



Universidade Federal de Goiás

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Alexsander Augusto da Silveira

**Mapeamento Genético do HIV-1 e Análise de Resistências Associadas aos
Antirretrovirais em Pacientes do Centro - Oeste Brasileiro**

TESE DE DOUTORADO

Goiânia

2011

Alexsander Augusto da Silveira

**Mapeamento Genético do HIV-1 e Análise de Resistências
Associadas aos Antirretrovirais em Pacientes do Centro - Oeste
Brasileiro**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública.

Orientador: Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

**Goiânia
2011**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG

S587m	Silveira, Alexsander Augusto. Mapeamento genético do HIV-1 e análise de resistências associadas aos antirretrovirais em pacientes do Centro - Oeste brasileiro [manuscrito] / Alexsander Augusto da Silveira. - 2011. 86 f. : figs., tabs. Orientador: Prof^a. Dr^a. Mariane Martins de Araújo Stefani. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia e Medicina Tropical, 2011. Bibliografia. 1. HIV-1 – Mapeamento genético. 2. HIV-1 – Centro-Oeste – Brasil. I. Título. CDU: 616.98:578.828
-------	--

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Alexsander Augusto da Silveira

Orientador (a): Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Membros:

1. Prof. Dr. Marcelo Alves Soares

2. Dr. Gonzalo José Bello

3. Prof. Dr. André Kipnis

4. Prof. Dr. João Alves de Araújo Filho

5. Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

Data:15/03/2011

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Mariane Stefani, pela oportunidade do conhecimento e ensinamentos durante todos os anos de mestrado e doutorado;

A Profa. Dra. Ludimila Cardoso, por todo conhecimento passado e ajuda com os experimentos, a tese e os artigos;

A Mestre Roberta Lopes, pela ajuda com o projeto;

A banca de qualificação, Prof. Dr. André Kipnis e Profa. Dra. Regina Bringel, por todo auxílio e sugestões;

Aos amigos e colegas do Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase, Yanna, Janaína, Regiane, Lucas, Rodrigo, Adriana, Bruna, Emerith, Maurício, Keila e Mônica, pelo compartilhamento de informações, ajuda e momentos de descontração.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Origem da Aids e Diversificação do HIV	1
1.2 Estrutura e Características Genômicas do HIV-1.....	2
1.3 Ciclo de Replicação Viral.....	5
1.4 Variabilidade Genética do HIV-1	8
1.4.1 Classificação do HIV-1.....	8
1.4.2 Mecanismos Responsáveis pela Diversidade Genética do HIV-1.....	8
1.4.3 Formas Recombinantes do HIV-1.....	9
1.4.4 Diversidade Genotípica do HIV-1.....	10
1.4.4.1 No Mundo.....	10
1.4.4.2 No Brasil.....	12
1.4.4.3 No Centro Oeste.....	15
1.5 Medicamentos ARVs	16
1.6 Esquema Terapêutico com os ARVs.....	22
1.7 Resistência do HIV-1 aos ARVs	23
1.7.1 Resistência Transmitida aos IPs, ITRNs e ITRNNs.....	29
1.7.2 Resistência Secundária aos IPs, ITRNs e ITRNNs.....	32
1.7.3 Mutações de Resistência Associadas ao Enfuvirtida (T-20).....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivos Gerais.....	39
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4. ARTIGOS.....	40
5. CONCLUSÕES.....	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
7. ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Partícula Viral do HIV-1.....	3
Figura 2. Organização Genômica do HIV-1.....	4
Figura3. Ligação do Vírus X4 com o Receptor Secundário para o HIV-1.....	6
Figura 4. Ciclo Viral do HIV e Alvos dos Fármacos Antirretrovirais.....	7
Figura 5. Representação Esquemática da Estrutura da gp120 do Envelope do HIV-1.....	13
Figura 6. Mecanismo de Ação dos Inibidores da TR.....	18
Figura 7. Mecanismo de Ação dos Inibidores da PR.....	19
Figura 8. Mecanismo de Fusão do HIV-1 com a Célula Hospedeira e Ligação do Enfuvirtida a Molécula gp41.....	20
Figura 9. Mecanismo de ação dos Inibidores da Integrase (Raltegravir).....	21
Figura 10. Principais Mutações de Resistência Associadas aos ITRN, ITRN, IP e Enfuvirtida.....	27
Tabela 1. Tabela1. Medicamentos ARVs Disponíveis no Brasil.....	17

Artigo 1: HIV-1 molecular epidemiology in *pol* and *gp41* genes among naive patients from Mato Grosso do Sul state, central western brazil

Figure 1. Phylogenetic of HIV-1 isolates in the PR and RT fragments among HIV-1 isolates from Mato Grosso do Sul State.....	49
Figure 2. Map of recombinant breakpoints of HIV-1 isolates from Mato Grasso do Sul State.....	50

Artigo 2: Molecular characteristics of HIV-1 infection among prisoners from Central Western Brazil

Figure 1. Phylogenetic analyses of HIV-1 in PR and RT fragments among female patients from Campo Grande/MS.....	63
Figure 2. Phylogenetic analyses of HIV-1 in PR and RT fragments among male patients from Campo Grande/MS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC	-	Lamivudina
ABC	-	Abacavir
APV	-	Amprenavir
ARV	-	Antirretroviral
ATP	-	Adenosina Trifosfato
ATV	-	Atazanavir
AZT	-	Zidovudina
CD4	-	Grupamento de diferenciação 4
cDNA	-	DNA complementar
CPI	-	Complexo de pré-integração
CRF	-	Circulating Recombinant Forms (Formas Recombinantes Circulantes)
CYP450	-	Citocromo P-450
CPR	-	Calibração de Resistência Populacional
d4T	-	Estavudina
Da	-	Daltons
ddC	-	Zalcitabina
ddI	-	Didanosina
DLV	-	Delavirdina
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
DRV	-	Darunavir
EFV	-	Efavirenz
<i>env</i>	-	Gene que codifica o envelope do HIV
ETR	-	Etravirina
FDA	-	Food and Drug Administration
FPV	-	Fosamprenavir
FTC	-	Emtricitabina
<i>gag</i>	-	Gene do grupo antígeno do HIV
gp120	-	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 120 kD
gp160	-	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 160 kD
gp41	-	Glicoproteína do envelope do HIV-1 com massa molecular de 41 kD
HAART	-	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HIV	-	Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	-	Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2	-	Vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HR1	-	<i>Heptad repeat region 1</i>
HR2	-	<i>Heptad repeat region 2</i>
IAS-USA	-	<i>The International Aids Society</i>
IDV	-	Indinavir
IP	-	Inibidor da Protease
IN	-	Integrase
IP/r -	-	Inibidores de protease potencializados com ritonavir

Kb	-	Kilobase
kD	-	Kilodalton
Kg	-	Kilograma
jpHMM	-	<i>Jumping Profile Hidden Markov Model Program</i>
LACEN	-	Laboratório Central
LPV	-	Lopinavir
LTR	-	Regiões Terminais Longas
mg	-	Miligramas
mL	-	Mililitro
MVC	-	Maraviroc
<i>nef</i>	-	<i>Negative factor</i>
MDR	-	Multidroga-resistente
NFV	-	Nelfinavir
nm	-	Nanômetro
NRTI	-	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
NNRTI	-	Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo
ITRNN	-	Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo
ITRN	-	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo
ITRNt	-	Inibidor da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleotídeo – Tenofovir
NVP	-	Nevirapina
P11	-	Proteína/enzima que atua na replicação viral – Protease
P17	-	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 17 kD
P24	-	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 24 kD
P31	-	
P51	-	Proteína/enzima que atua na replicação viral do HIV-1 de 31 kD – Integrase
P6	-	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 6 kD
P66	-	Proteína/enzima que atua na replicação viral do HIV-1 de 66 kD – Transcriptase Reversa
P7	-	Proteína do nucleocapsídeo do HIV-1 de 7 kD
pb	-	Pares de base
PR	-	Protease
<i>pol</i>	-	Gene da polimerase do HIV
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
RGV	-	Raltegravir
RNA	-	Ácido ribonucléico
RTV	-	Ritonavir
SDRM	-	Monitoramento de Mutações de Resistência de Stanford
SNC	-	Sistema nervoso central
SQV	-	Saquinavir
<i>tat</i>	-	Trans-acting transcription transactivator
TDF	-	Tenofovir
TPV	-	Tipranavir
TR	-	Transcriptase reversa

URFs	-	Unique Recombinant Forms (Formas Recombinantes Únicas)
<i>vif</i>	-	<i>Virion Infectivity Factor</i>
<i>vpr</i>	-	<i>Viral Protein R</i>
<i>vpu</i>	-	<i>Viral Protein U</i>
<i>vpx</i>	-	<i>Viral Protein X</i>
ZDV	-	Zidovudina
T-20	-	Enfuvirtida

RESUMO

Introdução: Estudos locais sobre prevalência de mutações de resistência transmitida, secundária e diversidade genética do HIV-1 em diferentes populações, especialmente em um país continental como o Brasil que oferece tratamento gratuito com os antirretrovirais (ARVs), pode contribuir para uma melhor prevenção contra a infecção pelo HIV-1.

Objetivos: Investigar as mutações de resistência transmitida e secundária associadas aos ARVs e a diversidade genética do HIV-1 no Centro Oeste Brasileiro.

Métodos: Pacientes sem tratamento ARV foram recrutados em Campo Grande/MS em 2008 e 2010 (n=49) e 27 presidiários infectados com HIV-1 em terapia ARV foram envolvidos no estudo de Campo Grande/MS e Goiânia/Goiás recrutados nos anos de 2008/2009. Fragmentos dos genes da protease (PR), transcriptase reversa (TR) e *env* gp41 foram retrotranscritos a partir do RNA HIV-1 do plasma, sequenciados e genotipados após a reação de cadeia da polimerase (PCR). As mutações de resistência transmitida e secundária foram identificadas empregando a ferramenta de Calibração de Resistência Populacional (CPR) disponibilizada no site da Universidade de Stanford e pelo banco de dados do IAS-USA (*The International AIDS Society*). Os subtipos do vírus HIV-1 foram determinados e identificados empregando análises no banco de dados do REGA, pelo software jpHMM-HIV e por inferência filogenética.

Resultados: As análises filogenéticas dos fragmentos da PR e TR apresentaram que dois homens que fazem sexo com homens (4,1%; 2/49) apresentaram isolado do HIV-1 com a mutação de resistência V75M, um paciente apresentou um isolado com a mutação de reversão T215S e 4 apresentaram a mutação V179D/E. A maioria dos isolados de HIV-1 (65.3%, 32/49) foram identificados como subtipo B^{PR}B^{RT}, 10.2% subtipo C^{PR}C^{RT} e 8.2% subtipo F1^{PR}F1^{RT}. A recombinação intersubtipo foi de 16.3%. Sequências de isolados de HIV-1 na região *env* gp41 de 32/49 pacientes indicaram resistência transmitida para o T-20 em 3 pacientes: mutação L44M (n=2), mutação V38A (n=1). A prevalência do HIV-1 B foi de 84%, F1 foi de 12.5% (4/32) e do subtipo C foi de 3%. As mutações de resistência secundárias tiveram uma prevalência de 37% (10/27) entre os pacientes prisioneiros: 5/10 apresentaram mutações para os ITRNs+ITRNNs, 3/10 tinham mutações para os ITRNs, 2/10 eram multiresistentes aos ARVs. A prevalência do HIV-1 foi de 48% para o subtipo B e 11% de subtipo C. Padrões de recombinação complexos foram observados em 41% dos pacientes. Análises filogenéticas utilizando sequências locais indicaram isolados com altos valores sugestivos de transmissão intra-presídio no MS: duas mulheres usuárias de drogas injetáveis com subtipo C, 2 grupos de homens que fazem sexo com homens presidiários: um representado pelo subtipo B do HIV-1, outro pelo recombinante BF1.

Conclusão: Este estudo apresentou uma baixa prevalência de resistência transmitida associada com a mutação V75M para os ITRNs e uma moderada prevalência (9%) de resistência transmitida associada ao T-20. Investigações do monitoramento das taxas de transmissão de resistência transmitida nos genes *pol* são necessárias no Centro Oeste e estudos subsequentes podem indicar o impacto das mutações para o T-20 no risco da falha terapêutica. A alta prevalência de resistência secundária associada aos ARVs (37%) nos pacientes presidiários dos estados do MS e GO, as complexas formas recombinantes do HIV-1 e a possível transmissão intra-presídio observadas sugerem uma falta de boa adesão ao tratamento com os ARVs e acentuam a necessidade de estratégias de aconselhamento, prevenção e tratamento para a população presidiária por parte das instituições de saúde pública.

ABSTRACT

Background: Local studies about the prevalence of HIV-1 transmitted and secondary resistance mutations and HIV-1 diversity in different populations, especially in a continental country as Brazil that offer universal treatment with antiretroviral (ARV) can contribute to improved prevention against HIV-1 infection.

Objectives: To describe HIV-1 transmitted and secondary resistance mutations and genetic diversity in Central West Brazil.

Methods: Drug naïve patients were recruited in 2008 and 2010 in Campo Grande/MS (n=49) and 27 HIV-1 infected inmates from Campo Grande/MS and Goiania/Goias prisons were enrolled from 2008/2009. Protease (PR), partial reverse transcriptase (RT) and gp41 *env* genes fragments were retrotranscribed from plasma HIV-1 RNA, sequenced and genotyped after direct nested PCR. Primary and secondary drug resistance was analyzed employing Calibrated Population Resistance tool (CPR)/Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM)/International AIDS Society-USA (IAS-USA) list. HIV-1 subtypes were identified by REGA database, Jumping Profile Hidden Markov Model (jpHMM-HIV) software and phylogenetic inference.

Results: The phylogenetic analyzes in the PR and RT genes fragments showed that two men who have sex with men patients (4.1%; 2/49) had HIV-1 with V75M mutation, one patient had the revertant mutation T215S, four had V179D/E mutations. Most isolates (65.3%, 32/49) were subtype B^{PR}B^{RT}, 10.2% were subtype C^{PR}C^{RT}, 8.2% were subtype F1^{PR}F1^{RT}. Intersubtype recombinants were 16.3%. HIV-1 *env* gp41 sequences of 32/49 patients indicated primary resistance mutations to T-20 in 3 patients: L44M mutation (n=2), V38A mutation (n=1). HIV-1 subtype B were 84%, F1 were 12.5% (4/32) and subtype C was 3%. ARV resistance mutations were present in 37% (10/27) in prisoner patients: 5/10 presented NRTI+NNRTI mutations, 3/10 had NRTI mutations, 2/10 were multidrug resistant. HIV-1 subtype B represented 48%, subtype C were 11%. Complex recombinations patterns were observed in 41%. Phylogenetic analyses using local sequences indicated isolates with high support values suggestive of intraprison transmission in Mato Grosso do Sul: 2 females with subtype C reporting IVDU; 2 clusters among men who have sex with men patients: one represented by subtype B, another by BF1 recombinants from homosexual inmates.

Conclusions: This study identified a low prevalence (4.1%) of transmitted drug resistance associated with the V75M NRTI mutation and moderate prevalence (9%) of transmitted resistance to T-20. Investigations on transmitted resistance in *pol* gene are necessary and follow up studies may indicate the impact of moderate resistance mutations to T-20 on the failure risk of future salvage therapy in Central West Brazil. The high rate of secondary ARV resistance suggesting poor compliance to ARV, complex HIV-1 recombination patterns and the possible intraprison transmission clusters observed highlight the need of improved prevention, counseling and treatment strategies for prisoners by public health institutions.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Origem da Aids e Diversificação do HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) é causada por um retrovírus da família *Retroviridae*, do gênero *Lentivirus* denominado vírus da imunodeficiência humana (HIV). Após o relato dos primeiros casos de aids, no início da década de 80, o HIV foi isolado em pacientes com linfadenopatia (hiperplasia dos linfonodos) persistente (Clavel et al. 1986, Barre-Sinoussi et al. 1983, Gallo 1984). Em 1986, um segundo tipo de retrovírus associado à imunodeficiência humana foi encontrado em pacientes com aids na África Ocidental e foi denominado HIV-2 (Clavel et al. 1986). Os dois tipos de HIV (HIV-1 e HIV-2) possuem organização genômica, morfologia e tropismo celular semelhantes, porém diferem entre si, quanto à transmissibilidade, à virulência e à distribuição geográfica (Hu et al. 1996, Clavel et al. 1986). O HIV-1 apresenta maiores níveis de viremia e é o responsável pela pandemia da aids. O HIV-2 apresenta uma progressão lenta para a aids e casos esporádicos foram relatados na África, Europa, Ásia e Estados Unidos (Hu et al. 1996; Marlink et al. 1994).

Vários tipos de vírus da imunodeficiência simia (SIV) infectam diferentes espécies de primatas. A análise filogenética indica que provavelmente o HIV e o SIV derivam de um ancestral comum, o qual sofreu diversificação ao longo do tempo, até as formas circulantes dos HIVs atuais (Barre-Sinoussi 1996, Hahn et al. 2000). Estudos relacionados à origem do HIV apontam que os dois tipos de HIV foram introduzidos na espécie humana por episódios distintos de transmissão zoonótica. Os chimpanzés da subespécie *Pan troglodytes troglodytes* são considerados os reservatórios naturais do SIVcpz, vírus que originou o HIV-1 (Gao et al. 1999). Macacos da espécie *Cercocebus atys* (*Sooty mangabeys*) são considerados os reservatórios naturais do SIVsm, que se relaciona filogeneticamente com o HIV-2 (Gao et al. 1992).

Entre as prováveis causas que facilitaram a disseminação do HIV-1, podemos citar o desenvolvimento global e as modificações sociais, verificados após a 2ª Guerra Mundial (Perrin et al. 2003, Thomson et al. 2002). O aumento da densidade populacional e a mudança de hábitos sexuais, como a comercialização do sexo, foram as prováveis causas da disseminação e diversificação do HIV-1. As primeiras campanhas de vacinação em massa em países Africanos, com compartilhamento de seringas podem ter contribuído para a disseminação do HIV-1 (Thomson et al. 2002).

Estudos de sequenciamento e análise filogenética de diversos segmentos dos genes virais e do genoma completo têm fornecido evidências sobre o processo de diversificação

genética do HIV-1. A maioria dos estudos moleculares refere-se ao grupo M do HIV-1, devido a sua importância global, principalmente nas Américas e no Oeste Europeu (Barre-Sinoussi 1996, Sharp et al. 2000). A análise filogenética de uma amostra de plasma datada de 1959, de um marinheiro que vivia na atual República Democrática do Congo – África Central, indicou o caso mais antigo de infecção pelo HIV-1 na espécie humana (Zhu et al. 1998).

