da ( $\beta$ -globina (365pb).



**Figura 12.** Amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -globina humano (365pb). Controle de qualidade do DNA estudado.

### Legenda da figura 12:

M: marcador de peso molecular (Ladder 10X, Gibco BTL, LIFE TECHNOLOGIE®, USA)

C+: Controle positivo para "Nested-PCR" (amostra de DNA humano)

P1, P2 e P3: DNA de indivíduo extraído a partir de amostra coletada em papel filtro.

P4, P5 e P6: DNA de indivíduo extraído a partir de amostra coletada em tubo com EDTA.

## 6 - DISCUSSÃO



No presente trabalho, realizou-se a padronização da extração de DNA colhido em papel filtro, uma maneira para se obter a amostra com qualidade e em menor volume sanguíneo, para ser submetida posteriormente a "Nested-PCR", como método confirmatório.

Assim como SPIELBERG *et al*, 2000; este método foi escolhido por ser um diagnóstico molecular e detectar a infecção pelo HIV-1 antes da soroconversão.

Com isso, o método pode ser utilizado como primeiro teste diagnóstico ou método confirmatório.

A "Nested-PCR" foi realizada também em amostras extraídas a partir do sangue total dos indivíduos estudados, pois este método, já padronizado previamente no laboratório onde foi realizada a pesquisa, foi considerado "gold-standart".

Nossos resultados mostraram que as amplificações mais eficientes dos fragmentos foram encontradas em concentrações de MgCl<sub>2</sub> (2,5mM).

Durante este trabalho, foram diagnosticados 02 indivíduos infectados pelo HIV-1, e 40 não infectados. Os indivíduos restantes, que serviram como controle positivo e negativo para o estudo, obtiveram êxito ao confirmarmos seus resultados de diagnóstico, previamente conhecidos.

Observou-se que a região *env* 1 do HIV-1, considerada uma região mais variável que as outras, não apresentou resultado positivo para um dos pacientes, discordando das demais regiões. Este resultado pode ter ocorrido pelo fato da carga viral do paciente estar indetectável (< 1000 cópias virais por ml), fazendo com que a quantidade viral fosse insuficiente para a realização do teste, ou pelo fato da região ser variável e ter ocorrido uma mutação naquele local.

A extração de DNA coletado em papel filtro, utilizando o KIT FTA Cards ® (Life Technologies), apresentou algumas vantagens sobre a extração de DNA, a partir do

sangue total. Resultados similares foram encontrados na literatura (CASSOL *et al*, 1996; BIGGAR *et al*, 1997; PANTELEEFF *et al*, 1999; BECK *et al*; 2001; FISCHER *et al*, 2004).

Para a realização da coleta de sangue em papel filtro não foi necessária à presença de profissionais treinados; somente algumas gotas de sangue foram necessárias para preencher o cartão de coleta; sua secagem foi feita em temperatura ambiente; seu transporte foi considerado mais fácil e seguro, pois não se tratavam de tubos (NYAMBI *et al*, 1994; COMEAU *et al*, 1996; STROBEL *et al*, 1998; FISCHER *et al*, 2004).

Para a realização da extração do DNA coletado em papel filtro não foi necessário um grande suporte laboratorial (GUEVARA *et al*, 1998; PANTELEEFF *et al*, 1999), e pôde ser realizada no laboratório em cima de bancadas, sem se preocupar com a contaminação das amostras (BIGGAR *et al*, 1997; PANTELEEFF *et al*, 1999).

BIGGAR *et al*. (BIGGAR *et al*, 1997) e PANTELEEFF *et al*. (PANTELEEFF *et al*, 1999) relataram que esse tipo de extração dispensou as várias etapas para remoção de possíveis inibidores da PCR, tornando o processo mais rápido (cerca de 2h).

Em nosso estudo, foi necessário somente um pedaço de papel com aproximadamente 2mm para a realização da PCR e "Nested-PCR".

Segundo NYAMBI *et al*. (NYAMBI *et al*, 1994), CASSOL *et al*. (CASSOL *et al*, 1996), STROBEL *et al*. (STROBEL *et al*, 1998) e BIGGAR *et al*. (BIGGAR *et al*, 2001), este método de coleta e de extração de DNA pode ser utilizado para pesquisas de HIV em áreas de difícil acesso, ou estudo epidemiológico, onde as amostras coletadas podem ser enviadas a laboratórios centrais em cidades com maior infra-estrutura.