1.2 Estrutura e Características Genômicas do HIV-1

A partícula viral do HIV-1 (Figura 1) é esférica, composta de um envelope viral constituído de uma membrana composta de uma bicamada lipídica, na qual estão ancoradas as glicoproteínas de superfície gp120/gp41, possui uma matriz protéica (composta pela proteína p17), capsídeo viral (composto pela proteína p24), nucleocapsídeo (composto pelas proteínas p7/p9), duas fitas simples de RNA genômico (ambas de sentido positivo, com 9,2 Kb de extensão) e as enzimas virais transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e protease (PR) (Barre-Sinoussi et al. 1996).

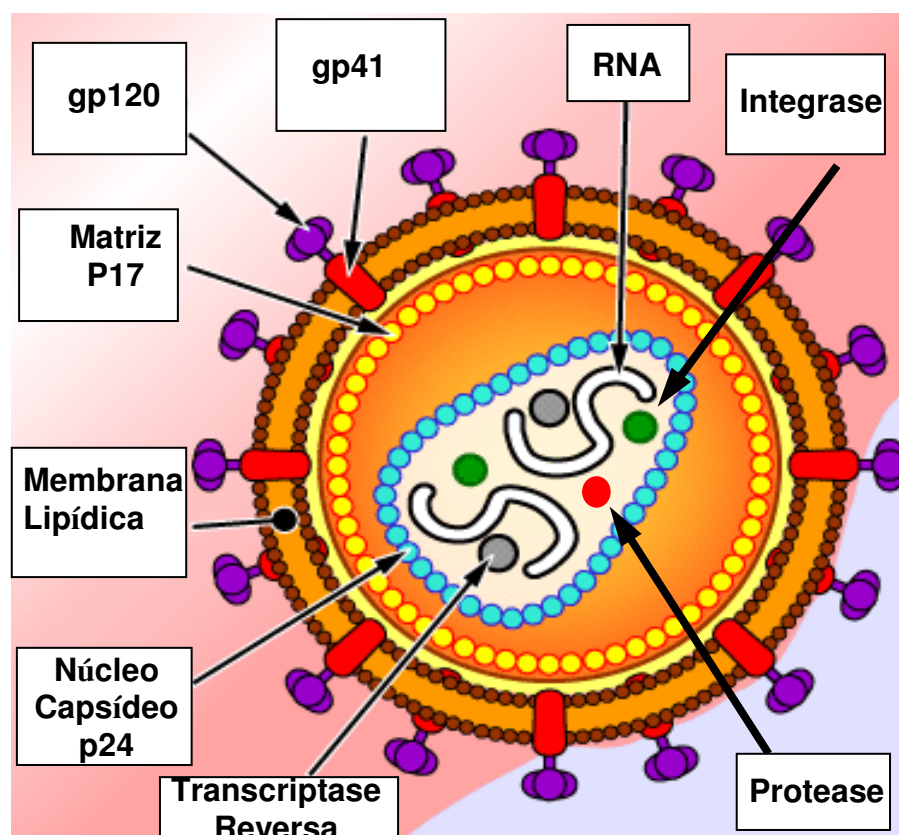


Figura 1. Partícula do HIV-1.
(Adaptada de www.crtv.com/cont/nouvelles)

O genoma do HIV-1 (Figura 2) é composto por três genes estruturais, os genes *gag*, *pol* e *env*. Além dos genes estruturais, o seu genoma contém um conjunto de genes acessórios e reguladores que controlam a replicação do vírus: os genes *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* e *nef*. De modo geral, estes genes controlam a replicação do HIV-1, seja ativando a transcrição do seu genoma (gene *tat*), promovendo a exportação do RNA mensageiro viral do núcleo para o citoplasma (gene *rev*) ou potencializando a infectividade dos vírions e a liberação dos mesmos para fora da célula infectada (*vif* e *vpu*) (Barre-Sinoussi 1996).

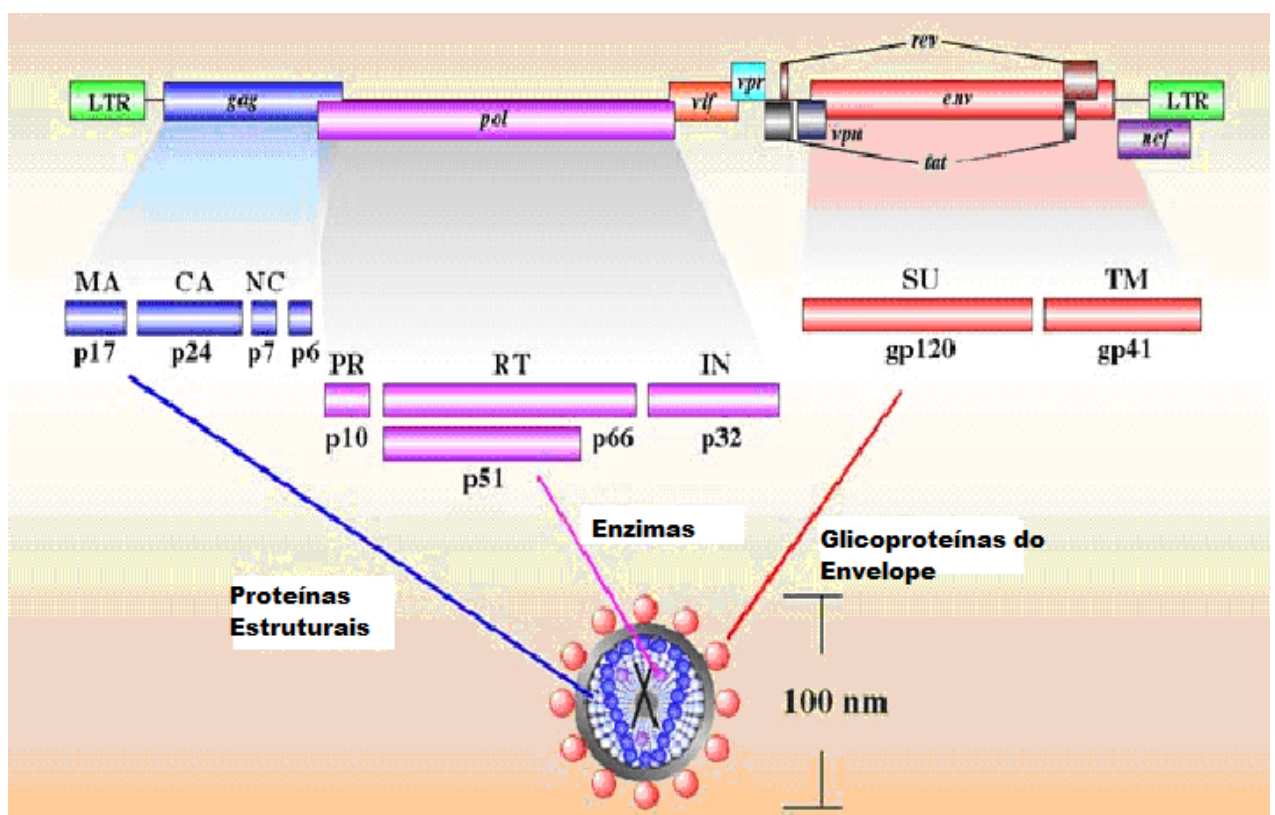


Figura 2. Organização genômica do HIV-1. (MA = matrix, CA = capsídeo, NC = núcleo capsídeo, PR = protease, RT = transcriptase reversa, IN = integrase, SU = superfície, TM = região transmembrânica).

(Adaptada de www.stanford.edu/goup/eqüe/retro/HIV.html)

As regiões de repetições terminais longas (LTRs) estão localizadas nas duas extremidades do genoma dos retrovírus e permitem a integração das moléculas de DNA virais produzidas por transcrição reversa no genoma das células do hospedeiro (provírus). O gene *pol* codifica as enzimas TR, PR e IN, estas enzimas são produzidas como uma poliproteína *gag-pol* precursora que posteriormente é processada e clivada pela PR. O gene *gag* codifica as proteínas que compõem o capsídeo viral, uma proteína precursora de 55 quilodaltons (kDa) a qual, durante a replicação do vírus, é clivada pela protease viral, dando origem às proteínas p24, p17, p7 e p6 (Figura 2). A proteína p17 compõe a matriz viral e é encontrada logo abaixo do seu envelope. A proteína p24 forma o capsídeo, no interior do qual estão localizadas as duas fitas simples de RNA. As proteínas p7 e p6 estão associadas ao material genético do vírus. Os genes *gag* e *pol* são mais conservados que o gene *env* (Barre – Sinoussi 1996).

No HIV-1, o gene *env* codifica uma glicoproteína precursora de 160 kDa, denominada de gp160, que é clivada por enzimas celulares em gp120 e gp41, associadas não-covalentemente e encontram-se inseridas no envelope da partícula viral, mediante a gp41. A gp120 apresenta-se exposta na membrana ancorada na gp41 em uma forma de trímero. Como para outros vírus, as glicoproteínas do envelope representam as estruturas mais externas da partícula viral e são os principais alvos da resposta imune do hospedeiro. Consequentemente, estas moléculas, e naturalmente o gene *env* que as codificam, se caracterizam por uma grande variabilidade (Cao & Walker 2000).

Estudos de sequenciamento da estrutura primária e análise das estruturas secundária e terciária indicam que a gp120 pode ser subdividida em regiões constantes e em regiões de grande variabilidade, as quais codificam importantes epítomos reconhecidos por anticorpos neutralizantes e por linfócitos T citotóxicos (Cao & Walker 2000, Barre-Sinoussi 1996). As regiões constantes são denominadas de C1 a C6, enquanto as regiões variáveis foram designadas de V1 a V5 (Modrow et al. 1987, Willey et al. 1986, Starcich et al. 1986).

1.3 Ciclo de Replicação do HIV-1

O receptor primário para o HIV-1 é a molécula CD4, que promove uma modificação conformacional na molécula gp120, favorecendo consequentemente sua ligação com a molécula co-receptora que podem ser os receptores para quimiocinas, sendo os mais importantes os receptores CCR5 e CXCR4 (Cao and Walker 2000). Outros receptores para quimiocinas, como

CCR1, CCR2b, CCR3, CCR8, dentre outros, também podem funcionar como co-receptores e participar do processo de infecção pela célula alvo (Levy 1996, Rucker et al. 1996).

De acordo com o tropismo das partículas virais para os receptores de quimiocinas CCR5, presentes nos macrófagos, células dendríticas e CXCR4 presentes nos linfócitos T CD4⁺, os vírus são classificados em R5 com tropismo para o co-receptor de quimiocina CCR5, ou X4 com tropismo para o receptor secundário CXCR4 (Figura 3). Além disso, os vírus com duplo tropismo para CCR5 e CXCR4 são denominados de vírus R5X4 (Levy 1996, Cilliers & Morris 2002).

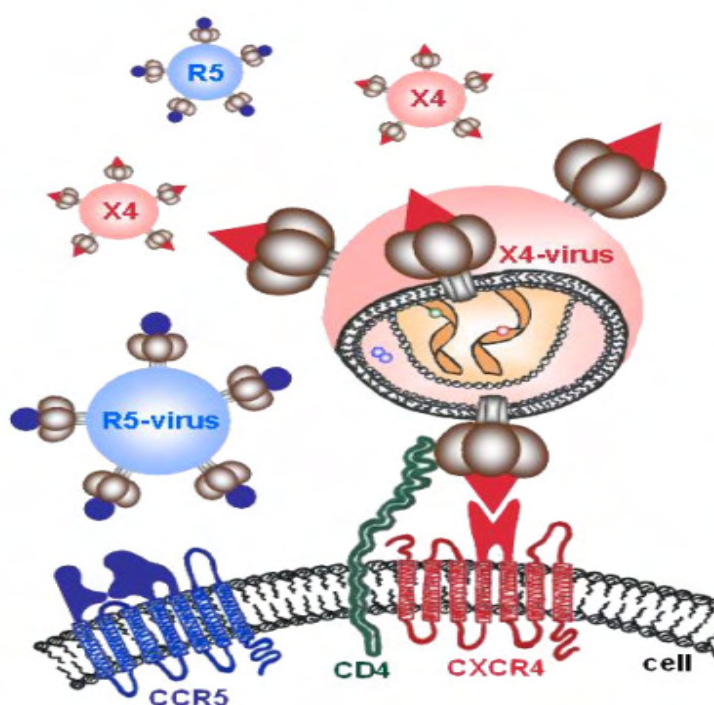


Figura 3. Ligação do Vírus X4 com o Receptor Secundário para o HIV-1.

(Adaptada de www.georg-speyer-haus.de/agdietrich/research/rd_fig2.htm)

Após a ligação aos receptores primário e secundário pelo HIV, a glicoproteína hidrofóbica gp41 é exposta, o que permite a ativação de peptídeos de fusão e consequente acoplamento entre o envoltório do vírus com a membrana da célula hospedeira. A ancoragem da gp41 à membrana celular e a fusão vírus-célula alvo é realizada pela ação de um resíduo

peptídico N-terminal hidrofóbico rico em glicina presente nesta molécula de envelope (Chan et al. 1998, Broder 1999).

Após a liberação do capsídeo viral para o interior da célula, tem se início a desintegração do mesmo, com a liberação do conteúdo do nucleocapsídeo no citoplasma da célula hospedeira. Conforme esquema da figura 4, sob ação da enzima TR, o RNA do vírus é transcrito em DNA no interior da célula hospedeira, é gerado um híbrido RNA-cDNA, com a formação posterior de uma dupla fita de DNA complementar (cDNA) (Cohen et al. 1996). A incorporação deste cDNA ao DNA da célula hospedeira ocorre com o auxílio da enzima viral IN. Este processo é compreendido por várias etapas, como a ação endonucleolítica da IN e da proteína *vpr*, translocação da fita de DNA, desintegração e reestruturação dos nucleopóros, o que resulta na formação do DNA proviral (Katz & Skalka 1994).

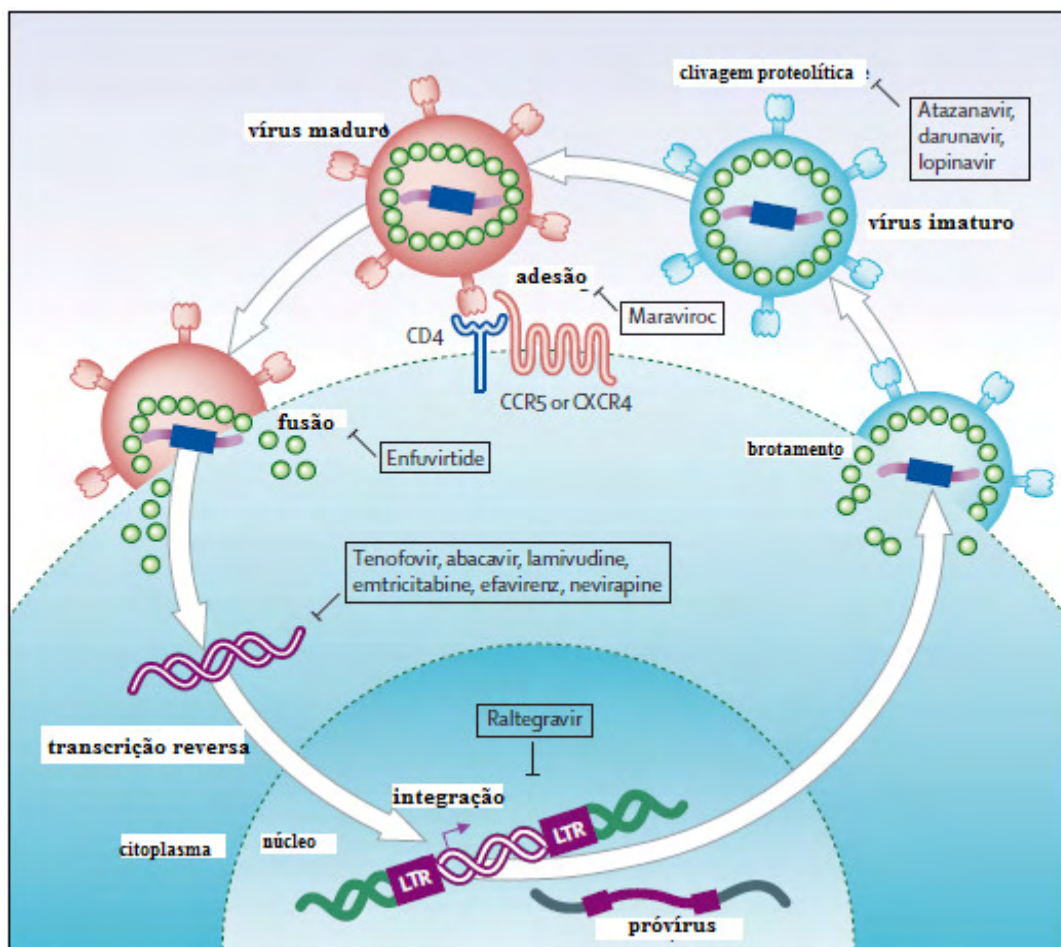


Figura 4. Ciclo Viral do HIV e Alvos dos Fármacos Antirretrovirais.

(Adaptada de Volberding & Deeks 2010)

A célula infectada pelo HIV-1, contendo o DNA proviral, ao ser ativada principalmente pela citocina de proliferação IL-2 é capaz de produzir RNAs genômicos e mensageiros do HIV-1. A proteína *tat* aumenta o processo de transcrição juntamente com a RNA polimerase e permite que moléculas maiores sejam processadas (Aboul-ela et al. 1995). Os RNAs virais transcritos são transportados para o citoplasma onde serão traduzidos e servirão de molde para produção de proteínas virais que formarão novos vírions (Hope 1997). A tradução citoplasmática fornece as proteínas *vif*, *vpr* e *nef*, além, da poliproteína *gag-pol*. Tem início a montagem dos vírus (Vaishnav & Wong-Staal 1991). Os vírions passam por um processo morfológico conhecido como maturação, que consiste na clivagem das poliproteínas *gag-pol* pela PR viral, gerando as enzimas e estruturas virais do capsídeo (Gonda et al. 1985). Após esta etapa o complexo de nucleoproteína é então delimitado em um envelope e por um processo de brotamento da membrana plasmática ocorre a formação de novas partículas virais, prontas para infectar novas células alvo (Vaishnav & Wong-Staal 1991, Barre-Sinoussi 1996, Freed 2001).