Outra vantagem do método de extração de DNA em papel filtro é o baixo custo para sua realização, concordando com resultados obtidos por pesquisadores da Universidade Caxias do Sul (UCS), (financiados pelo Programa Nacional de DST/Aids e

pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura - UNESCO) (Ministério da Saúde Brasil, 2005), e com resultados descritos na literatura por SOLOMON *et al* (SOLOMON *et al*, 2002). Estimamos que este método custe aproximadamente 25% a menos do que os métodos sorológicos para a detecção para o HIV-1.

Uma desvantagem do método de extração, utilizando o Kit FTA Cards (Life Technologies), foi notada, aproximadamente entre 09 meses a 01 ano após as coletas. As amostras guardadas, ao serem picotadas para preparação da "Nested-PCR", continuavam com a hemoglobina fixa ao papel, não sendo removida com o FTA Reagents, devido a sua oxidação. Não foi testado no presente estudo, um meio de retirar a hemoglobina oxidada, ficando em aberto, para novos estudos.

A extração de DNA de sangue total necessitou de 05 ml coletados em tubos contendo EDTA, feitos por profissionais treinados. As amostras foram submetidas a uma lise de hemácias, lise de leucócitos e precipitação de DNA, para poder seguir com a "Nested-PCR".

Para etapas de lise e precipitação de DNA, o laboratório ao qual as amostras foram submetidas necessitou de uma infra-estrutura capaz de comportar tais processos, para que as amostras não fossem comprometidas ou contaminadas. Esta extração demorou cerca de um dia para ser realizada.

A comparação entre métodos de extração em papel filtro e extração do sangue total apresentou concordância de 100% dos resultados, confirmando dados relatados por NYAMBI *et al* (NYAMBI *et al*, 1994).

Os resultados deste trabalho confirmaram dados da literatura, segundo os quais a extração de DNA em papel filtro (COMEAU *et al*, 1996; FISCHER *et al*. 2004; YOURNO & CONROY, 1992) é uma maneira segura, rápida e prática de se obter amostras de DNA em menor volume sangüíneo e de boa qualidade para a realização da "Nested-PCR", principalmente em recém - natos filhos de mães soropositivas (BIGGAR *et al*, 1997; CASSOL *et al*, 1994; CASSOL *et al*, 1996; PANTELEEFF *et al*, 1999).

## **7 - CONCLUSÃO**

- Padronizou-se a extração de DNA coletado em papel filtro, um método seguro e eficiente; onde somente algumas gotas de sangue foram necessárias para posterior realização da PCR e "Nested-PCR".
  
- Aplicou-se a extração de DNA em sangue total, um método previamente padronizado no laboratório onde foi realizado o estudo (gold-standard test), para comparação desta extração com a de papel filtro. Observou-se que a extração de DNA a partir de papel filtro é tão eficiente quanto a extração feita a partir de sangue total coletado em tubo com EDTA, apresentando as seguintes vantagens:
  - não necessita de profissional treinado para a coleta, tornando esta mais fácil e segura;
  - somente 50µl de sangue são necessários para preencher o cartão de coleta; pode ser seco em temperatura ambiente;
  - sua estocagem não necessita de grande espaço físico; a extração do DNA pode ser feita em bancadas, não exigindo grande infra-estrutura do laboratório;
  - não corre risco de contaminação; suas etapas de lavagens para remoção de possíveis interferentes da PCR são mais simples e rápidas;
  - é necessário somente um picote com aproximadamente 2mm para a realização da PCR.

## **8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ALBERT, J. & FENYO, EM. Simple, sensitive, and specific detection of human immunodeficiency virus type 1 in clinical specimens by polymerase chain reaction with nested primers. **J Clin Microbiol**, 28 (7): 1560-1564,1990.

ANTONI, B.A; STEIN, S.B.; RABSON, AB. Regulation of human immunodeficiency virus infection: implications for pathogenesis in: MOROSCH, K.M.; MURPHY, F.A; SHATKIN, AJ. **Advanced in Virus Research**, San Diego, California, Academic Press, Inc, 1994. p. 53-145.

ARANTES, J.T. O sucesso brasileiro na luta contra a AIDS. **Scientific American Brasil**, set: 36-39, 2002.

BAKISH, S.S.; TETALI, S.; ABRAMS, EJ.; PAUL, M.O.; PAHWA, S.G. Repeatedly positive human immunodeficiency virus type 1 DNA polymerase chain reaction in immunodeficiency virus-exposed seroreverting infants. **Pediatr Infect Dis J**, 14: 658-662, 1995.

BARIN, F.; COUROUCE, AM.; PILLONEL, J.; BUZELAY, L. Retrovirus 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: 1503-1505, 1997.