1.4 Variabilidade Genética do HIV-1

1.4.1 Classificação do HIV-1

Uma das características marcantes do HIV-1 é a sua extensa diversidade genética. De acordo com as sequências de nucleotídeos nos genes ou de aminoácidos nas proteínas das regiões do genoma, o HIV-1 pode ser classificado em quatro grupos filogeneticamente distintos: o grupo M “major”, Grupo O “outlier” e o grupo N “non-M, non-O” (Thomson et al. 2002). Recentemente foi identificado um novo grupo do vírus HIV em uma paciente da República de Camarões e este está relacionado com o vírus símio da imunodeficiência em gorilas (SIVgor). O novo vírus não demonstra nenhuma evidência de recombinação com outras cepas do HIV-1 e recebeu a designação HIV-1 grupo P (Plantier et al. 2009). O grupo M do HIV-1 possui nove subtipos denominados A, B, C, D, F, G, H, J, K e seis sub-subtipos denominados A1, A2, A3, A4, F1 e F2. Os subtipos do HIV-1, do grupo M, são os responsáveis pela epidemia de aids no mundo (Nájera et al. 2002, Thomson et al. 2002, Vidal et al. 2006). O grupo O do HIV-1 tem uma maior prevalência na África Central e casos isolados na Europa e Américas foram descritos. O vírus do grupo N foi identificado na República de Camarões, com alguns casos

esporádicos em países da Europa e Américas, em indivíduos com vínculo epidemiológico com algum país do continente Africano (Simon et al. 1998, Robertson et al. 2000).

1.4.2 Mecanismos Responsáveis pela Diversidade Genética do HIV-1

Entre as principais causas da diversidade genética do HIV-1, podemos citar o fato da enzima TR não possuir capacidade de correção das fitas recém originadas (Domingo et al. 1998). Assim, durante o processo de replicação viral, pode ocorrer uma falha na transcrição, resultando na incorporação de nucleotídeos e com geração de formas genéticas diversas e complexas (Domingo et al. 1997, Domingo et al. 1998). Outro mecanismo que pode contribuir para a diversificação genética é a elevada capacidade replicativa do HIV-1, que gera em torno de 10^{10} partículas virais por dia (Ho et al. 1995, Markowitz et al. 2003).

Além dos erros na incorporação de nucleotídeos mediados pela TR e da alta taxa de replicação viral, outro processo que pode contribuir para a diversidade, é a recombinação genética que ocorre frequentemente nos retrovírus (Nájera et al. 2002). A recombinação genética entre diferentes subtipos ocorre quando uma célula hospedeira é infectada simultaneamente por partículas virais geneticamente distintas (co-infecção). Além da co-infecção, a superinfecção pode ocorrer com infecções sequenciais, envolvendo pelo menos dois eventos de transmissão próximos, por vírus geneticamente distintos. Em casos de co-infecção ou superinfecção com vírus geneticamente distintos, durante a transcrição reversa, a enzima TR pode “saltar” de uma fita de RNA de um vírus para outra fita de RNA do outro vírus geneticamente distinto. Este processo favorece a produção de genomas mosaicos e heterozigotos (Hu & Temin 1990, Nájera et al. 2002).

Como consequência da elevada taxa de erros da TR, genomas mutantes podem ser gerados durante a replicação dos vírus RNAs. Desta forma, as populações virais que se replicam em um hospedeiro são extremamente dinâmicas e heterogêneas, compostas de variantes relacionadas, porém não idênticas, conhecidas como “quasispecies” virais (Domingo et al. 1998).

1.4.3 Formas Recombinantes do HIV-1

Recombinações genéticas fazem parte do mecanismo normal de replicação dos retrovírus e desempenham importante papel na diversidade viral. O potencial de variabilidade genética,

devido as recombinações, confere aos retrovírus a capacidade de responder rapidamente a pressões seletivas, de base imunológica ou farmacológica (Tumas et al. 2001).

No HIV-1, as recombinações podem ocorrer entre diferentes vírus de um mesmo subtipo (recombinação intrasubtipo), entre vírus de diferentes subtipos (recombinação intersubtipo) ou ainda entre diferentes grupos (recombinação intergrupo) (Nájera et al. 2002).

Eventos de recombinação entre variantes genéticas distintas, infectando uma única célula de um indivíduo têm originado diferentes CRFs “Circulating Recombinant Forms – Formas Recombinantes Circulantes” ou URFs “ Unique Recombinant Forms – Formas Recombinantes Únicas” . Até Fevereiro de 2012, cinquenta e um “CRFs” capazes de gerar micro e macroepidemias foram identificados (Los Alamos 2012). Existem diversos vírus do HIV-1 definidos como URFs, vírus mosaicos que não constituem classe ou relação filogenética estabelecida que foram encontrados em um único indivíduo ou em mais de um indivíduo com vínculo epidemiológico. Formas recombinantes do HIV-1, CRFs e URFs, vêm ocupando papel cada vez mais importante na epidemia da aids em todo mundo. No momento, considera-se que é pouco provável que novas variantes genéticas, não híbridas, sejam descritas (Nájera et al. 2002, Los Alamos 2011).

Para identificar novas CRFs é necessário que as sequências completas ou quase completas dos genomas dos HIV-1 sejam comparadas filogeneticamente com subtipos distintos em diferentes regiões do genoma. Além disto, sequências idênticas de nucleotídeos do HIV-1 recombinante e os pontos de recombinações devem ser identificados, em pelo menos, três indivíduos sem vínculo epidemiológico (Blackard et al. 2002, Los Alamos 2011). Desta forma, cada CRF é definida como uma classe filogenética bem estabelecida, favorecendo a disseminação da epidemia da aids em diferentes regiões do mundo (Robertson et al. 2000).

1.4.4 Diversidade Genotípica do HIV-1

1.4.4.1 No Mundo

Em uma escala global, as formas genéticas do HIV-1 mais prevalentes são o subtipo C, o subtipo A, B e o CRF02_AG (Osmanov et al. 2002, Collinson-Streng et al. 2009). A maior diversidade de sequências de HIV-1 é observada em países do Continente Africano. Na África sub-Saariana estão presentes todos os variantes do vírus (incluindo os grupos O e N), sendo que a maior variedade de subtipos do grupo M é encontrada na África Central (Camarões, Gabão, República Democrática do Congo). A presença de todos os subtipos do grupo M e de diversas

formas recombinantes na África Central corrobora a hipótese de que a introdução e diversificação inicial do HIV-1, na espécie humana, ocorreram nesta região (Vidal et al. 2000). Apesar da grande variabilidade observada entre os isolados de HIV-1 Africanos, em quase toda a África sub-Saariana a epidemia é dominada pelo subtipo C e subtipo A (incluindo a forma recombinante CRF02_AG) (Janssens et al. 1997, Osmanov et al. 2002).

Nos países do continente Asiático e da Europa Oriental, de modo geral, os casos de infecção pelo HIV-1, adquiridos por transmissão homossexual são atribuídos principalmente ao subtipo B, enquanto as infecções na população heterossexual estão relacionadas a diversos subtipos, como A, C, D, F e G (Bobkov et al. 1996). Vírus recombinantes (CRF07_BC, CRF08_BC) foram encontrados na China em usuários de drogas injetáveis. Na Índia observa-se o predomínio do HIV-1 subtipo C e na Tailândia, no Japão, na Coreia e na China a CRF01_AE, foi introduzida por profissionais do sexo, no final da década de 80. Mais tarde a forma recombinante CRF01_AE foi observada em usuários de drogas injetáveis infectados (Bobkov et al. 1998, Mayer et al. 1998).

A epidemia pelo HIV-1 no Continente Americano e Europa Ocidental foi introduzida pelo subtipo B. Outros subtipos do HIV-1, como C, D, F e a CRF01_AE, provavelmente foram introduzidos nestas regiões através do contato sexual por turistas, imigrantes e usuários de drogas (Weidle et al. 2000, Thomson & Najera 2001). Na Europa Ocidental quase todos os subtipos são encontrados, mas as variantes não-B, como os subtipos C, A e CRF01_AE foram identificadas principalmente em imigrantes com conexão Africana (Esteves et al. 2002). Na Espanha estudo analisando plasma de 2299 pacientes mostrou em 189 destes indivíduos subtipos não B. Os subtipos específicos identificados foram CRF02_AG (41,8%), subtipo G (17,5%), subtipo C (6,4%), CRF01_AE (5,8%), subtipo D (4,8%), F1 (4,6%), CRF12_BF (4,8%) e CRF14_BG (4,6%) (De Mendoza et al. 2009). Estudo Nacional de Monitoramento ao HIV-1 realizado na França em 415 pacientes com vírus sequenciados para a região da PR e TR do genoma do HIV-1 mostrou a porcentagem de 25,5 de subtipos não B. A ampla diversidade molecular mostrou os subtipos A, C, D, F, G, J, além das formas recombinantes CRF01_AE, CRF02_AG, CRF05, CRF06, CRF09, CRF11, CRF13, CRF18, CRF27 e URF_BCs (Chaix et al. 2009).

Nos Estados Unidos, além do HIV-1 subtipo B, também circulam os subtipos A, D, F e vírus CRF01_AE (Weidle et al. 2000). Estudo atual nos Estados Unidos analisou os genes da PR e TR em 1997 indivíduos diagnosticados em 2006 e mostrou a prevalência do subtipo B ocorrendo em 96,2% dos indivíduos estudados. O subtipo C ocorreu em 1,3% dos pacientes, seguido do CRF02_AG (1,1%) e o subtipo A em 0,5% dos pacientes. Outras classes, como

subtipo D e G, CRF01_AE, CRF10_CD, CRF12_BF, CRF22_0121 foram demonstrados em menos de 0,5% dos pacientes. Foram totalizados no final 3,8% de subtipos não B circulantes nos Estados Unidos (Wheeler et al. 2010).

Nos países da América do Sul, como Argentina, Uruguai, Venezuela e Bolívia observa-se o predomínio do subtipo B e a CRF12_BF (Russell et al. 2000, Thomson et al. 2000, Carr et al. 2001). Recente estudo descreve um novo CRF38_BF1 circulante no Uruguai e mostra que este isolado ganha importância na epidemia deste país (Ruchansky et al. 2009). Outro atual estudo da história da reconstrução evolutiva dos recombinantes CRF12_BF e CRF_38BF corrobora a participação dos recombinantes BF1 nos países da América do Sul, principalmente na Argentina e Uruguai (Bello et al. 2010).

1.4.4.2 No Brasil

Os primeiros estudos sobre epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil foram realizados no início da década de 90 e tinham como alvo a identificação da diversidade na região de envelope viral (alça V3 da gp120). Esses estudos mostraram que provavelmente a epidemia no Brasil tenha se originado pela introdução do subtipo B, atribuindo-se a este “efeito fundador” no Sudeste brasileiro, mais especificamente nos estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, sugerindo que o subtipo B provavelmente foi o primeiro subtipo a ser introduzido no país, encontrou condições adequadas nos hospedeiros e a partir daí foi amplamente disseminado pelas vias sexual, perinatal e parenteral (Galvao-Castro et al. 1996, Couto-Fernandez et al. 1992). Estudos genotípicos do HIV-1 realizados principalmente em pacientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil revelaram o predomínio do subtipo B, seguido dos subtipos F, recombinantes B/F e subtipo C, que é mais freqüente na região Sul do país. Formas recombinantes B/D e mais recentemente alguns casos de infecção pelo HIV-1 subtipo D foram descritos (Couto-Fernandez et al. 2006, Tanuri et al. 1999, Soares et al. 2003b, Guimaraes et al. 2002a, Guimarães et al. 2002b, Morgado et al. 2002).

Uma sequência de aminoácidos particular no topo da alça V3 do gene *env* do subtipo B foi descrita no Brasil. Nessas variantes o aminoácido prolina, encontrado na segunda posição do motivo GPGR, extremamente conservado nos diferentes subtipos que circulam na epidemia mundial, está substituído pelo triptofano gerando o padrão de assinatura GWGR (Figura 5) (Potts et al. 1993, Morgado et al. 1994).

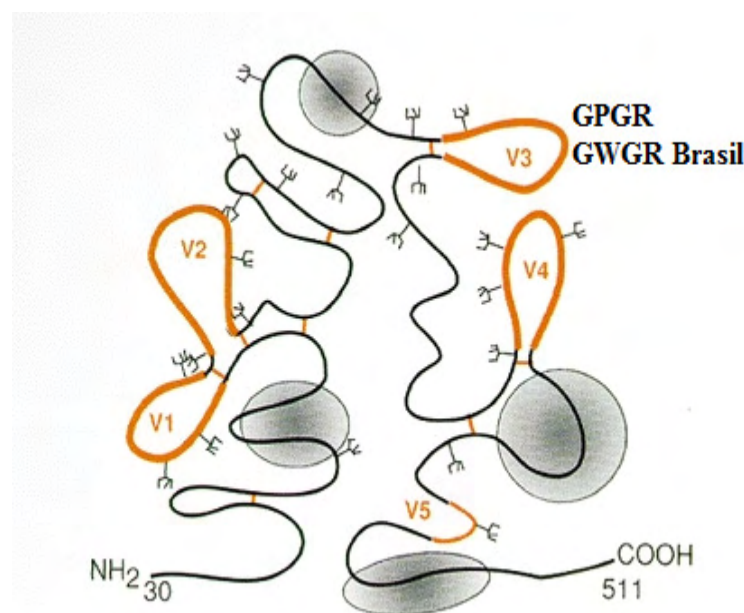


Figura 5. Representação Esquemática da Estrutura da gp120 do HIV-1.

(Adaptada de www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19393/)

Em um estudo realizado em isolados de 31 pacientes de Manaus-AM, o sequenciamento da região de envelope C2V3 indicou circulação dos subtipos B, subtipo F e recombinantes B/F (Vicente et al. 2000). Outro estudo envolveu 89 pacientes atendidos na Unidade de Referência para Doenças Infecciosas e Parasitárias Especiais em Belém-Pará e 37 indivíduos recrutados no Laboratório Central (LACEN) de Macapá-Amapá entre os anos de 1998 e 2002. As regiões do genoma analisadas foram a C2V3C3 do envelope do viral e parte da PR do gene *pol*. Em relação ao gene *env* analisado em pacientes de Belém 4 subtipos foram descritos: subtipo B (88,3%), subtipo F (8,3%), subtipo D (1,7%) e C (1,7%). Os vírus HIV-1 provenientes de pacientes do Macapá todos eram subtipo B na região do envelope. Em relação ao gene da PR em pacientes atendidos na cidade de Belém os subtipos encontrados foram subtipo B (88,3%), subtipo F (9,3%), D (1,2%) e CRF02_AG (1,2%). Em Macapá os subtipos eram subtipo B e F do HIV-1. Neste estudo 6 amostras apresentaram as formas mosaicas $B^{env}F^{pr}$ (1,6%), $F^{env}B^{pr}$ (1,6%), $C^{env}B^{pr}$ (0,85%), $B^{env}D^{pr}$ (0,85%). O trabalho apresentou o primeiro CRF02_AG encontrado na região Norte do Brasil e as análises filogenéticas mostraram que a nova forma recombinante circulante no país apresenta um alto limiar de similaridade com vírus isolados de países africanos disponíveis no *GenBank* (Machado et al. 2009).

Estudos em mães infectadas com HIV-1, da cidade portuária de Rio Grande – RS, mostraram a prevalência do subtipo C (70%), pelo sequenciamento da região *env* do genoma do

HIV-1 (Martinez et al. 2006). Estudo anterior com 120 amostras, também analisando a região *env* do genoma do HIV-1, de pacientes do Sul e Sudeste do país, mostrava a porcentagem de 22% do subtipo C (Soares et al. 2003b). Estes estudos têm indicado o aumento da prevalência do subtipo C nas regiões sul e sudeste do país.

Amostras de HIV-1 coletadas entre 1992 a 2001, em vários estados brasileiros, foram sequenciadas parcialmente em suas regiões da TR e da PR e comparadas com outras sequências de amostras coletadas na África do Sul entre 1990 a 2002. As análises estatísticas deste estudo mostraram que o subtipo C vem se disseminando mais rapidamente do que o subtipo B no Brasil ou em relação ao subtipo C da África do Sul. O subtipo C apresenta uma maior variabilidade no Brasil em relação à África do Sul, uma vez que o tratamento com os antirretrovirais (ARVs) causa uma pressão seletiva nestas cepas circulantes no Sul e Sudeste do país (Salemi et al. 2005).

No ano de 2006 um novo recombinante envolvendo os HIV-1 B e C (CRF31_BC) foi demonstrado no sul do Brasil. Cinco isolados foram estudados nos genes da PR, TR e parte da IN, todos estes apresentaram o mesmo tipo padrão de recombinação entre os subtipos B e C (Santos et al. 2006). Outra pesquisa demonstrou pela primeira vez, por análises filogenéticas Bayesianas, os genomas quase completos dos CRF31_BC encontrados no sul do país e comprovou que algumas amostras antes determinadas como CRFs, na verdade apresentam estruturas mosaicas complexas melhor caracterizadas como URFs_BC. No Brasil ainda faltam estudos de análise quase completa ou completa do genoma do HIV-1, dessa forma, esforços nacionais são necessários para aumentar os números de sequências completas em todas as regiões do país para melhor e real compreensão da prevalência, disseminação e dinâmica evolutiva dos subtipos, CRFs e URFs do vírus HIV-1 circulantes no país (Passaes et al. 2009).

As formas recombinantes envolvendo os subtipos B e F tomam cada vez mais espaço no cenário molecular da diversidade do HIV-1 no Brasil. O primeiro caso de recombinação intersubtipo do HIV-1 foi descrito no Brasil, na cidade do Rio de Janeiro, em 1994, compreendendo a forma recombinante BF identificada em dois parceiros sexuais (Sabino et al. 1994). Uma frequência aumentada de recombinantes intersubtipos do HIV-1, especialmente BF tem sido descrita em estudos subsequentes (Guimarães et al. 2002a, Thomson et al. 2000, Carr et al. 2001, Bongertz et al. 2002, De Sa Filho et al. 2006).

Estudo realizado com 11 amostras recombinantes BF provenientes da cidade de Santos /SP relatou a presença de dois novos CRFs (CRF28_BF e CRF29_BF) no Brasil. O sequenciamento completo do genoma viral e a análise filogenética dessas amostras indicaram a presença de 2 novas CRFs, uma delas denominada CRF28_BF circulante na região de Santos. A

outra nova CRF identificada foi denominada CRF29_BF e foi encontrada em pacientes da cidade de Santos/ SP e Rio de Janeiro (De Sa Filho et al. 2006). Em 2008 outro estudo realizado no Rio de Janeiro analisou 1504 sequências de nucleotídeos dos genes *pol* do HIV-1 obtidas entre os anos de 1998 a 2005 de pacientes HIV-1 positivos. O estudo apresentou outras 2 novas CRFs na região sudeste do país (Guimarães et al. 2008). A descoberta de quatro formas recombinantes circulantes brasileiras (CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF e CRF40_BF) claramente indica que a epidemia pelo HIV-1 no país é bem mais complexa do que se pensava e parecem desempenhar um importante papel na epidemia de aids no Brasil (De Sa Filho et al. 2006, Sanabani et al. 2006). Outro estudo selecionou 14 amostras coletadas em indivíduos da cidade de São Paulo e o sequenciamento completo do genoma viral destas 14 amostras indicou 8 novas formas recombinantes envolvendo os subtipos B e F (Sanabani et al. 2006).

Sanabani e colaboradores em Junho de 2009 analisaram 36 amostras subtipos F1 no gene *pol* provenientes de pacientes HIV-1 positivos de São Paulo. Neste estudo que demonstra o genoma quase completo destas 36 sequências apenas uma amostra era verdadeiramente subtipo F1, o restante das sequências apresentou um perfil mosaico BF1 e F1C. A presença destas CRFs na epidemia do Brasil indica a complexidade genética do HIV-1 circulante, o que demonstra um intenso processo de recombinação genética que ocorre no país. Estes estudos indicam diversas populações de HIV-1 recombinantes derivadas dos subtipos B e F (de SaFilho 2006, Sanabani et al. 2006).

1.4.4.3 No Centro - Oeste

Estudo no Centro – Oeste Brasileiro realizou o sequenciamento automatizado dos fragmentos da TR e PR de 45 amostras provenientes do Distrito Federal mostrou que a maioria das amostras agrupou-se filogeneticamente com sequências do subtipo B (96%) e 4% apresentaram o padrão recombinante B/F (Cerqueira et al. 2004). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa analisou os genes *pol* e *env* para determinar a variabilidade no Centro – Oeste do Brasil. Quarenta e um pacientes infectados pelo HIV-1 foram recrutados. O sequenciamento dos fragmentos da PR, TR e C2C3/*env* mostrou uma alta prevalência do subtipo B (95,1%), seguido pelas formas recombinantes B/F (4,9%) (Véras et al. 2007).

O mapeamento genético molecular do HIV-1 em pacientes da região Centro – Oeste, mais especificamente no estado de Goiás, vem sendo realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase do IPTSP/UFG desde 2000 (Stefani et al.

2000). Em 2007 o grupo mediante a utilização do Ensaio de Mobilidade do Heteroduplex (HMA) para as regiões de *env* e *gag* do genoma do HIV-1, mostrou a diversidade genética do HIV-1 avaliada em 406 pacientes HIV-1 positivos das três regiões do Centro – Oeste Brasileiro, como Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Os resultados deste estudo indicaram predominância do subtipo B, seguido pelo subtipo F e isolados com subtipos discordantes B/F1, nos genes *env* e *gag* do HIV-1. A pesquisa também indicou a introdução e circulação do HIV-1 subtipo C, na região Centro – Oeste do país. Além dos isolados com subtipos discordantes B/F, outros isolados com subtipos discordantes em *env* e *gag* foram detectados: B/D, F/B, B/C (Stefani et al. 2007). Cardoso e colaboradores em 2009 apresentaram a variabilidade genética do HIV-1 em 103 isolados de pacientes de Goiânia/Goiás, destes 82,5% apresentaram vírus subtipo B, 6,2% eram subtipos F1, 3,1% eram subtipo C e 8,2% apresentaram vírus com subtipos discordantes $F1^{PR}B^{TR}$, $B^{PR}F1^{TR}$ e $F1^{PR}CB^{TR}$. Outro estudo do mesmo grupo apresentou a diversidade genética do HIV-1 em 77 isolados de gestantes provenientes do estado de Goiás. Destas 67,5% dos isolados foram identificados como subtipo B, 11,7% subtipo F1 e 3,9 % subtipo C quando analisados para as regiões da PR/TR do genoma do HIV-1. Foram identificados isolados com as formas recombinantes do HIV-1: BF1 em 10,4% e a F1B em 6,5% das pacientes (Cardoso et al, 2010).

1.5 Medicamentos ARVs

Atualmente as opções terapêuticas para infecção pelo HIV incluem os inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleosídicos (ITRNs) e inibidor da transcriptase reversa análogo nucleotídico (ITRNT), os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídicos (ITRNN), os inibidores da protease (IP), mais recentemente os inibidores de entrada e os inibidores da integrase. Os medicamentos ITRNs, ITRNNs e IPs possuem uma alta solubilidade, dessa forma atravessam facilmente as membranas lipídicas (Nolan & Mallal 2003).

Os ITRNs são fármacos estruturalmente muito semelhantes aos nucleosídeos verdadeiros (adenina, guanina, citosina e timidina). Uma vez no interior da célula estes fármacos já monofosfatados ficarão trifosforilados, ou seja, incorporam 2 moléculas de fósforo e adquirem suas formas ativas. A diferença entre os análogos nucleotídeos e os análogos nucleosídicos, consiste no fato de que os primeiros já vêm pré-fosforilados, o que exige uma etapa a menos de fosforilação em relação aos ITRNs. Durante o processo da transcrição reversa,

os ITRNs vão de forma competitiva substituir os nucleosídeos verdadeiros. Assim, durante a transcrição reversa a enzima TR pode, ao invés de selecionar o nucleosídeo verdadeiro, acoplar no final da cadeia a molécula do ARV, o que impede o alongamento da fita de DNA complementar. Estes medicamentos também podem interagir diretamente no sítio ativo da enzima TR, o que impossibilita a atuação da mesma na transcrição de RNA viral em DNA complementar. Os ITRNNs inibem a replicação viral por se ligarem a uma bolsa hidrofóbica no sítio ativo da enzima TR ou próximo a ela, o que leva a uma alteração conformacional na enzima e sua consequente inativação (Vernazza et al. 2000, Nolan & Mallal 2003) (Figura 6). A tabela 1 mostra os fármacos ARVs disponíveis no Brasil.

Tabela1. Medicamentos ARVs Diponíveis no Brasil

ITRNs	ITRNNs	IPs	Inibidor de Fusão	Inibidor da IN
Abacavir (ABC) Didanosina (ddI) Estavudina (d4T) Lamivudina (3TC) Tenofovir (TDF) Zidovudina (AZT)	Efavirenz (EFV) Nevirapina (NVP) Etravirina (ETR)	Amprenavir (APV) Atazanavir (ATV) Darunavir (DRV) Indinavir (IDV) Fosamprenavir (FPV) Lopinavir (LPV) Ritonavir (RTV) Saquinavir (SQV)	Enfuvirtida (T-20)	Raltegravir (RGV)

ITRNs: inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleosídicos, ITRNNs: inibidores da transcriptase reversa não análogos aos nucleosídicos, IPs: inibidores da protease, IN: integrase

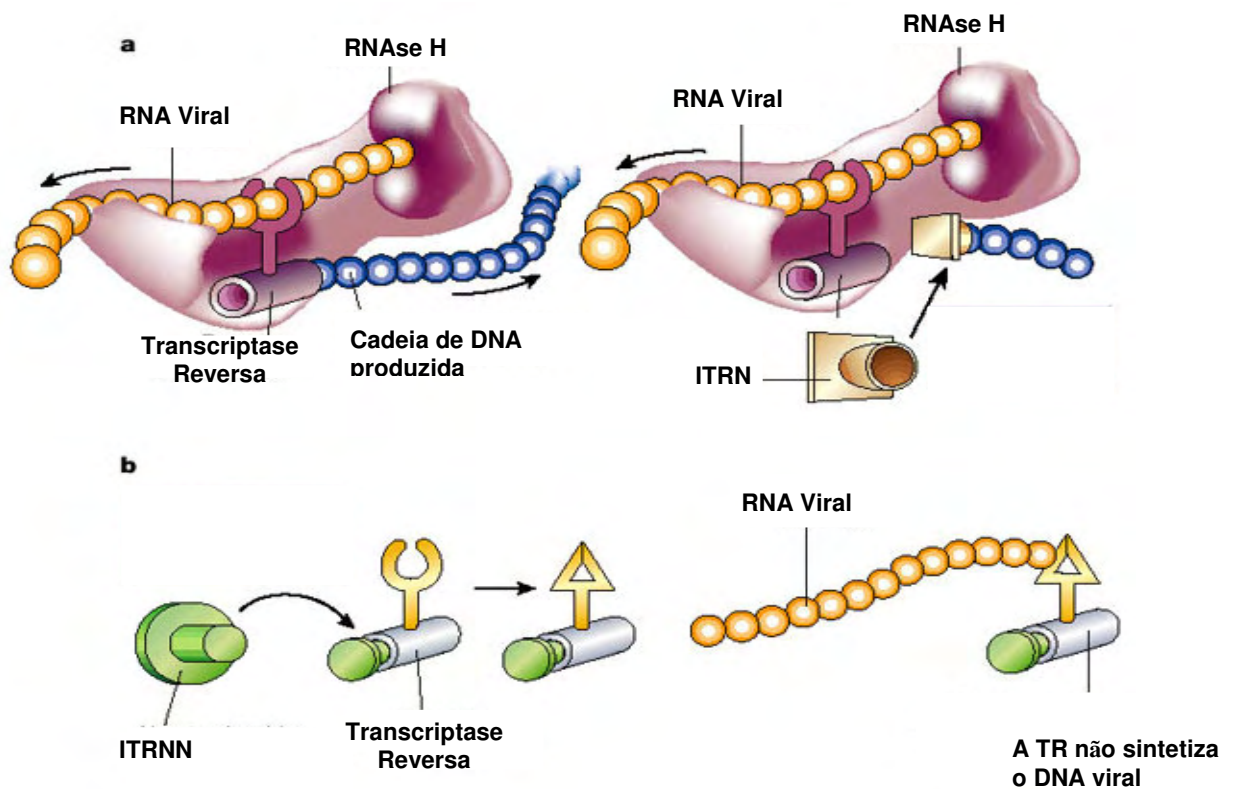


Figura 6. Mecanismo de Ação dos Inibidores da TR. a. Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos (ITRNs) b. Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeos (ITRNNs).

(Adaptada de Richman 2001)

Um dos grandes avanços relacionados à área farmacológica e médica dos últimos tempos foi o desenvolvimento dos IPs do HIV-1. A partir do momento em que foram elucidadas as etapas do ciclo replicativo do HIV e obteve-se a conformação gráfica tridimensional da PR, foi desenhada uma molécula capaz de interagir e ocupar de forma competitiva o sítio ativo da enzima, o que impede a sua atuação (Figura 7). Isto significa que, aleatoriamente, o sítio ativo da PR pode ser ocupado tanto pelo seu substrato natural, as poliproteínas virais a serem clivadas, quanto pelas moléculas produzidas artificialmente, os IPs. O excesso do fármaco no interior da célula, em relação à quantidade do substrato natural, possibilita a inibição da replicação do vírus (Hicks et al. 2004, Walmsley & Loutfy 2002).

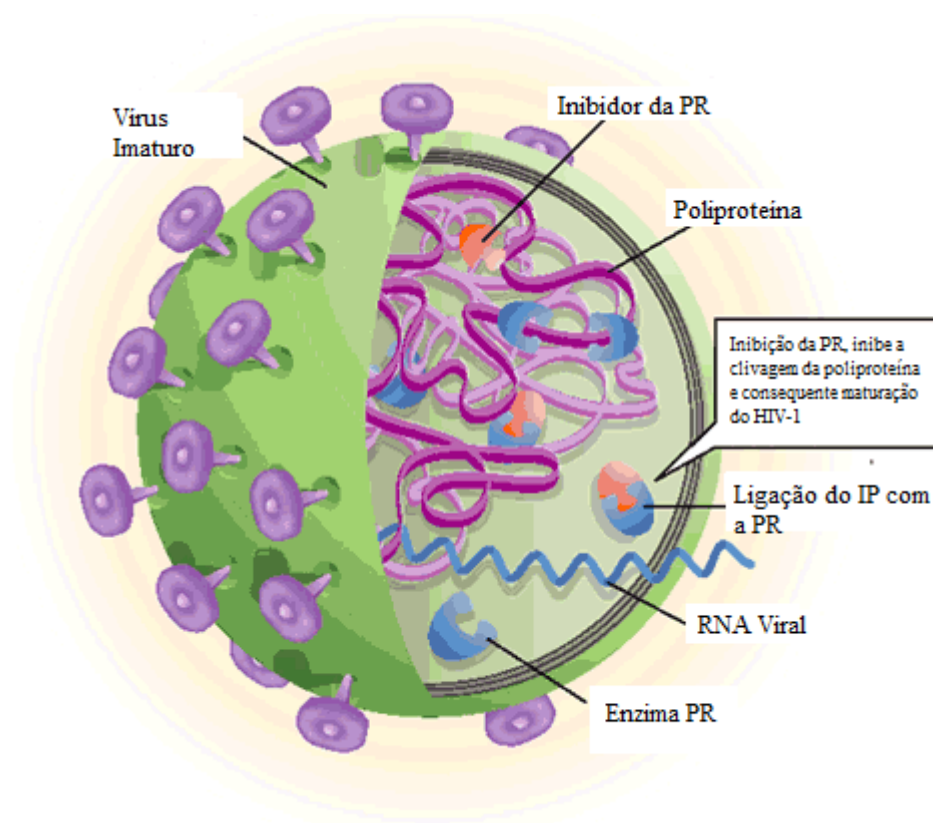


Figura 7. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Protease. PR: protease, IP: inibidor da protease.

(Adaptada de www.medscape.com/content/2003)

Recentemente foram desenvolvidos os inibidores de entrada, medicamentos que se ligam as glicoproteínas do envelope viral, como as moléculas gp41 ou se associam aos receptores secundários para o HIV-1. Estes ARVs exercem sua atividade farmacológica pelo bloqueio da interação entre o HIV-1 e os receptores utilizados pelo vírus presentes na célula do hospedeiro.

O Enfuvirtida, também conhecido como Fuzeon ou T-20, é o primeiro de uma nova classe de ARVs denominados inibidores de fusão a receber aprovação pelo *Food Drugs Administration* (FDA) para uso clínico. Teve a sua aprovação em 2003 para uso em pacientes tratados com as classes convencionais para o tratamento do HIV (inibidores da enzima TR e os IPs), que apresentavam falha terapêutica e um estágio avançado na infecção pelo vírus HIV-1. Desta forma, a necessidade de uma nova fórmula terapêutica para terapia de resgate nestes pacientes multi-experimentados, justificava a utilização deste novo medicamento (Fletcher 2003, Matthews et al. 2004).

O T-20 é um peptídeo sintético constituído de 36 aminoácidos que mimetiza os aminoácidos 127-162 presentes na região *heapted repeat – 2* (HR2) presente na glicoproteína de membrana gp41 do envelope viral (Wild et al. 1994, Lee et al. 2002). O T-20 é capaz de interagir com resíduos da região *heapted repeat – 1* (HR1), bloqueando a mudança conformacional requerida na molécula gp41 para a fusão do envelope lipídico do HIV-1 com a membrana celular das células que possuem o receptor CD4 em suas superfícies, desta forma impedindo a entrada do vírus para o citoplasma da célula alvo (Ho et al. 1995, Moore & Doms 2003). A Figura 8 mostra o mecanismo de ação farmacológico do enfuvirtida.

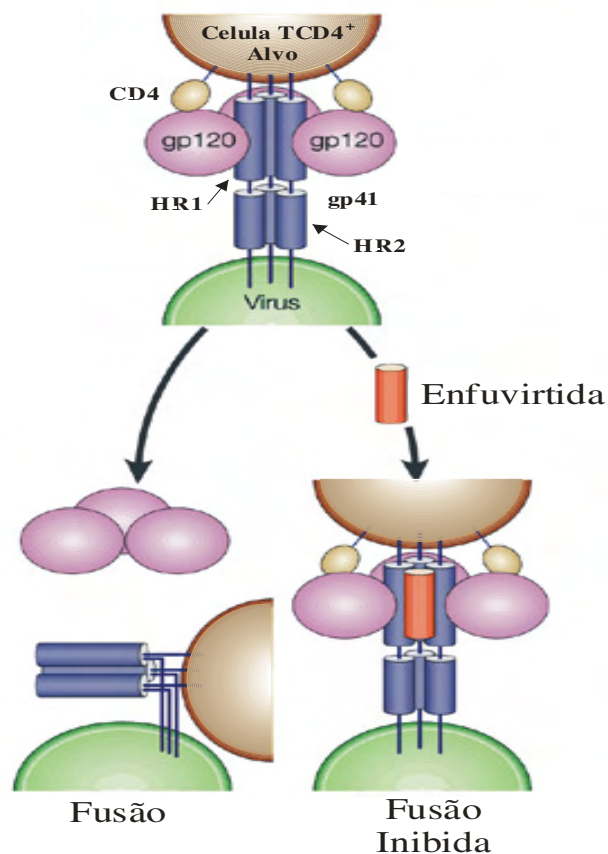


Figura 8. Mecanismo de Fusão do HIV-1 com a Célula Hospedeira e Ligação do Enfuvirtida a Molécula gp41. HR1: região *heapted repeat – 1*, HR2: região *heapted repeat – 2*
(Adaptada de Drews 2006)

Os co-receptores CCR5 atraíram grande interesse como alvo terapêutico e em agosto de 2007 o FDA aprovou o Maraviroc, o primeiro fármaco antagonista de CCR5, considerado uma nova classe de medicamento ARV para uso em pessoas infectadas pelo HIV-1, com tropismo para o receptor de quimiocina CCR5 (Dorr et al. 2005).