BIGGAR, RJ.; JANES, M.; PILON, R; MIOTTI, P.; TAHA, T.E; BROADHEAD, R; MTIMIVALYE, L.; KUMVENDA, N.; CASSOL, S..Virus levels in untreated African infected with human immunodeficiency virus type 1. **The Journal of Infected Disease**, 180(6): 1838-1843, 1999.

BIGGAR, RJ.; MILEY, W.; TAHA, T.E.; BUTCHER, A; SPADORO, J.; WATERS, D. Blood collection on filter paper: a practical approach to sample collection for studies of perinatal HIV transmission. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, 14(4): 368-373.

BOISSON, E.; NICOLL, A; ZABA, B.; RODRIGUES, L.C. Interpreting HIV Seroprevalence Data from Pregnant Women. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 13: 434-439, 1996.

BRAVO, R; GUTIÉRREZ, M.; SORIANO, M.; MELHADO, J.; LABAD, M.L.P.; MAS, A LAHOZ, J.G.; FONTELAS, P.M. Lack of evidence for viral clearance in children born to HIV-infected mothers. **AIDS**, 10: 1744-1745, 1996.

BROWN, T.A. **Clonagem Gênica e Análise de DNA**: Uma introdução. Tradução de Henrique Bunselmeyer Ferreira e Luciane Maria Pereira Passaglia 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. p.187 -201. Título original: Gene cloning and DNA analysis: an introduction.

BRYSON, Y.J. Perinatal HIV-1 transmission: recent advances and therapeutic interventions. **AIDS**, 10 (suppl. 3): 833-44, 1996.

BULTERYS, M.; GOEDERT, J.J. From Biology to Sexual Behaviour - Towards the Prevention of Mother-to-child transmission of HIV. **AIDS**, 10: 1287-1289, 1996.

CASSOL, S.; GILL, M.J.; PILON, R; CORMIER, M.; VOIGT, RF.; WILLOUGHBY, B.; FORBES, J. Quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA from dried plasma spots collected on filter paper. **Journal of Clinical Microbiology**, 35(11): 2795-2801, 1997.

CASSOL, S.; SALAS, T.; GILL, M.J.; MONTPETIT, M.; RUDNIK, J; SY, C.T.; SHAUGHNESSY, M.V.O. Stability of Dried Blood Spot Specimens for detection of Human Immunodeficiency Virus DNA by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, 30(12): 3039-3042, 1992.

CASSOL, S.A.; READ, S.; WENIGER, B.G.; GOMEZ, P.; LAPOINTE, N.; OU, C.Y.; BABU, P.G. Dried blood spots collected on filter paper : an international resource for the diagnosis and genetic characterization of human immunodeficiency virus type-1. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 91 (3): 351-358, 1996.

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**. 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 Wkly Rep**, 38: 1-7, 1989.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. 1994 revised classification system for human immunodeficiency virus (HIV) infection in children less than 13 years of age. **Morbidity and Mortality Wkly Rep**, 43: 1-10, 1994.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Perinatally Acquired HIV/AIDS United States. **Morbidity and Mortality Wkly Rep**, 46:1087-1093, 1997.

CHAMBANCHERD, P.; BROWN, A.E.; TRICHAVAROJ, R.; TIENAMPORN, P., PUTHAKIRD, P.; LIMPAIROJN, N.; VANCOTT, T.C.; DE SOUZA, M.S.; Application of dried blood spot specimens for serologic subtyping of human immunodeficiency virus type 1 in Thailand. **J Clin Microbiol**, 37(3): 804-806, 1999.

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. **Clin Chem**, 35: 946-952, 1989.

CLEWLEY, J.P. The polymerase chain reaction, a review of the practical 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.

COMEAU, AM.; PITT, J.; HILL YER, G.V.; LANDESMAN, S.; BREMER, J.; CHANG, B.H.; LEW, J.; MOYE, J.; GRADY, G.F.; MCINTOSH, K. Early detection of human immunodeficiency virus on dried blood spots specimens: sensitivity across serial specimens. Women and Infants Transmission Study Group. **The Journal of Pediatrics**, 129(1): 111-118, 1996.

COSTA, F.F. & COSTA, S.C.B. Reação em cadeia da polimerase (PCR) princípios e aplicações clínicas. **Rev Bras Reumatol**, 32: 142-146, 1992.

COTRAN, RS.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. Robbins **Patologia Estrutural e Funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.194-204.

COWAN, M.J.; HELLMANN, D.; CHUDWIN, D.; WARA, D.W.; CHANG, RS.; AMMANN, AJ. Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome. **Pediatrics**, 73: 382-386, 1984.