A enzima IN é responsável pela inserção do cDNA entre o cromossomo da célula hospedeira e é essencial para a replicação do HIV. Desta forma tornou se um importante alvo para pesquisas e desenvolvimento de novos ARVs, possuindo a vantagem de não possuir homólogo celular e permitir o desenvolvimento de medicamentos com menores índices de reações adversas. Dentre os fármacos inibidores da integrase destaca-se o MK-0518 desenvolvido pela Merk e aprovado pela FDA em outubro de 2007 para comercialização com o nome de Raltegravir (Pommier et al. 2005) (Figura 9).

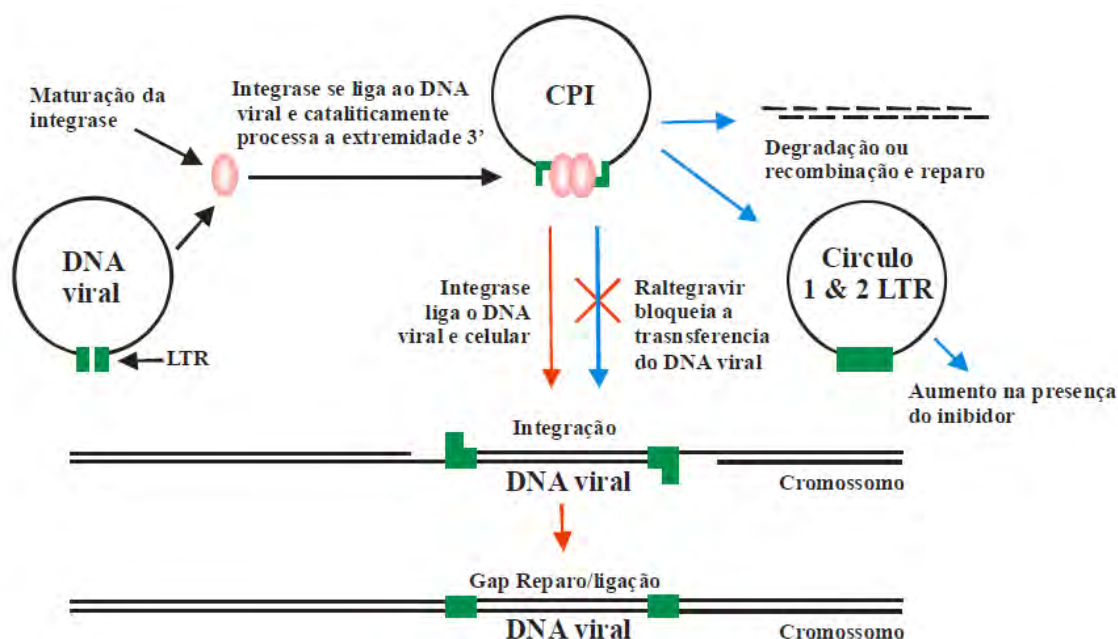


Figura 9. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Integrase (Raltegravir). CPI: complexo de integração, LTR: regiões terminais longas.

(Adaptada de Hicks & Gulick 2009)

1.6 Esquema Terapêutico com os ARVs

A fase inicial da infecção pelo HIV é geralmente assintomática, caracterizada pela alta replicação viral e pela ausência de anticorpos contra os epítomos virais. Após a fase aguda, o indivíduo entra em uma fase de latência clínica, que pode durar até 10 anos, representada por uma progressiva queda no número de linfócitos T CD4⁺ e manutenção da carga viral. Com o passar do tempo, a doença evolui para aids. Uma das principais características clínicas da aids é a imunossupressão, caracterizada pela destruição dos linfócitos T CD4⁺. Estas células são responsáveis pela estimulação e manutenção da imunidade adquirida celular e humoral frente a vários microrganismos, além da ativação das células do sistema imune (Sepkowitz 2001). Como consequências deste processo, podem ocorrer infecções oportunistas (infecções bacterianas, toxoplasmose, infecções fúngicas), caquexia, neoplasias (sarcoma de kaposi) e comprometimento do sistema nervoso central (Simon et al. 2006).

Os esquemas terapêuticos disponíveis contra a infecção pelo HIV-1 têm como objetivo reduzir a carga viral do paciente e reestabelecer os números viáveis de linfócitos T CD4⁺ para impedir o desenvolvimento de doenças oportunistas e consequente aumento da sobrevivência das pessoas infectadas com o HIV-1 (Detels et al. 1998). Pouco tempo atrás o início da terapia com ARVs era indicada para pacientes sintomáticos, com aids e que apresentam baixos números de linfócitos T CD4⁺ (<200 células/mm³). Os mais recentes guias para tratamento dos pacientes HIV-1 infectados sugerem o início do tratamento em pessoas com o número de linfócitos T CD4⁺ < 350 células/mm³. Múltiplos estudos mostram os benefícios do início da terapia quando iniciado em pacientes com os números de linfócitos T CD4⁺ entre 350 e 500 células/mm³. Em alguns casos o início da terapia está associado com uma normalização rápida no número destas células de defesa e um menor risco da transmissão sexual). O melhor tempo para se determinar o início da terapia em pacientes assintomáticos, cronicamente infectados permanece um desafio. (Moore et al. 2007, Hammer et al. 2008, Kitahata et al. 2009, Sterne et al. 2009).

Diversos regimes bem tolerados pelos pacientes e altamente efetivos estão disponíveis para o início do tratamento com os ARVs. Conveniência, quantidades de pílulas, tolerância e efeitos adversos são os fatores mais importantes a serem considerados para se tomar a decisão entre as várias opções terapêuticas disponíveis (Elzi et al. 2010, Volberding & Deeks 2010).

O tratamento atual recomendado pelo Ministério da Saúde inclui preferencialmente dois ITRNs, como AZT, DDI, d4T, 3TC, ABC, associados a um ITRNN, como EFZ ou NVP. A primeira alternativa em ITRN indicada é a associação com AZT e 3TC (biovir, nome comercial) para o esquema tríplice inicial. Esta combinação se demonstra menos tóxica do que as demais e

apresenta a combinação em um só comprimido, o que simplifica a adesão ao tratamento pelo paciente. Entre os ITRNNs, o EFZ continua sendo muito utilizado, pela sua elevada potência e bons resultados a longos prazos. As suas principais limitações podem ser os efeitos tóxicos ao sistema nervoso central e teratogenicidade. A NVP pode ser menos potente e mais tóxica que o EFZ (Ministério da Saúde 2010).

Como alternativa de substituição aos fármacos ITRNNs pode-se associar os IPs, como o IDV, NFV, LPV, ATV, IPs potencializados com o ritonavir ou um inibidor da integrase, como o raltegravir. O RTV aparece no tratamento como auxiliar, pois é metabolizado pelo complexo enzimático citocromo P450, o que permite maior biodisponibilidade dos outros fármacos e alcance aos seus alvos. Os fármacos ATV, LPV e o DVR potencializado com o RTV são as opções preferidas (Wilkins 2008).

1.7 Resistência do HIV-1 aos ARVs

A seleção de isolados de HIV-1 com mutações, resistentes aos ARVs, é um dos principais obstáculos para a total supressão e eliminação do HIV-1 (Palella et al. 1998). A emergência de HIV-1 resistentes é consequência de uma incompleta supressão viral, de altas taxas replicativas e erros na síntese do DNA viral ocasionados pela enzima TR (Hirsch et al. 1998).

A transmissão e disseminação de vírus resistentes aos medicamentos ARVs têm maiores implicações em problemas de saúde pública, incluindo a ineficácia do tratamento estabelecido para os pacientes infectados pelo HIV-1. Numerosos estudos demonstram que a presença de mutações de resistência associadas aos ARVs antes do início do tratamento é um importante indício de falha terapêutica frente aos fármacos utilizados. A falha terapêutica no tratamento ARV pode ser identificada devido a um aumento da carga viral (falha virológica) a partir do início do tratamento, redução de números viáveis de linfócitos T CD4+ (falha imunológica) e à ocorrência de eventos clínicos como tumores e infecções oportunistas. A falha virológica ocorre quando não há obtenção e/ou manutenção de carga viral indetectável podendo ser caracterizada por carga viral > 400 cópias/ml após 24 semanas de tratamento ou acima de 50 cópias/ ml após 48 semanas de tratamento (Hanna & D'Aquila 2001, DeGruttola et al. 2000, Demeter & Haubrich 2001). Para a identificação de mutações de resistência associadas aos medicamentos disponíveis contra o HIV vários critérios podem ser utilizados, como experimentos *in vitro* em que os isolados selvagens são cultivados na presença de concentrações inibitórias de fármacos.

Em seguida, procede-se o sequenciamento do genoma dos vírus que se tornaram resistente e por fim há validação da resistência pelo método laboratorial mutagênese reversa, que simplificada consiste na reversão destas mutações e observação novamente da susceptibilidade do vírus em cultura frente ao ARV. Testes *in vivo* também são realizados em laboratório de isolados de pacientes virgens ou tratados com falha virológica. Outra forma de determinar as mutações de resistência é pela testagem fenotípica com vírus multi-resistentes coletados *in vivo*, detectando a resistência cruzada. No caso do HIV-1 isolado de pacientes na qual há falha terapêutica é de extrema importância as observações da evolução do vírus ao mostrar qual mutação ou mutações este microrganismo apresenta para escapar do esquema terapêutico utilizado (Johnson et al. 2009, Shafer 2002).

Para a denominação de uma mutação, utiliza-se a letra referente ao aminoácido consenso da cepa HXB2 do subtipo B do HIV-1, seguido do número da posição do códon e da letra referente ao aminoácido mutante. Por exemplo, a mutação K103N, significa que na posição 103 do códon que codifica o aminoácido lisina (K) no consenso, foi substituído pelo aminoácido asparagina (N). Pode ocorrer a mudança por mais de um aminoácido na posição 103, devido a ocorrência das *quasispecies* do HIV, desta forma as substituições observadas são indicadas (K103K/N) (Shafer 2002).

O teste de genotipagem é o método mais utilizado de detecção de isolados de HIV-1 resistentes aos medicamentos ARVs e é uma das primeiras aplicações do sequenciamento genético automatizado para propósitos clínicos. A técnica tem a habilidade de detectar várias mutações, até mesmo aquelas mutações presentes em menor frequência para afetar a suscetibilidade aos ARVs em ensaios fenotípicos, entretanto com um potencial emergente de resistência. Outra vantagem do sequenciamento genético é a detecção de mutações de transição que por si só não causam resistência, porém indicam a pressão seletiva farmacológica. (Shafer 2002). Em adição, estudos controles prospectivos mostram que pacientes com acesso as análises de resistência, principalmente os resultados da genotipagem do HIV-1, respondem mais eficientemente a terapia ARV frente aqueles pacientes que não tiveram acesso a estas análises (Baxter et al. 2000; Johnson et al. 2009).

Muitas mutações presentes nas enzimas PR e TR têm sido associadas à resistência aos fármacos inibidores das mesmas. A resistência é mediada por diversos mecanismos, como fatores farmacológicos, adesão a terapia pelo paciente, farmacocinética, farmacodinâmica, metabolização do fármaco, rápida eliminação do medicamento na corrente sanguínea e alcance deste medicamento aos sítios de infecção viral são alguns dos aspectos relacionados com a seleção de vírus resistentes. Em relação aos ITRNs algumas mutações na enzima impedem a

incorporação destes análogos ao cDNA e outro fato que pode ocorrer é a remoção prematura dos ITRNs da cadeia de DNA formado. Neste último mecanismo há a associação das mutações análogas da timidina (TAMs). Estas mutações induzem a remoção do análogo nucleosídico da porção 3' da cadeia de DNA terminada. Este processo envolve ATP e um ataque pirofosfato na ligação de um fosfodiéster ao análogo na cadeia de DNA. As mutações TAMs na TR selecionadas pelo AZT e d4T são M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F, K219Q/E/N (Boyer et al. 2001).

Mutações no gene da enzima PR reduz a interação e afinidade do inibidor com a enzima do vírus que apresenta a mutação no seu sítio ativo. Outras mutações compensam o decaimento da cinética enzimática com mudanças no sítio ativo da enzima e ainda favorece o surgimento de resistência por alterar a catálise enzimática, a estabilidade dimérica da proteína ou modificações estruturais que impedem a efetiva atuação dos inibidores da PR nos seus sítios ativos (Erickson et al. 1999, Shafer 2002). A figura 8 mostra a lista de mutações segundo a lista do IAS-USA de 2009.

As mutações de resistência associadas aos ARVs podem ser classificadas como principais ou acessórias. As mutações principais ocorrem no sítio ativo da enzima ou próximo e alteram a interação com o fármaco ARV. As mutações acessórias ocorrem na tentativa do vírus, que apresenta a mutação principal, de recuperar a sua capacidade replicativa e não são capazes de ocasionar suscetibilidade aos fármacos. Estas mutações acessórias em determinadas situações quando associadas às mutações principais podem determinar resistência aos medicamentos. Algumas mutações acessórias estão presentes como polimorfismo, substituições aleatóreas que ocorrem nos vírus sem a pressão seletiva do ARV (Shafer 2002).

Um fenômeno importante que pode ocorrer na seleção de mutações de resistência aos fármacos ARVs é a resistência cruzada. Uma determinada mutação no HIV-1 pode levar a diminuição da susceptibilidade de outros medicamentos de uma mesma classe farmacológica. Este é o caso das mutações K103N e a Y188L, as mutações mais frequentes selecionadas ante ao uso do EFV. Uma forte resistência cruzada é observada em vírus que carregam mais de uma mutação na sua sequência de aminoácidos, como exemplo temos vírus com mutações em conjunto L100I, G190A e V106A ocasionando resistência a toda classe de ITRNN (Ghosn et al. 2009, Antinori et al. 2002). Outro fator a ser considerado é a barreira genética relacionada aos fármacos ARVs, ou seja, o número de mutações requeridas para reduzir a atividade de determinado fármaco frente ao vírus HIV-1. Pode ser classificada como baixa e alta barreira genética. Baixa barreira genética é a perda da atividade ARV pela presença ou seleção de

poucas ou uma única mutação. Já uma alta barreira genética é a necessidade de múltiplas mutações para a perda da atividade de determinado ARV (Clotet et al. 2009).

As mutações de resistência associadas aos ARVs ocorrem devido a seleção de isolados resistentes frente às pressões imunológicas e farmacológicas. Sendo assim, dois tipos de resistência são descritas, a resistência transmitida e a resistência secundária. A resistência transmitida é aquela presente ou selecionada antes mesmo da terapia com os ARVs, ou seja, a pessoa se infecta ou seleciona um isolado viral, já contendo a mutação de resistência associada aos ARVs e pode estar relacionada com a transmissão de vírus que apresentam as mutações de resistência. Embora raramente este tipo de resistência pode decorrer de geração espontânea, frente a alta taxa replicativa deste vírus. A resistência secundária decorre da seleção frente a pressão farmacológica exercida pelos ARVs (Boden et al. 1999).

O monitoramento genético do HIV-1 e estudos de mutações associadas à resistência ARV no Brasil são importantes uma vez que o país oferece acesso universal aos ARVs e pode favorecer a ineficácia de determinados medicamentos em diferentes subtipos do HIV-1. O conhecimento do perfil de resistência dos isolados do HIV-1 de determinada região brasileira, pode definir melhores esquemas terapêuticos com ARVs para os indivíduos com aids e diminuir o custo do tratamento pelo Ministério da Saúde (Brindeiro et al. 2003).

No Brasil os testes de genotipagem já são disponibilizados pelo Ministério da Saúde. O Programa Nacional de DST/Aids implantou a Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem (RENAGENO), para executar e interpretar exames de pacientes atendidos no Sistema Único de Saúde/SUS. Para fazer o teste, o paciente deve apresentar falha virológica, apresentar falha do tratamento com terapia dupla, falha da terapia tripla contendo ITRNN ou falha em terapia contendo IP. Além dos critérios acima mencionados, é necessário que o paciente tenha carga viral acima de 2.000 cópias/ml para realizar o teste. É essencial que a coleta de sangue para teste de genotipagem seja realizada na vigência de terapia, o esquema ARV em uso não deve ser interrompido e a necessidade de adesão nas semanas que antecedem a coleta deve ser enfatizada.

Outra utilização da genotipagem é na profilaxia da transmissão materno-fetal (vertical). A maior parte dos consensos já recomenda o teste nas gestantes infectadas pelo HIV, uma vez que caracteriza uma situação de urgência em que não se tem tempo para ajustar o tratamento e a demora na diminuição da carga viral da mãe aumenta a probabilidade de transmissão para o filho (Ministério da Saúde 2010).

Figura 10. Principais Mutações de Resistência Associadas aos ITRN, ITRN, IP e Enfuvirtida de acordo com a Lista do The International AIDS Society 2009.

MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)^a

Multi-NRTI Resistance: 69 Insertion Complex^b (affects all NRTIs currently approved by the US FDA)

M	A	▼	K						L	T	K
41	62	69	70						210	215	219
L	V	Insert	R						W	Y	Q
									F	E	

Multi-NRTI Resistance: 151 Complex^c (affects all NRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)

	A		V	F		F	Q				
	62		75	77		116	151				
	V		I	L		Y	M				

Multi-NRTI Resistance: Thymidine Analogue-Associated Mutations^{d,e} (TAMs; affect all NRTIs currently approved by the US FDA)

M		D	K						L	T	K
41		67	70						210	215	219
L		N	R						W	Y	Q
									F	E	

Abacavir		K		L		Y		M			
		65		74		115		184			
		R		V		F		V			
Didanosine		K		L							
		65		74							
		R		V							
Emtricitabine		K						M			
		65						184			
		R						V			
								I			
Lamivudine		K						M			
		65						184			
		R						V			
								I			
Stavudine	M	K	D	K					L	T	K
	41	65	67	70					210	215	219
	L	R	N	R					W	Y	Q
									F	E	
Tenofovir ^f		K		K							
		65		70							
		R		E							
Zidovudine	M		D	K					L	T	K
	41		67	70					210	215	219
	L		N	R					W	Y	Q
									F	E	

Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{am}

Efavirenz				L	K	K	V	V		Y	Y	G		P
				100	101	103	106	108		181	188	190		225
				I	P	N	M	I		C	L	S		H
										I	A	A		
Etravirine ^g		V	A	L	K		V		E	V	Y	G		M
		90	98	100	101		106		138	179	181	190		230
		I	G	I	E		I		A	D	C	S		L
					H					F	I	A		
					P					T	V			
Nevirapine				L	K	K	V	V		Y	Y	G		
				100	101	103	106	108		181	188	190		
				I	P	N	A	I		C	C	A		
							M			I	L	H		

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS

Atazanavir +/- ritonavir	L	G	K	L	V			L	E	M	M			G	I			F	I	D	I	A	G	V			I	I	N	L	I
	10	16	20	24	32			33	34	36	46			48	50	53	54	60	62	64	71	73	82			84	85	88	90	93	
	I F V C	E R M I T V			I I Q F V					I L V	I L			V	L	Y L V M T A	E V	L M V	V I T L	C S T A	A T F I			V V S			M	L M			
Darunavir/ ritonavir	V				V			L				I	I			I				T			L				I	L			
	11				32			33				47	50			54				74			76				84	89			
	I				I			F				V	V			M L				P			V				V	V			
Fosamprenavir/ ritonavir	L				V						M	I	I			I				G	L	V			I	L					
	10				32						46	47	50			54				73	76	82			84	90					
	F I R V				I						I L	V	V			L V M				S	V	A F S T			V	M					
Indinavir/ ritonavir	L	K	L		V			M			M			I						A	G	L			V	V	I	L			
	10	20	24		32			36			46			54						71	73	76			77	82	84	90			
	I R V	M R	I		I			I			I L			V						V T	S A	V I			A F T	V	M				
Lopinavir/ ritonavir	L	K	L		V			L				M	I	I			F	I	L			A	G	L			V	I	L		
	10	20	24		32			33				46	47	50			53	54	63			71	73	76			82	84	90		
	F I R V	M R	I		I			F				I L	V A	V			L V L A M T S	P			V T	S	V			A F T S	V	M			
Nelfinavir	L				D				M	M									A				V	V	I			N	L		
	10				30				36	46									71				77	82	84			88	90		
	F I				N				I	I L									V T				I A F T S	V	D S			M			
Saquinavir/ ritonavir	L	L									G			I			I			A	G	V			V	I			L		
	10	24									48			54			62			71	73	77			82	84			90		
	I R V	I									V			V L			V			V T	S	I A F T S			V	M					
Tipranavir/ ritonavir	L	I	K		L			E	M	K			M	I	I			Q	H			T	V			N	I	L			
	10	13	20		33			35	36	43			46	47	54			58	69			74	82			83	84	90			
	V	V	M R		F			G	I	T			L	V	A M V			E	K			P	L D V T			M					

MUTATIONS IN THE ENVELOPE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ENTRY INHIBITORS

Enfuvirtide	G 36 D S	I 37 V	V 38	Q 39	Q 40	N 42	N 43
-------------	-------------------	--------------	---------	---------	---------	---------	---------

(Johnson et al. 2009)

1.7.1 Resistência Transmitida aos IPs, ITRNs e ITRNNs

Recente estudo realizado nos Estados Unidos analisou a presença de mutações de resistência associadas aos ARVs em 1997 pacientes sem tratamento e diagnosticados em 2006, pelo sequenciamento do gene *pol* do genoma do HIV-1. As mutações observadas foram de 7,8% para os ITRNNs, 5,6% para os ITRNs e 4,5% para os IPs. A mutação prevalente foi a K103N que reduz a suscetibilidade de toda a classe dos ITRNNs, presente em 66,7% dos pacientes que apresentaram mutações de resistência. A mutação M41L que confere resistência aos análogos de timidina, como a zidovudina e a estavudina foi a segunda mais comum, ocorrendo em 31, 5% dos pacientes com mutações desta classe de medicamentos. A mutação de resistência associada aos IPs L90M, selecionada pelo saquinavir/ritonavir e nelfinavir, estava presente em 26, 7% das pessoas com vírus resistentes para os IPs. A prevalência de mutações de resistência aos ARVs não diferiu significativamente entre homens e mulheres, entre diferentes etnias ou entre pessoas de diferentes áreas dos Estados Unidos. Os autores concluíram que a prevalência de mutações foi maior que a demonstrada em outros estudos na América do Norte e em países europeus. O trabalho apresentou uma maior prevalência de mutações de resistência aos ITRNNs e uma baixa prevalência de mutações aos ITRNs e por final a presença de mutações de resistência transmitida não foi estatisticamente diferente em pacientes com vírus subtipo B comparado com aqueles que foram infectados por vírus HIV-1 subtipos não B (Wheeler et al. 2010).

Pesquisa realizada na Espanha em 730 pacientes virgens de tratamento avaliou a presença de mutações de resistência nos genes da PR e TR. O estudo mostrou a prevalência das mutações TAMs mais alta em pacientes infectados por vírus subtipo não B em relação ao subtipo B (6,2% versus 1%) e a mudança no códon 179 do gene da TR (V179A/D/E/I) também foi observada com maior frequência nestes pacientes (12% versus 5,7%). Outro fator relevante, significativamente mais elevado em subtipos não B, foi a presença de mutações secundárias observadas na PR, como a L10R/I/F/V/C, I13V, K20R/M/I/T/V, M36I/L/V, G73C/S/T/A e L89V/M/I (De Mendoza et al. 2009).

Em um estudo de monitoramento na França mostrou que em 415 pacientes HIV-1+ com infecção primária diagnosticados nos anos de 2005 e 2006. De acordo com a lista de mutações descritas pelo algoritmo Stanford 12,5% dos pacientes apresentaram mutações de resistência. A frequência de mutações de resistência para os ITRNs foi de 6,7%, 4,6% para os ITRNN e 2,9% para os IPs. As mutações mais frequentes foram a T215Y/F/D/S/E/C (4,3%) para os ITRNs, seguido pela mutação K103N (3,6%) para os ITRNNs. O estudo considerou uma estabilidade de aproximadamente 5% para a resistência transmitida relacionada aos IRTNs e 4% para os

ITRNNs em comparação com outras análises desde 2001. Este fato foi justificado pelo sucesso virológico dos pacientes tratados e pelo baixo risco de transmissão (Chaix et al. 2009).

As mutações de resistência transmitida persistem por longos períodos de tempo mesmo na ausência de tratamento (Littler 2004, Barbour et al. 2004, Brenner et al. 2003). Delaunier e colaboradores em 2004 mostraram dois casos de transmissão sexual de HIV-1 multidroga-resistentes (MDR), ou seja, pacientes que apresentaram mutações de resistência há mais de uma classe de ARVs e que persistiram por 2 anos na ausência de pressão seletiva dos ARVs. As análises filogenéticas dos clones moleculares dos 2 pacientes, obtidas 24 meses após a infecção primária, mostrou uma baixa intravariabilidade (<2%) entre todas as sequências de cada amostra, sugerindo uma considerável conservação da população viral ao longo do tempo .

No Brasil estudos realizados desde o final da década de 90 mostram mutações associadas aos ITRNs, aos ITRNNs e IPs (Brindeiro et al. 1999, Soares et al. 2003a, Tanuri et al. 1999). Estudo sobre a diversidade genética do HIV-1 e resistência aos ARVs, avaliou sequências do gene da TR em isolados de doadores de sangue assintomáticos e não tratados com ARVs. Três amostras subtipos não B apresentaram mutação de resistência ao AZT enfatizando a resistência primária em indivíduos não tratados no Brasil (Brindeiro et al. 1999).

Estudo Brasileiro de rede nacional avaliou diversidade genética do HIV-1 e mutações genéticas associadas à resistência aos ARVs em 535 amostras de pacientes sem tratamento, oriundos dos estados Brasileiros: Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Pernambuco, Salvador, Pará e Mato Grosso do Sul. Esse estudo analisou mutações associadas à resistência nos fragmentos da PR e TR. Um baixo percentual de resistência transmitida foi observado. Dos pacientes, 4,42% apresentaram resistência para os ITRNs e ITRNNs, e 2,24% dos pacientes estudados para os IPs, no qual envolviam principalmente o subtipo B, seguido do subtipo F (Brindeiro et al. 2003).

Em 2004 foi realizado um estudo envolvendo 56 pacientes infectados pelo HIV-1 provenientes do Rio de Janeiro, para análise de resistência associada aos ARVs. As regiões genômicas do HIV-1 analisadas envolviam fragmentos da TR e PR do gene *pol*. Não foram observadas mutações associadas à resistência transmitida (Pires et al. 2004).

Importante estudo realizado em 2009 recrutou 400 pacientes sem tratamento para o HIV-1 de 13 cidades Brasileiras (Ribeirão Preto, Santo André, Santos, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Curitiba, Florianópolis, Salvador, Brasília, Campinas, Porto Alegre e São Paulo). A genotipagem dos fragmentos da PR e TR foi realizada em 387 pacientes. A prevalência de genótipos resistentes foi observada em 7% dos pacientes não tratados e variou de acordo com a classe do medicamento ARV: 4,4% para ITRNNs, 1,3% para os ITRNs e 1% para

os IPs. Dos indivíduos que apresentaram mutações de resistência transmitida, 87% tinham mutações associadas com apenas uma classe de fármacos e 4% com as 3 classes estudadas. Outras mutações transmitidas relatadas com a resistência ao medicamento, como T215S, T215D e T69D foram observadas, entretanto estas não estão presentes na lista do *International AIDS Society* (IAS-USA). Foi observado também que 91% dos 22 pacientes estavam infectados com vírus subtipo B associados a resistência transmitida, o que sugere uma alta transmissão em pacientes infectados com este subtipo (Sprinz et al. 2009).

Outro estudo recrutou 223 pacientes recém diagnosticados com HIV-1 dos maiores centros Brasileiros (São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Brasília e Belém) mostrou que cinco (2,2%), nove (4,0%) e quatro (2,0 %) isolados mostraram mutações de resistência relacionadas ao ITRNs, ITRNNs e IPs, respectivamente. As mutações mais prevalentes foram as relacionadas aos ITRNNs (K103N e Y188L/I), seguida pelos ITRNs e IPs (M46I e L90M). Interessantemente, a maioria das mutações relacionadas aos IPs foi encontrada em pacientes com vírus HIV-1 oriundos do Rio de Janeiro. Os pesquisadores deste estudo mostram uma tendência geográfica relacionada a resistência transmitida. Níveis intermediários de resistência transmitida (5 a 15%) foram observados em Belém/ Brasília, o que contrasta com os outros locais estudados. Ao comparar esta prevalência com os dados de 2002 apresentados pela Rede Nacional de Aids no Brasil, pode –se inferir que a resistência transmitida no Brasil permanece em nível estável, 6,6% versus 8,1% deste estudo (Inocêncio et al. 2009).

Nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase vem desenvolvendo pesquisas importantes para a região Centro – Oeste do Brasil sobre a variabilidade genética molecular do HIV-1 e mutações de resistência associadas aos fármacos ITRNs, ITRNNs, IPs e enfuvirtida (Stefani et al. 2007, Cardoso et al 2009, Cardoso & Stefani 2009, Cardoso et al. 2010). Um dos principais estudos sobre resistência transmitida recrutou 103 pacientes HIV-1+, diagnosticados nos anos de 2007-2008, virgens de tratamento no Hospital de Doenças Tropicais Anuar Auad em Goiânia – Goiás. A pesquisa avaliou as mutações no gene *pol* do HIV-1 pelo sequenciamento genético automatizado. As sequências de nucleotídeos obtidas foram analisadas pela ferramenta de Calibração de Resistência Populacional (CPR) empregando o algoritmo do Monitoramento de Mutações de Resistência do Stanford (SDMR) e a lista de mutações do *International AIDS Society* – USA de 2009 (IAS-USA). De acordo com estes algoritmos SDRM-2009 e IAS – USA, 10,3% e 8,1 % dos pacientes HIV-1+ apresentaram mutações de resistência transmitida associadas aos ARVs, respectivamente. A maioria dos isolados resistentes (6/10) apresentaram mutações associadas com apenas uma classe de ARV. Dois pacientes estavam infectados por vírus com mutações associadas com os

IPs (M46I/L90M; I85V), três pacientes tinham vírus resistentes aos ITRNs (M41L/T215D; T215S; L210W) e um paciente apresentou a mutação K103N associada à resistência aos ITRNs. Quatro pacientes apresentaram mutações de resistência transmitida a mais de uma classe de ARVs: IP e ITRN (M46L/L210W), ITRN e ITRNN (V118I/T215D/Y188L; V118I/Y181C; T215S/G190S) (Cardoso et al. 2009).

1.7.2 Resistência Secundária aos IPs, ITRNs e ITRNNs

Em 2007, grupo francês em um estudo nacional da resistência frente aos fármacos ARVs analisou 498 pacientes infectados pelo HIV-1 em tratamento, diagnosticados em 2004. No estudo 55% dos pacientes tinham sido tratados com 3 classes de ARVs e 12% haviam recebido o enfuvirtida. Em 85% dos casos analisados pelo algoritmo Stanford e de acordo com a Agência Nacional de Pesquisadores em Aids e Hepatites Virais (ANRS) apresentaram pelo menos uma mutação de resistência associada aos ARVs. As mutações de resistência M184V/I, selecionadas pela lamivudina (3TC) ou emcitabina (FTC), esteve presente em 58% dos pacientes. As mutações análogas da timidina M41L, D67N, L210W e T215Y/F foram identificadas, contudo as mutações K70R e K219Q/E estavam presentes em uma menor frequência. Em 5 % dos pacientes observou-se vírus carreando múltipla resistência aos ITRNs dirigidas pela complexa mutação Q151M ou pela inserção no códon 69. A mutação K65R foi encontrada em apenas 5% dos pacientes. As mais frequentes mutações de resistência associadas aos análogos não nucleosídicos da TR foram a K103N e a Y181C/I, detectadas em 31% e 13% dos pacientes tratados, respectivamente. As mutações relacionadas à resistência aos IPs foram as M41I/L, L90M, V82A/F/S, L33F/I e I84V, contudo N88D/S, D30N, G48V e I50V/L foram observadas raramente no estudo (Costagliola et al. 2007).

Estudo realizado na cidade portuária de Santos/SP mostrou em uma população de 83 pacientes HIV-1⁺ com falha virológica para as 3 classes de ARVs: IPs, ITRNs e ITRNNs. Todas as mutações de resistência associadas as 3 classes de ARVs descritas no estudo eram comuns entre os subtipos B, F e recombinates BF. As mutações de resistência associadas aos IPs foram M46I/L (29%), I54V (24%), A71V (22%) e V82A/F (31%). As mutações de resistência relacionadas aos ITRNs foram M41L (52%), D67N, K70R (26%), M184V (88%), L210W (29%), T215Y/I/F (65%) e K219Q/E/N (28%). A mutação de resistência aos ITRNNs K103N foi encontrada em 52% das amostras deste estudo. Algumas mutações encontradas e consideradas como polimorfismos, não relacionadas com resistência, foram a L10I/VR, K20R, M36I, L63P na região da PR e V118I na TR (de Sa-Filho et al. 2008).

Pesquisa realizada no Nordeste Brasileiro, nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas avaliou 516 amostras de pacientes infectados com o vírus HIV-1 em falha terapêutica. Em 89,1% das amostras observou-se a presença de mutações de resistência associadas aos ITRNs, 55% dos pacientes apresentaram mutações associadas aos ITRNs e 49,4% aos IPs. As mais frequentes mutações relatadas aos ITRNs ocorreram nos códons 184 (66%), 215 (61,5%) e 41 (47,9%). Outras mutações de resistência TAMs tiveram uma significativa frequência: 67N, 70R, 210W e 219Q/E/N. Entre as mutações associadas aos ITRNNs as mais prevalentes foram nos códons 103 (62%), 190 (38,7%) e 181 (29,2 %). Mutações secundárias associadas aos IPs apresentaram importante frequência: 90 (25,2%), 82 (21,1%) e 30 (16,2%). Um total de 14,1% dos pacientes apresentaram resistência a uma classe de ARVs, 61,4% para duas classes e 18,9% para as 3 classes de medicamentos ARVs (Cavalcanti et al. 2007).

A diversidade genética do HIV-1 foi caracterizada em 45 pacientes HIV-1+ em tratamento com ARVs provenientes do Distrito Federal, pelo sequenciamento automatizado dos fragmentos da TR e PR. Análise do fragmento da PR, mostrou. Um total de 84% dos pacientes apresentou mutações no genoma viral associadas aos fármacos ARVs. Mutações associadas aos IPs foram detectadas em 73% das sequências virais e a mutação principal I50V foi encontrada em 38% dos pacientes. As mutações associadas com os inibidores da TR foram observadas em 42% dos pacientes (36% das mutações de resistência associadas aos ITRNs e 31% associadas aos ITRNNs). As mutações menores nesta região do genoma do HIV-1 foram: L10I/V(7%), K20M (2%), M36I (11%), L63P (20%), A71T (2%) e V77I (7%). A distribuição de mutações de resistência na sequência da TR foi: M41L (11%), E44D (4%), D67N (11%), T69D (2%), K70R (11%), L74V (2%), V118I (9%), M184V (18%), T215Y (4%) e K219E, as quais estão associadas a resistência aos ITRNs, L100I (4%), K103N (18%), Y181C (11%) e G190A (4%), associadas aos ITRNNs. A maioria dos casos de resistência era para os ITRNNs (Cerqueira et al. 2004).

Recente estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa na região Centro – Oeste do Brasil mostrou a frequência de mutações de resistência em 77 gestantes HIV-1+, 35 sem tratamento ARV e 45 em uso de medicamentos ARVs. Das pacientes virgens de tratamento nenhuma apresentou mutações de resistência primária aos fármacos. Dentre as pacientes em terapia contra o HIV-1, duas pacientes apresentaram resistência para uma classe de ARVs (ITRN) enquanto 4 apresentaram mutações de resistência a duas classes (ITRN+ITRNN, n=2 e IP+ITRN, n=2). Uma paciente apresentou mutações de resistência no gene *pol* associadas a todas as classes de ARVs, (IPs, ITRNs e ITRNNs). As mutações maiores para os IPs detectadas

no trabalho foram D30N, M46L, V82A, N88D e as menores foram L10I, L10V e A71T. Em relação aos ITRNs foram mostradas as mutações M41L, D67N, K70R, M184V, T215Y e K219Q e as mutações de resistência associadas aos ITRNNs foram K103N, E138K/A, P225H (Cardoso et al. 2010).

1.7.3 Mutações de Resistência Associadas ao Enfuvirtida (T-20)

Como as outras classes de ARVs, vírus resistentes apresentando mutações de resistência ao T-20 têm sido descritos. A resistência ao T-20 usualmente ocorre devido a mutações na região amino terminal da molécula HR1 da gp41, embora mutações na região HR2 já foram demonstradas (Rimsky et al. 1998, Roman et al. 2003, Melby et al. 2006, Peuchant et al. 2007).

A primeira evidência de uma rápida emergência de uma resistência clínica ao T-20 foi descrita há 8 anos. Mutações de resistência associada ao T-20 demonstradas neste estudo foram G36D no motivo GIV do HR1 e a Q32H, Q32R, I37V, V38A, V38M e Q39R (Wei et al. 2002). Estudos clínicos de fase II apresentaram as mais comuns substituições na região HR1, que conferem resistência ao T-20: posição 36 da gp41 *env* (G36D, G36S), 38 (V38A, V38M), 40 (Q40H), 42 (N42T) e a posição 43 (N43D, N43K, N43S) (Sista et al. 2004, Marcelin et al. 2004). Outras mutações encontradas *in vivo* foram V38G, V38W, V38E, N42G, N42Q/H e N43Q (Sista et al. 2004, Marcelin et al. 2004, Covens et al. 2009).

Em relação ao *fitness* viral do HIV-1, na ausência do T-20, os vírus selvagens apresentam uma cinética de replicação maior em relação aos vírus que agrupam mutações frente ao T-20 nas posições 36-45 da região HR1 (Church et al. 2002, Sista et al. 2004). Os vírus que apresentam mais de uma substituição de aminoácidos apresentam menor *fitness* em relação aos vírus que carregam uma única substituição (Heilek-Snyder & Bean 2002). Estudo recente analisou a importância das mutações N43T e A50V, estas mutações sozinhas não são capazes de conferir resistência ao T-20, porém as associações A50V com G36D, V38M, N43D ou N43T, aumentam levemente a suscetibilidade ao medicamento T-20, assim como a mutação N43T em associação com a V38M (Covens et al. 2010).

Um impacto negativo das mutações de resistência na região da gp41 frente ao *fitness* viral, é que mutações na região HR2 podem ser selecionadas, na tentativa de compensar o defeito ocasionado na região HR1. Tem-se como exemplo de efeito compensatório a mutação N126K na região HR2 juntamente com associadas as V38A/V36A. A mutação V38A ocorre primeiramente e reduz a interação farmacológica do T-20 e o vírus perde em relação a sua

capacidade de replicação. A segunda mutação compensatória é selecionada na presença do ARV e o duplo mutante apresenta um aumento no seu *fitness* viral. Mecanismo similar ocorre com a mutação S138A que aumenta a susceptibilidade ao T-20 em até 3 vezes em relação a resistência já ocasionada pela mutação N43D (Xu et al. 2005). Outras mutações de resistência Q40H e Q56R emergem, mas a diminuição no *fitness* é compensada pela mutação N125D (Ray et al. 2009). Um natural polimorfismo na região HR2, N137K, foi descrita em associação com mutações na posição 43 da HR1. Este vírus mutante é capaz de resgatar totalmente a capacidade de fusão da membrana do vírus resistente com a célula do hospedeiro quando na presença da N43D (Tolstrup et al. 2007).

No Brasil, recente estudo com 65 pacientes em falha de esquema terapêutico apresentou sequências analisadas para a região HR1 da gp41. Dentre os pacientes, 5/65 apresentaram vírus do subtipo B com a mutação primária de resistência frente ao enfuvirtida G36D. Os polimorfismos S35A/T e N42S foram observados principalmente nos vírus subtipo C (Oliveira et al. 2009). Outra pesquisa envolvendo 80 pacientes virgens para o enfuvirtida, mas em falha para o esquema terapêutico triplo com ARVs comparando amostras de RNA e DNA destes indivíduos, apresentou vírus HIV-1 subtipo B com as mutações de resistência transmitida L44M e N43K. A frequência de mutações relacionadas ao T-20 na região do HR1 foi 3,8% para amostras de DNA e 4,8% em amostras de RNA (Teixeira et al. 2010).

Recente estudo do nosso grupo de pesquisa apresentou a resistência primária associada ao T-20 entre 14 pacientes multi-resistentes aos medicamentos ARVs (ITRNs, ITRNNs e IPs) na região Centro-Oeste do Brasil. As mutações apresentadas foram N42T, G36E e N43S em 3/14 pacientes, dois destes estavam em terapia de resgate com o enfuvirtida e outro nunca havia entrado em contato com este medicamento (Cardoso et al. 2009).

2. JUSTIFICATIVA

De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, no Centro-Oeste Brasileiro 868 novos casos de aids foram notificados de julho de 2009 a junho de 2010. O Estado de Goiás notificou o maior número de casos com 335 casos de aids notificados, seguido do Mato Grosso do Sul com 187 casos, o Estado do Mato Grosso com 166 casos e por último o Distrito Federal com 180 casos de aids notificados (Saúde 2010).

A falha ao tratamento ARV vem se tornando um grande desafio de saúde pública aos pacientes multi-resistentes a estes medicamentos. Levando-se em consideração que estes indivíduos já experimentaram todas as classes de fármacos ARVS, torna-se uma incógnita a próxima escolha terapêutica a ser adotada pelo clínico. Atualmente com a terapia ARV universal no Brasil, é natural o surgimento de mutações de resistência associadas aos ARVs. Há alguns anos, pesquisadores que trabalhavam com pacientes infectados com HIV tinham enormes dúvidas sobre a real utilidade dos testes de resistência. Hoje o clínico pode utilizar métodos como a genotipagem, para elucidar conceitos como resistência primária, resistência secundária, resistência cruzada e barreira genética dos medicamentos contra o HIV. O uso das valiosas informações obtidas pelos testes de genotipagem traz grandes benefícios como a diminuição da incidência da falha terapêutica e o melhor esquema terapêutico a ser adotado. Atualmente, este teste é um excelente guia para a troca dos medicamentos na falha à terapia ARV. O clínico obtém melhores resultados quando se baseia nestes testes para prescrever os medicamentos.

Em continuidade a linha de investigação do Laboratório de Imunologia da Aids e Haseníase/IPTSP/UFG para identificar e monitorar a dinâmica da diversidade do HIV-1 e a resistência viral associada aos fármacos ARVs, o presente estudo propôs-se a avaliar o vírus HIV-1 de pacientes recrutados entre os anos de 2008 e 2010, nos Estados de Goiás e do Mato Grosso do Sul. Ressaltamos a extrema relevância da técnica de sequenciamento genético automatizado para os fragmentos gênicos da TR, PR e *env* gp41 uma vez que os nossos

resultados do sequenciamento permitiram a análise filogenética, identificação de mutações associadas aos ARVs de pacientes HIV-1⁺ com tratamento (resistência secundária), sem tratamento ARV (resistência transmitida) e a determinação genética dos subtipos genéticos do HIV-1 circulantes nestes Estados. As análises obtidas sobre a diversidade genética e principalmente resistência do HIV-1 foram repassadas para os médicos destes pacientes sem nenhum custo, o que pode ter auxiliado para uma melhor definição do esquema terapêutico para os pacientes infectados com o HIV-1 do MS e GO. Ressalta-se também, que a técnica de genotipagem é uma técnica que requer financiamentos altos e pessoas habilitadas no seu procedimento, o que dificulta a disponibilização desta ferramenta pelo Ministério da Saúde, a todos os pacientes HIV -1⁺.

Outro fator importante do nosso estudo é em relação ao T-20, um medicamento novo e importante para o esquema resgate de pacientes em falha terapêutica frente aos ARVs das classes convencionais (IPs, ITRNs e ITRNNs). As análises do gene *env gp41* do HIV-1 auxilia no monitoramento e identificação de mutações de resistência associadas a esta nova classe de inibidores de fusão.

O presente estudo de identificação de mutações de resistência do vírus HIV-1 e do mapeamento genético molecular nos Estados da região Centro-Oeste, auxilia a compor o cenário brasileiro em relação a infecção pelo HIV-1, uma vez que são poucos os estudos já realizados em determinados estados do Centro Oeste, como Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. O conhecimento sobre a variabilidade genética molecular do HIV-1 é importante também para testes laboratoriais (sorologia e carga viral), uma vez que os testes para o diagnóstico laboratorial deverão ser capazes de identificar qualquer variante do vírus e no desenho de vacinas candidatas, de forma a contemplar a diversidade regional.

O Brasil apresenta uma taxa de transmissão de resistência transmitida considerada de baixa a moderada. Acompanhar as modificações nas taxas de resistência primária nos locais

onde os medicamentos são amplamente utilizados é de extrema relevância quando a taxa de resistência ultrapassa 5%. Prisioneiros em tratamento com ARVs apresentam uma alta taxa de falha virológica, o que sugere uma baixa adesão ao esquema ARV na população carcerária. Quando a resistência aos ARVs está presente nesta população, isto acontece principalmente frente aos medicamentos que apresentam uma baixa barreira genética, como os fármacos da classe dos ITRNs. Nossos resultados ressaltam a importância e contribuem para uma melhor intervenção de saúde pública na população de presidiários no país, principalmente no Centro-Oeste Brasileiro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Pesquisar mutações associadas à resistência transmitida, secundária e a diversidade genética do HIV-1 nos fragmentos dos genes *pol* e *env* em pacientes do Mato Grosso do Sul e Goiás.

3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a prevalência de mutações associadas à resistência transmitida a ARVs em pacientes HIV-1⁺ virgens de tratamento provenientes do Mato Grosso do Sul, mediante o sequenciamento genético molecular nas regiões PR, TR e *env* gp41;
2. Caracterizar os subtipos e os recombinantes de pacientes virgens de tratamento do Mato Grosso do Sul infectados pelo HIV-1 nos genes *pol* e *env*;
3. Avaliar a prevalência de mutações associadas à resistência secundária a ARVs em pacientes HIV-1⁺ presidiários provenientes do Mato Grosso do Sul e Goiás;
4. Avaliar por inferência filogenética possível transmissão intrapresídio entre os pacientes presidiários;
5. Caracterizar os subtipos e os recombinantes de pacientes presidiários dos Estados do Mato Grosso do Sul e Goiás infectados pelo HIV-1 nos genes *pol*.

4. ARTIGOS

HIV-1 MOLECULAR EPIDEMIOLOGY IN *pol* AND *gp41* GENES AMONG NAIVE PATIENTS FROM MATO GROSSO DO SUL STATE, CENTRAL WESTERN BRAZIL

Alexsander Augusto da Silveira¹

Ludimila Paula Vaz Cardoso¹

Roberta Barbosa Lopes Francisco

Mariane Martins de Araújo Stefani¹

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF HIV-1 INFECTION AMONG PRISONERS FROM CENTRAL WESTERN BRAZIL

Ludimila Paula Vaz Cardoso¹

Alexsander Augusto da Silveira¹

Roberta Barbosa Lopes Francisco²

Mônica Nogueira da Guarda Reis¹

Mariane Martins de Araújo Stefani^{1*}

HIV-1 MOLECULAR EPIDEMIOLOGY IN *pol* AND *gp41* GENES AMONG NAIVE PATIENTS FROM MATO GROSSO DO SUL STATE, CENTRAL WESTERN BRAZIL

Alexsander Augusto da Silveira^{1†}

Ludimila Paula Vaz Cardoso^{1†}

Roberta Barbosa Lopes Francisco²

Mariane Martins de Araújo Stefani^{1*}

Affiliation:

¹Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia city/Goiás State, Brazil.

²Public Health Central Laboratory - LACEN - of Campo Grande city/Mato Grosso do Sul State, Brazil.

† These authors equally contributed to this manuscript and share the first authorship.

Running title: HIV-1 diversity and resistance in central western Brazil.

***Correspondence to:** Mariane Martins de Araújo Stefani. Address: Universidade Federal de Goiás - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia-Goiás/Brasil. Phone: 55 62 3209 61 11. Fax: 55 62 3209 6363. email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Abstract

Antiretroviral naive patients (n=49) were recruited in central western Brazil (Campo Grande city/Mato Grosso do Sul State, located across Bolivia and Paraguay borders). HIV-1 protease (PR), reverse transcriptase (RT) and *env* gp41 HR1 fragments were sequenced. Genetic diversity was analyzed by REGA/phylogenetic analyses. Intersubtype recombinants were identified by Simplot/phylogenetic trees. PR/RT resistance was analyzed by Calibrated Population Resistance/Stanford databases. T-20 resistance in gp41 was assessed by Stanford, Los Alamos and other sources. HIV-1 subtype B^{PR}B^{RT} were 65.3%, 10.2% were C^{PR}C^{RT}, 8.2% were F1^{PR}F1^{RT}. Intersubtype recombinants were 16.3%: four B/F1, four B/C (two were “CRF31_BC-like”). Pol-RT V75M mutation was detected in two homosexual partners; one patient had T215S revertant mutation. T-20/gp41 resistance mutations were L44M (n=2), V38A (n=1). High percentage of non-B isolates (~35%) highlight the importance molecular surveillance studies in settings distant from the origin of the epidemic. Our data help compose the molecular epidemiology map of HIV-1 in Brazil.

Different regional patterns have been observed in the AIDS epidemic in Brazil, the largest country in Latin America. The State of Mato Grosso do Sul, in central western Brazil, presents interesting epidemiological features for a study site about HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance. Mato Grosso do Sul State borders Bolivia and Paraguay and represents an important route of entry of illegal drugs which are then distributed to the rest of the country. The possible impact of injecting drug use in HIV-1 diversity and drug resistance in this setting has not been explored. Moreover migrants, especially from southern Brazil are an important component of the population in this state.

HIV-1 subtypes B, F1, C and D co-circulate in Brazil.¹ In the last years several recombinant viruses including circulating recombinant forms (CRFs) and unique recombinant forms (URFs) mainly with subtypes B/F1 and B/C have been described.²⁻⁴ The identification of subtypes circulating in smaller urban centers distant from the origin of the epidemic will contribute to form the actual molecular epidemiology map of HIV-1 in the country.⁵⁻⁷

First line antiretroviral (ARV) treatment options comprise different combinations of nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI and NNRTI) or protease inhibitors (PI).⁸ In Brazil ARV therapy is offered free of cost by the public health system since 1996. The prevalence of transmitted drug resistance mutations among naïve patients varies in developed and developing countries and correlates with the level of exposure of the population to ARV drugs. Most recent studies have shown mostly low (<5%) to moderate (5-15%) levels of transmitted drug resistance in Brazil.^{1,9}

The fusion inhibitor Enfuvirtide (T-20), a synthetic 36 amino acid peptide, binds to the heptad repeat 1 (HR1) domain preventing its interaction with the heptad repeat 2 (HR2) which is required for the entry of HIV-1 into host cells.¹⁰ T-20 has been recommended for salvage therapy in highly ARV experienced patients.

This study describes HIV-1 phylogenetic diversity and transmitted resistance mutations in the protease (PR), reverse transcriptase (RT) and *env* HR1 gp41 fragments among ARV naïve patients recruited in Mato Grosso do Sul State. Consecutive ARV naïve patients infected with HIV-1 were recruited in 2008 (July-December) and 2010 (August-November) at the Central Laboratory/LACEN and “Hospital Dia Professora Esterina Corsini” in Campo Grande City (766,461 inhabitants), capital of the state of Mato Grosso do Sul. Patients infected with HIV-1, from both sexes, above 18 years, who had never been exposed to any ARV lifelong were included. Local ethic committees approved this study (“Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Dia Professora Esterina Corsini/Mato Grosso do Sul” protocol # 435/CEP-HUJM/07 and “Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal da Universidade Federal de

Goiás” protocol # 073/05). Signed informed consents were obtained from all participants. Standardized questionnaires were used to collect socio demographical, clinical and laboratory data. Exposure category of three patients, viral load of one patient and CD4 cell counts of two patients were not available.

Plasma RNA was extracted and transcribed to obtain complementary DNA. The entire HIV-1 PR, approximately 750-bp of RT fragment and 766-bp of HIV-1 gp41 fragment (HR1 region) were amplified by nested polymerase chain reaction (nested-PCR). The amplified products were directly sequenced in an automatic sequencer as previously described.^{6,11} HIV-1 subtypes were identified using REGA tool and by phylogenetic inference. Phylogenetic trees were performed by Neighbor-Joining under Kimura’s two-parameter correction (1000 *bootstrap*) (MEGA4 software) as previously reported.^{6,11} PR/RT intersubtype recombinations were analyzed by Simplot 3.5.1 (200 bp window/20 bp increments) and by phylogenetic analyses of individual fragments.^{6,11} HIV-1 recombinant breakpoints were mapped using the Recombinant HIV-1 Drawing Tool available at the Los Alamos HIV-1 site (<http://www.hiv.lanl.gov>) which is based on the HXB2 genome.

Transmitted drug resistance in PR/RT and *env* gp41 was analyzed using the Calibrated Population Resistance tool (Stanford Surveillance Drug Resistance Database) as previously described.⁶ HIV-1 *env* gp41 resistance mutations to T-20 were defined by Stanford online HIV Drug Resistance Database (<http://hivdb.stanford.edu/cgi-bin/FIResiNote.cgi>), by International AIDS Society Database and other sources as reported.¹¹

Frequencies, medians of main variables were assessed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software for Windows version 13.0 (Chicago, IL, USA).

Naïve patients recruited were: 61.2% (30/49) males, median age 36 years (range 19-64 years), 67.3% (33/49) referred heterosexual unprotected sex and 26.6% (13/49) were men who have sex with men. The median of CD4 cell counts was 392 cells/ μ L (range 46-1246 cells/ μ L) and the median of the viral loads was 20,416 copies/mL (range 79-268,674 copies/mL).

A high percentage of non-B HIV-1 isolates was detected (~35%): 10.2% (5/49) were subtype C, 8.2% (4/49) were subtype F1 and 16.3% (8/49) were intersubtype recombinants in the PR/RT fragments. HIV-1 subtype B represented 65.3% (32/49) (Figure 1). No relevant difference was observed in HIV-1 subtypes circulating among heterosexual and homosexual patients. The following recombination profiles were observed within PR/RT fragments: F1^{PR}/B^{RT} (n=2), F1B^{PR}/BF1B^{RT} (n=1), BF1^{PR}/F1B^{RT} (n=1), B^{PR}/BC^{RT} (n=1), C^{PR}/CB^{RT} (n=2) and C^{PR}/CBC^{RT} (n=1) (Figure 2). The two C^{PR}/CB^{RT} isolates identified in this study were classified as CRF31_BC-like by REGA analysis.³ In terms of profiles and breakpoints none of the B/F1

recombinants reported resembled CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF or CRF40_BF previously described in southeastern Brazil.^{2,4} Taking into account the HIV-1 genetic diversity in the three fragments sequenced (PR/RT and *env* gp41) the percentage of potential recombinants increased from 16.3% to 24.8%. Full-length or near full-length genomes are necessary to elucidate whether these recombinants identified in Mato Grosso do Sul State are any of the already described CRFs, another CRF or yet URFs.