CUNNINGHAM, AL.; DWYER, D.E; MILLS, J.; MONTAIGNIER, L. Structure and function of HIV. **MJA**, 164: 161 :171, 1996.

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

DICKOVER, RE; GARRATTY, EM.; HERMAN, S.A; SIM, M.S.; PLAEGER, S.; BOYER, P.J.; KELLER, M.; DEVEIKIS, A; STIEHM, ER; BRYSON, Y.J. Identification of levels of Maternal HIV-1, RNA Associated With Risk of Perinatal Transmission. **JAMA**, 275: 599-605, 1996.

DOMACHOWSKE, J.B. Pediatric human immunodeficiency virus infection. **Clin Microbiol Ver**, 9: 448-468, 1996.

DORENBaum A; VENKATESWARAN, K.S.; YANG, G.; COMEAU, AM.; 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 and Human Retrovirology**, 15: 35-42, 1997.

DUNN, D.T.; BRANDT, C.D.; KRIVINE, A; CASSOL, S.A; ROQUES, P.; BORKOWSKY, W.; DE ROSSI, A; DENAMUR, E.; ENRNST, A; .LOVEDAY, C.; HARRIS, J.A; McINTOSH, K.; COMEAU, AM.; RAKUSAN, T.; NEWELL, M-L.; PECKHAM, C. The sensitivity of HIV-1 DNA polymerase chain reaction in the neonatal period and the relative contributions of intra-uterine and intra-partum transmission. **AIDS**, 9: F7-F11,1995.

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. **J Pediatr**, 115: 200-203, 1989.

EMINI, E. A Hurdles in the path to an HIV-1 vaccine. **Scientific American**, may/jun: 38-47, 1995.

- EZZELL, C. AIDS a grande batalha. **Scientific American Brasil**, set: 28-35, 2002.
- FALLON, J.; EDDY.; WIENER, L.; PIZZO, P.A Human immunodeficiency virus infection in children. **J Pediatr**, 114: 1-30, 1989.
- FANNING, M.M. Women and HIV. In: Walmsley, S. HIV Infection – **A Clinical Approach**. 2. ed. New York: Academic Press, 1997. p. 01-65.
- FARAH, S.B. **DNA Segredos & Mistérios**. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 01-183.
- FFRENCH, R; STEWART. G.J.; PENNY, R; LEVY, J.A How HIV produces immune deficiency. **MJA**, 164: 166-171, 1996.
- FISCHER, A; LEJCZAK, C.; SERVAIS, J.; MAKOMBE, N.; RUSINE, J.; SATUB, T.; HEMMER, R; SCHENEIDER, F.; SC, J.C.; ARENDT, V. Simple DNA extraction method for dried blood spots and comparison of two PCR assays diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. **J Clin Microbiol**, 42(1): 16-20, 2004.
- GALEL, S.A; LIFSON, J.D.; ENGLEMAN, E.G. Prevention of AIOS Transmission Trough Screening of the Blood Supply. **Annu Ver Immunol**, 13: 201-227,1995.
- GALLO, RC.; & MONTAIGNIER, L. AIOS in 1988. **Scientific American**, 259: 41-71, 1988.
- GALLO, RC. Human Retroviruses: A Decade of Discovery and Link with human Disease. **J. Infect. Dis**, 164: 235-243, 1991.
- GALVÃO-CASTRO, B.; JR; O.C.F.; BONGERTZ, V. Vacinas contra HIV/AIDS: Desenvolvimento e perspectivas. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIOS. Secretaria de Assistência à Saúde. **Ministério da Saúde Cadernos Técnicos**, 1: 5-9, 1994.

GOUDSMIT, J.; LANGE, J.M.A; PAUL, D.A; DAWSON, G.J. Antigenemia and antibodies titers to core and envelope antigens in AIOS, AIOS - related complex, and subclinical human immunodeficiency virus infection. **The Journal of Infections Diseases**, 155: 558-560, 1987.

GREENE, W. C. The Molecular Biology of Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. **N Engl J Med**. 164: 235-243, 1991.

HANSELTINE, 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.

HO, D. D. Viral Counts Count in HIV Infection. **Science**, 72: 1124-1125, 1996.

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

HU, D.J.; DONDERO, T.J.; RAYFIELD, M.A, et al. The Emerging Genetic Diversity of HIV. The Importance of Global Surveillance for Diagnostics, Research, and Prevention. **JAMA**, 275: 210-216, 1996.

INDACOCHEA, F.G. & SCOTT, G.B. Recent advances in the management of the virus infection in infants and children. **Pediatrics**, 86: 2-10, 1990.

JAMES, J.S. **Medical advances with international impact**: maternal transmission, TB prevention, easier sample preparation - 1998. Disponível em: <http://www.aids.org>. Acesso em: 05 abril 2001.

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

KLINE, M.W.; HOLLINGER, F.B.; ROSENBLATT, H.M.; BOHANNON, B.; KOZINETZ, C.A.; SHEARER, W.T. Sensitivity, specificity and predictive value of physical examination, culture and other laboratory studies in the diagnosis during early infancy of vertically acquired human immunodeficiency virus infection. **Pediatr Infect Dis J**, 12: 33-16, 1993.

LAURE, F.; ROUZIUX, C.; VEBER, F.; JACOMET, C.; COURGNAUD, V.; BLANCHE, S.; BURGARD, M.; GRISCELLI, C.; BRECHOTT, C. Detection of HIV-1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. **Lancet**, 3: 538-540, 1988.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p.188-204.

LIFSON, AR.; 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 homosexual and bisexual men. **J Infect Dis**, 161: 436-439, 1990.

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

MACDONALD, K.S.; EMBREE, J.; NJENGA, S.; NAGELKERKE, N.J.D.; NGATIA, I.; MOHAMMED, Z.; BARBER, B.H.; NDINYA-ACHOA, J.; BWAYO, J.; PLUMMER, F.A Mother-child class I HLA concordance increases perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. **J. Infect dis**, 177: 551-556, 1998.

MADURAI, s.; MOODLEY, D.; COOVADIA, H.M.; GOPAUL, W.; SMITH, AN.; YORK, D.F. Infant-maternal HIV - specific immunoglobulin G1 antibody ratios as an indicator of vertical transmission. **AIDS**, 11: 1191-1193,1997.

MELLORS, J.W.; RINALDO, C.R.J.; GUPTA, P.; WHITE, RM.; TODD, J.A.; KINGSLEY, L.A Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. **Science**, 272: 1167-1170, 1996.

Ministério da Saúde Brasil - Portal Saúde. **Agência Saúde**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/>. Acesso em: 15 janeiro 2005.

MOLINA, R.M.; TORO, A.D.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.

MOODLEY, D.; BOBAT, R.A; COUTSOUDIS, A. COOVADIA, H.M. Predicting Perinatal Human Immunodeficiency Virus Infection by Antibody patterns. **Pediatr Infect Dis J**, 14 : 850-852, 1995.

NEWELL, M.L.; LOVEDAY, C.; DUNN, D.; KAYE, S.; TEDDER, R; PECKHAM, C.; DE MARIA, A; GIANQUINTO, C.; OMENACA, F.; CANOSA, C.; *et al.* Use of polymerase chain reaction and quantitative antibody tests in children born to human immunodeficiency virus type-1-infected mothers. **Journal of Medical Virology**, 47(4): 330-335, 1995.

NEWELL, M.L.; DUNN, D.T.; PECKHAM, C.S.; SEMPRINI, A.E. Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. **AIDS**, 10: 1675-1681, 1996.

NYAMBI, P.N.; FRANSEN, F.; DE BEENHOUWER, H.; CHOMBA, E.N.; TEMMERMAN, M.; NDINYA-ACHOLA, J.O.; PIOT, P.; GROEN, G.V.D. Detection of human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) in Hell Prick Blood on Filter Paper from Children Born to HIV-1-Seropositive Mothers. **Journal of Clinical Microbiology**, 32 (11): 2858-2860, 1994.

OLIVEIRA, L.H. AIDS a 1% da cura. **SuperInteressante**, nº 10: 38-45, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **HIV e AIDS nas Américas**: uma epidemia multifacetada. Geneve: OMS, 2001.

PANTELEEFF, D. D.; JOHN, G.; NDUATI, R.; MBORI-NGACHA, D.; RICHARDSON, B.; KREISS, J.; OVERBAUGH, J. Rapid Method for Screening Dried Blood Samples on Filter Paper for Human Immunodeficiency virus Type 1 DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, 37 (2): 350-353, 1999.

PANTALEO, G.; GRAZIOSI, C.; FAUCI, A.S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **The New England Journal of Medicine**, 328: 328-335, 1993.

PEREZ, M.T.G.; ROLO F.M.G.; NIBOT, C.S.; CRUZ O.S.; RODRIGUEZ, O. The determination of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in samples of dried blood on filter paper. **Rev Cubana Med Trop**, 50 (2): 93-95.

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, gp120, of human immunodeficiency virus type 1 group M and consequences for serotyping. **Journal of Virology**, 72: 677-683, 1998.

POLLET, D.E; SAMAN, EL.; PEETERS, D.C.; WARMENBOL, 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 striped-based assay including recombinant antigens and synthetic peptides. **Clinical Chemistry**, 37: 1700-1707, 1991.

ROSEN, C.A & PAVLAKIS, G.N. Tat and rev: positive regulators of HIV gene expression. **AIDS**. 4: 499-509, 1990.

ROUZIOX, C. Le diagnostic de l'infection par VIH chez l'enfant. **Annales De Pédiatrie**, 43: 14-30. 1996.

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

SABINO, EC.; DIAZ, R.S.; BRIGIDO, L.F.; LEARN, G.H.; MULLINS, J.I; REINGOLD, AL; DUARTE, A.J.S.; MAYER, A; BUSCH. M.P. - Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. **AIDS**, 10: 1579 - 1584, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, EF.; MANIATS, T. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2 ed. New York, Cold Spring Harbor, Laboratory, 1989.

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

SAYRE, K.R.; OOOO,R.Y.; TEGTMEIER, G.; LAYUG, L.; ALEXANOER, S.S.; BUSCH, M.P. False-positive human immunodeficiency virus type 1 Western blot tests in non infected blood donors. **Transfusion**, 36: 45:52, 1996.

SCHLEUPNER, C.J. Diagnostic tests for HIV-1 infection. **Principies and Practice of infections disease**, 1: 1-15,1988.

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

SLAVIK, T.; WOLFAAROT, M.; ZYL, H.V.; SIMSON, I.W. Retrospective determination of HIV-1 status by a PCR method on paraffin wax embedded sections. **J. Clin. Pathol**, 48: 733:736, 1994.

SOLOMON, S.S.; SOLOMON, S.; ROORIGUEZ 11; McGARVEY, S.T.; GANESH, AK.; THYAGARAJAN, S.P.; MAHANJAN, AP.; MAYER, K.H. Dried blood spots (OBS): a valuable tool for HIV surveillance in developing/tropical countries. **Int J STD AIDS**, Jan; 13(1 ):25-8,2002.

SPIELBERG, F.; CRITCHLOW, C.; VITTINGHOFF, E.; COLETTI, AS.; SHEPPARO, H.; MAYER, K.H.; METZGERG, O.; JUOSON, F.N.; BUCHBINOER, S.; CHESNEY, M.; GROSS, M. Home collection for frequent HIV testing: acceptability of oral fluids, dried blood spots and telephone results. HIV Early Detection Study Group. **AIDS**, 14(12): 1819-1829, 2000.

STROBEL, E.; EMMINGER, C.; MAYER, G.; EBERLE, J.; GURTLER, L. Detection of HIV-1 infection in dried blood spots from a 12-year-old ABO bedside test card. **Vox Sanguinis**, 75(4): 303-305.

TEIXEIRA, P.R. Coordenação Nacional de DST e Aids. **Boletim epidemiológico**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>. Acesso em: 10 julho 2004.

VARMUS, H. Retroviruses. **Science**, 240: 1427-1435, 1988.

WILFRED, C.M. & McKINNEY, RE.J. When children harbor HIV. **Scientific American**, jul: 74-75, 1998.

WILLIAMS, P; SIMMONDS, P.; YAP, P.L.; BALFE, P.; BISHOP, J.; BRETTE, R; HAGUE, R; HARGREAVES, D.; INGLIS, J.; BROWN, AL.; PEUTHERER, J.; REBUS, S.; MOK, J. The polymerase chain reaction in the diagnosis of vertically transmitted HIV infection. **AIDS**, 4; 393-398, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. AIDS - images of the epidemic. Geneva: **WHO**, 1994, p.05-13.

Workshop Report from the European Commission (DG XLL, INCO-DC) and the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. HIV-1 Subtypes: Implications for Epidemiology, Pathogenicity, Vaccines and Diagnostics. **AIDS**, 11: 17-36, 1997.

YAMAMOTO, AY.; MUSSI-PINHATA, M.M.; PINTO, P.C.G.; FIGUEIREDO, L.T.M.; JORGE, S.M. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by polymerase chain reaction technique. **Journal of Virological Methods**, 97: 159-164, 2001.

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

## **9 - APÊNDICES**

**Apêndice 01** - Dados pessoais das crianças e pais estudados.

<b>Indivíduos</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Resultado prévio da pesquisa do HIV-1</b>
01	Adulto	M	Positivo
02	Adulto	F	Positivo
03	05 anos	M	Negativo
04	Adulto	M	Positivo
05	Adulto	M	Positivo
06	Adulto	M	Positivo
07	Adulto	F	Positivo
08	01 dia	F	S/R
09	06 meses	F	S/R
10	Adulto	M	Positivo
11	07 dias	F	S/R
12	13 dias	F	S/R
13	14 meses	M	S/R
14	13 meses	M	S/R
15	02 meses	M	S/R
16	09 dias	F	S/R
17	01 mês	M	S/R
18	05 meses	F	S/R
19	09 meses	M	S/R
20	16 meses	M	S/R
21	08 meses	F	S/R
22	03 meses	F	S/R
23	01 mês	F	S/R
24	07 meses	F	S/R
25	06 anos	M	Positivo
26	03 anos	M	Positivo
27	06 meses	F	S/R

<b>Indivíduos</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Resultado prévio da pesquisa do HIV-1</b>
28	10 meses	M	S/R
29	03 meses	F	S/R
30	02 anos	F	Negativo
31	17 dias	M	S/R
32	Adulto	F	Positivo
33	Adulto	F	Positivo
34	Adulto	F	Positivo
35	Adulto	F	Positivo
36	Adulto	F	Positivo
37	03 meses	M	S/R
38	04 meses	F	S/R
39	02 meses	F	S/R
40	12 meses	M	S/R
41	05 anos	M	Positivo
42	11 meses	M	S/R
43	03 anos	F	Positivo
44	11 anos	M	Positivo
45	05 anos	F	Positivo
46	05 anos	F	S/R
47	18 meses	F	S/R
48	10 anos	M	Negativo
49	11 anos	M	Positivo
50	Adulto	F	Positivo
51	13 meses	M	S/R
52	10 meses	M	S/R
53	06 meses	M	S/R
54	27 dias	F	S/R
55	05 meses	M	S/R
56	03 meses	M	S/R

<b>Indivíduos</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Resultado prévio da pesquisa do HIV-1</b>
57	03 meses	M	S/R
58	07 meses	M	S/R
59	02 meses	M	S/R
60	01 mês	F	S/R
61	Adulto	F	Positivo
62	03 meses	F	S/R
63	06 anos	M	Positivo
64	03 anos	F	S/R
65	05 anos	F	Positivo
66	05 anos	F	S/R
67	06 anos	M	Positivo
68	14 anos	M	Positivo
69	15 dias	F	S/R
70	24 dias	M	S/R
71	14 meses	F	S/R

**Legenda do Apêndice 01:**

**Coluna 01:** relação dos pacientes estudados, através da numeração 01 a 71.

**Coluna 02:** idade respectiva de cada pacientes no momento em que a coleta foi realizada, sendo as crianças em dias e meses, e os adultos em anos.

**Coluna 03:** sexo feminino (F) ou masculino (M) dos pacientes.

**Coluna 04:** resultado prévio da infecção pelo HIV-1.

- Positivo: para pacientes sabidamente soropositivos.
- Negativo: para pacientes negativos para a infecção pelo HIV-1
- S/R: sem resultados anteriores.

**Apêndice 02** - Resultados da "Nested - PCR" (regiões *gag*, *env1* e *env2*, *pol*) em amostras obtidas em papel filtro, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
01	+	+	+	+
02	+	-	+	+
03	-	-	-	-
04	+	+	+	+
05	+	+	+	+
06	+	+	+	+
07	+	+	+	+
08	+	+	+	+
09	-	-	-	-
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	+	+	+	+
26	+	+	+	+

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	+
37	-	-	-	-
38	+	+	+	+
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	+	+	+	+
42	-	-	-	-
43	+	+	+	+
44	+	+	+	+
45	+	+	+	+
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-
48	-	-	-	-
49	+	+	+	+
50	+	+	+	+
51	-	-	-	-
52	-	-	-	-
53	-	-	-	-
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
56	-	-	-	-
57	-	-	-	-
58	-	-	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	-	-
61	+	+	+	+
62	-	-	-	-
63	+	+	+	+
64	-	-	-	-
65	+	+	+	+
66	-	-	-	-
67	+	+	+	+
68	+	+	+	+
69	-	-	-	-
70	-	-	-	-
71	-	-	-	-

**Apêndice 03** - Resultados da "Nested - PCR" (regiões *gag*, *env1* e *env2*, *pol*) em amostras obtidas de sangue total, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).

Casuística	Gene gag	Gene env 1	Gene env 2	Gene pol
01	+	+	+	+
02	+	-	+	+
03	-	-	-	-
04	+	+	+	+
05	+	+	+	+
06	+	+	+	+
07	+	+	+	+
08	+	+	+	+
09	-	-	-	-
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	+	+	+	+

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
26	+	+	+	+
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	+
37	-	-	-	-
38	+	+	+	+
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	+	+	+	+
42	-	-	-	-
43	+	+	+	+
44	+	+	+	+
45	+	+	+	+
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-
48	-	-	-	-
49	+	+	+	+
50	+	+	+	+
51	-	-	-	-
52	-	-	-	-
53	-	-	-	-

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	-	-	-	-
58	-	-	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	-	-
61	+	+	+	+
62	-	-	-	-
63	+	+	+	+
64	-	-	-	-
65	+	+	+	+
66	-	-	-	-
67	+	+	+	+
68	+	+	+	+
69	-	-	-	-
70	-	-	-	-
71	-	-	-	-

**Apêndice 04** - Resultados da "Nested - PCR" (regiões *gag*, *env1* e *env2*, *pol*) em amostras obtidas de sangue total, em toda casuística estudada (pais, crianças soropositivas e crianças com suspeita de infecção perinatal do vírus).

Casuística	Gene gag	Gene env 1	Gene env 2	Gene pol
01	+	+	+	+
02	+	-	+	+
03	-	-	-	-
04	+	+	+	+
05	+	+	+	+
06	+	+	+	+
07	+	+	+	+
08	+	+	+	+
09	-	-	-	-
10	+	+	+	+
11	+	+	+	+
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	+	+	+	+

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
26	+	+	+	+
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	+
37	-	-	-	-
38	+	+	+	+
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	+	+	+	+
42	-	-	-	-
43	+	+	+	+
44	+	+	+	+
45	+	+	+	+
46	-	-	-	-
47	-	-	-	-
48	-	-	-	-
49	+	+	+	+
50	+	+	+	+
51	-	-	-	-
52	-	-	-	-
53	-	-	-	-

<b>Casuística</b>	<b>Gene gag</b>	<b>Gene env 1</b>	<b>Gene env 2</b>	<b>Gene pol</b>
54	-	-	-	-
55	-	-	-	-
56	-	-	-	-
57	-	-	-	-
58	-	-	-	-
59	-	-	-	-
60	-	-	-	-
61	+	+	+	+
62	-	-	-	-
63	+	+	+	+
64	-	-	-	-
65	+	+	+	+
66	-	-	-	-
67	+	+	+	+
68	+	+	+	+
69	-	-	-	-
70	-	-	-	-
71	-	-	-	-

**Apêndice 05** - Resultados finais comparando as PCRs realizadas a partir de sangue coletado em papel filtro, com o sangue total coletado em tubo com EDTA.

---

---

<b>Casuística</b>	<b>Papel filtro</b>	<b>Sangue total</b>
01	+	+
02	+	+
03	-	-
04	+	+
05	+	+
06	+	+
07	+	+
08	+	+
09	-	-
10	+	+
11	+	+
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	-	-
24	-	-
25	+	+
26	+	+

---

---

<b>Casuística</b>	<b>Papel filtro</b>	<b>Sangue total</b>
27	-	-
28	-	-
29	-	-
30	-	-
31	-	-
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+
36	+	+
37	-	-
38	+	+
39	-	-
40	-	-
41	+	+
42	-	-
43	+	+
44	+	+
45	+	+
46	-	-
47	-	-
48	-	-
49	+	+
50	+	+
51	-	-
52	-	-
53	-	-
54	-	-

---

---

<b>Casuística</b>	<b>Papel filtro</b>	<b>Sangue total</b>
55	-	-
56	-	-
57	-	-
58	-	-
59	-	-
60	-	-
61	+	+
62	-	-
63	+	+
64	-	-
65	+	+
66	-	-
67	+	+
68	+	+
69	-	-
70	-	-
71	-	-

---

---

## Apêndice 06 - Consentimento pós-informação

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

**Título do Projeto:** Padronização da extração de DNA em papel filtro para a aplicação em amostras suspeitas de infecção perinatal pelo HIV -I.

- Pesquisadores: Tatiane Pedroso Kitamura, Dra. Sandra Cecília Botelho 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 padronização da técnica de extração de DNA em papel filtro, do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV -I), para sua detecção precoce. Sei que será realizada uma coleta de sangue periférico (por punção venosa, de 03 a 05 ml) e uma coleta em papel filtro (03 gotas de sangue em cada papel) 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:

\* Tatiane Pedroso Kitamura - (OXXII) 9753-8696 ou no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular - (OXXI9) 3788-7095, Dra. Sandra C. B. Costa - (OXXI9) 9605-3494, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa - (OXXI9) 3788-8936.

Campinas, .....de ..... de 2002.

\_\_\_\_\_  
Responsável ou tutor  
legal pelo paciente

\_\_\_\_\_  
Pesquisador