A relatively high rate of HIV-1 subtype C was found (~10%) in Mato Grosso do Sul State where an important southern-western migration flow took place in the last decades due to larger areas for livestock breeding and agriculture. It is possible that subtype C in this state was introduced by these southern migrants since differently from the rest of the country HIV-1 subtype C prevails among patients from southern Brazil. In fact phylogenetic analyses confirmed the monophyletic clustering of subtype C circulating in Mato Grosso do Sul State and subtype C sequences from southern Brazil (Figure 1). In the central western state of Goiás, where this southern migration has not been as evident, subtype C still represents a minor genetic variant.^{1,3,9} All HIV-1 isolates classified as subtype C in the *pol* region were assigned to another subtype in gp41 region, representing possible recombinant viruses. These results indicate that HIV-1 subtype C may be also circulating as a recombinant among patients from Mato Grosso do Sul State.

We acknowledge that our sample size is not representative of the patients infected with HIV-1 from Mato Grosso do Sul State. Therefore we preferred to describe the individual mutations associated with resistance instead of calculating the estimated prevalence of transmitted resistance. Two homosexual partners had the transmitted *pol*-RT V75M mutation to NRTI which causes intermediate resistance to stavudine (d4T) and low resistance to didanosine (ddI). Another patient presented the *pol*-RT revertant mutation T215S. Revertants T215S/C/D/E/I/V are considered transitions between wild type and the Y and F mutations. Although they usually do not reduce NRTI susceptibility, their presence suggests that T215Y/F had either been present or may be present as minority populations. In the neighboring state of Goiás (central western) and in Tocantins State (northern) moderate rates of transmitted resistance (around 10%) have been recently reported.^{6,7} Knowledge about HIV-1 transmitted resistance on a population level can be useful for improved prevention and treatment decisions.

Although resistance is uncommon in patients never treated with T-20, resistance mutations in treatment naïve patients have been described.^{12,13} Three naïve patients, harboring subtype B presented transmitted resistance mutations to T-20: L44M mutation (n=2) and the V38A mutation (n=1). T-20 mutations have been observed in multidrug resistant patients, never treated

with T-20, suggesting that highly active antiretroviral therapy could have selected these mutations.¹⁴ In Goiás State (central western Brazil) around 20% of isolates from multidrug resistant patients presented G36E, N42T and N43S mutations to T-20.¹¹

The *pol* and *env* sequences from this region are among the first HIV-1 sequences from this central western Brazilian State deposited in the GenBank. In this sense, the molecular data about Mato Grosso do Sul State presented in this study contribute to map HIV-1 diversity in a country of continental territorial dimensions as Brazil. These results highlight the importance of surveillance studies on HIV-1 diversity and drug resistance among patients from settings distant to the origin of the epidemic.

Acknowledgments

This study was supported by UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health (Grant #310-06). Stefani MMA is a recipient of a fellowship from The National Counsel of Technological and Scientific Development/CNPq (grant #304869/2008-2) and Silveira AA (grant#141211/2008-3) and Cardoso LPV (grant# 141820/2006-3) were supported by scholarships from CNPq.

Sequence Data

The GenBank accession numbers of the sequences presented in this study are JF342273-JF342353.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, *et al.*: Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. J Int AIDS Soc 2009;12: 20.
2. Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM.: Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2006; 22:1-13.

3. Santos AF, Sousa TM, Soares EA, *et al.*: Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 2006;20:2011-2019.
4. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG.: Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008; 22:433-435.
5. Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Morgado MG.: Prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in treatment-naïve and experienced patients from resource-limited settings with universal access to antiretroviral therapy: a survey in two small Brazilian cities. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:143-149.
6. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM.: HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 2009;46:134-139.
7. Carvalho BC, Cardoso LV, Damasceno S, Stefani MM. 2011. Moderate Prevalence of Transmitted Drug Resistance and Interiorization of HIV-1 Subtype C in The Inland North State of Tocantins, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. Epub ahead of print.
8. Shafer RW.: Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:247-277.
9. Sprinz E, Netto EM, Patelli M, *et al.*: Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:861-867.
10. Derdeyn CA, Decker JM, Sfakianos JN, *et al.*: Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to fusion inhibitors targeted to the gp41 first heptad repeat involves distinct regions of gp41 and is consistently modulated by gp120 interactions with the coreceptor. *J Virol* 2001;75:8605-8614.
11. Cardoso LPV, Stefani MM.: High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 *pol* gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009;25:943-950.

12. Peuchant O, Capdepon S, Ragnaud JM, *et al.*: Primary resistance to enfuvirtide (T20) in recently HIV-1 infected, antiretroviral-naïve patients from the ANRS Aquitaine Cohort. *Antivir Ther* 2007;12:559-562.
13. Carmona R, Perez-Alvarez L, Munoz M, *et al.*: Natural resistance-associated mutations to Enfuvirtide (T20) and polymorphisms in the gp41 region of different HIV-1 genetic forms from T20 naïve patients. *J Clin Virol* 2005;32:248-253.
14. Oliveira ACA, Martins AN, Pires AFNPC, *et al.*: Enfuvirtide (T-20) Resistance-Related Mutations in HIV Type 1 Subtypes B, C and F Isolates from Brazilian Patients Failing HAART. *Aids Research and Human Retroviruses* 2009;25:193-198.

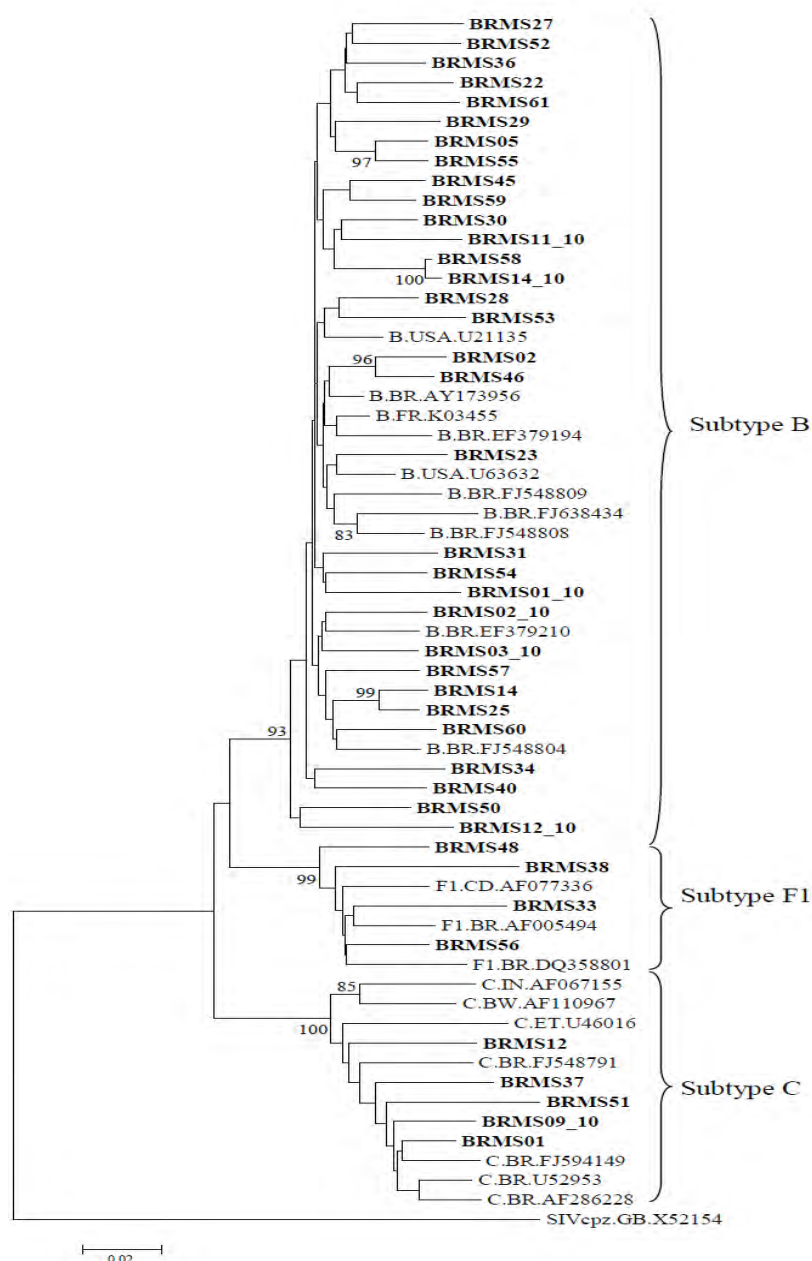


FIGURE 1. Phylogenetic of HIV-1 isolates in the PR and RT fragments among HIV-1 isolates from Mato Grosso do Sul State. *Bootstrap* values above 70% were considered significant. The isolates characterized in this study are given in bold. GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analyses are subtype B: U21135, AY173956, K03455, EF379194, U63632, FJ548809, FJ638434, FJ548808, EF379210 and FJ548804; subtype C: AF067155, AF110967, U46016, FJ548791, FJ594149, U52953 and AF286228; subtype F1: AF077336, AF005494 and DQ358801 and the simian immunodeficiency virus sequence from chimpanzee (SIVcpz): X52154.

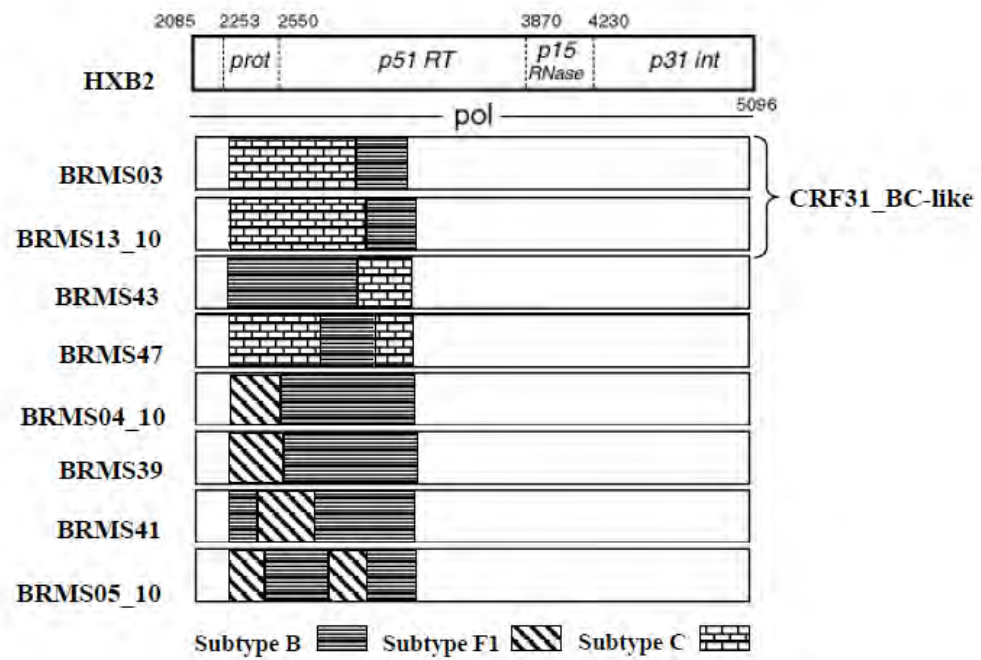


FIGURE 2. Map of recombinant breakpoints of HIV-1 isolates from Mato Grosso do Sul State.

High Prevalence of Secondary HIV-1 Drug Resistance Mutations, Striking Genetic Diversity and Possible Intraprison Transmission Cases Among Subgroups of Prisoners from Central West Brazil

Alexsander Augusto da Silveira¹

Ludimila Paula Vaz Cardoso¹

Roberta Barbosa Lopes Franscisco²

Mônica Nogueira da Guarda Reis¹

Mariane Martins de Araújo Stefani^{1*}

¹Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia city/Goiás State, Brazil.

²Central Laboratory - LACEN of Campo Grande city/Mato Grosso do Sul State, Brazil.

Keywords: HIV-1, resistance mutations, phylogeny, prison, Brazil.

Abstract

Objectives: To investigate mutations associated with secondary resistance to nucleoside/non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI/NNRTI) and protease inhibitors (PI) and HIV-1 phylogenetic diversity among antiretroviral (ARV) experienced prisoners from Central West Brazil.

Patients and methods: 27 prisoners were recruited in 3 prisons (16 males/4 females from Mato Grosso do Sul State; 7 males from Goiás State). Median age was 35 years (range 21-58), 7 males/2 females reported intravenous drug use (IVDU), 3 males referred homosexual practice. Protease (PR) and reverse transcriptase (RT) genes were directly sequenced after nested-PCR. HIV-1 subtypes were identified using REGA tool and by phylogenetic analysis. Simplot software was used for HIV-1 intersubtype recombination analysis. ARV resistance was analyzed by Stanford HIV Drug Resistance Database and International Aids Society mutation list.

Results: ARV resistance mutations were present in 37% (10/27): 5/10 presented NRTI+NNRTI mutations, 3/10 had NRTI mutations, 2/10 were multidrug resistant. HIV-1 subtype B represented 48%, subtype C were 11%. Complex recombinations patterns were observed in 41%: F1^{PR}/B^{RT}; B^{PR}/F1^{RT}; F1B^{PR}/B^{RT}; F1B^{PR}/BC^{RT}; B^{PR}/BCB^{RT}; C^{PR}/CBC^{RT}. Phylogenetic analyses using local sequences indicated isolates with high support values suggestive of intraprisson transmission in Mato Grosso do Sul: 2 females with subtype C reporting IVDU; 2 clusters among males: one represented by subtype B, another by BF1 recombinants from homosexual inmates.

Conclusions: The high rate of secondary ARV resistance suggesting poor compliance to ARV, complex HIV-1 recombination patterns and the possible intraprisson transmission clusters observed highlight the need of improved prevention, counseling and treatment strategies for prisoners by public health institutions.

Introduction

Challenges, barriers and difficulties to study marginalized groups contribute to the scarce information about HIV/AIDS epidemic among minorities, such as prisoners who are at a greater risk of infection.¹ Risk behaviors in prisons including unprotected sexual activity, parenteral exposure from activities, such as tattooing and piercing and in particular, intravenous drug use (IVDU) and its related needle/syringe sharing, favor the acquisition and transmission of sexually transmitted diseases (STD) and specially blood-borne pathogens.^{2,3} Most infected inmates probably acquire HIV-1 infection through IVDU before incarceration, however, cases of HIV-1 transmission within prison settings have been well documented.^{4,5} Moreover the dynamic interchange between the nonincarcerated population and prisoners highlights their importance in the dissemination of HIV-1 and other pathogens to the outside community.

Especially in developing countries health and patient management inside correctional institutions are generally poor with limited access to prevention, diagnosis, and treatment programs including highly active antiretroviral treatment (HAART) consisting of nonnucleoside/nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI/NRTI) and protease inhibitors (PI). Adherence to HAART among prisoners remains a challenge due to high risk behaviors and illicit drug consumption and may lead to the selection of mutations associated with resistance. Drug resistance mutations are considered the main reason for the failure of HAART over time.⁶

The molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil is characterized by the prevalence of subtype B in the vast territory, except in the south region, where subtype C predominates. “Pure” HIV-1 subtypes F1 and subtype C have been sporadically identified in other Brazilian regions and a growing number of recombinant forms, including circulating recombinant forms (CRFs) and unique recombinant forms (URFs), involving mainly HIV-1 subtypes B and F1 have been reported.⁷⁻¹³

Knowledge about the antiretroviral (ARV) resistance mutations and HIV-1 subtypes among high risk and hard-to-reach groups, such as prisoners can lead to adequate intervention and prevention programs. This study describes the prevalence of mutations associated with secondary resistance to protease (PR) and reverse transcriptase (RT) inhibitors among subgroups of treatment-experienced inmates infected with HIV-1. HIV-1 diversity and phylogenetic links are also reported.

Patients and methods

This study included 27 prisoners with confirmed diagnosis of HIV-1 infection prescribed with ARV, recruited between 2008-2009 during routine clinical counseling at prisons located in two different capitals from Central West Brazil. Sixteen males patients were recruited at “Penitenciária Federal de Segurança Máxima de Campo Grande-IPCG/MS” in Mato Grosso do Sul State/MS and 4 females were recruited at “Presídio Feminino Irmã Irma Zorzi” in MS State. In Goiás State/GO, 7 males prisoners were recruited at “Casa de Prisão Provisória/Complexo Prisional de Aparecida de Goiânia”. This study group represented between 30% (in the male institutions from MS State and GO State) and 80% (in the female institution from MS State) of the total prisoners with confirmed diagnosis of HIV-1 infection during the recruitment period in each correctional institution. Institution review boards (“Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul”-protocol # 1143) and (“Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás”-protocol # 073/05) approved this study.

After RNA extraction from plasma (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Germany), reverse transcription was performed to obtain complementary DNA (cDNA) (Invitrogen,USA). The entire HIV-1 PR gene and approximately 750 bp fragment of the RT gene were amplified by nested polymerase chain reaction (nested-PCR). After amplicon purification (QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen, Germany), amplified products were directly sequenced using the Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems, USA) in an automatic sequencer (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA).

Phylogenetic Analysis

HIV-1 subtypes were identified using REGA automated genotyping tool version 2.0 and phylogenetic inference.¹⁴ All sequences were aligned using Clustal X software and the trees were performed by Neighbor-Joining (NJ) method under Kimura’s two-parameter correction (1000 bootstrap) using MEGA4 software.¹⁵⁻¹⁷ Bootstrap values above 70% were considered significant. Isolates suggestive of HIV-1 intersubtype recombination in PR/RT genes were analyzed by Simplot 3.5.1 software in 200 bp sliding window advanced in 20 bp steps size increments.¹⁸ Sequences were gap-stripped, the transversion-to-transition ratio was set to 2.0, and distances were calculated according to Kimura’s two-parameter model. For isolates in which 2 or more subtypes were identified by Simplot software, the recombination within PR

and RT genes were also confirmed by phylogenetic analyses of individual fragments assigned to different subtypes in each gene, regardless of the size of the fragment.

For the investigation of possible phylogenetic links, phylogenetic analysis included local sequences from HIV-1 patients living outside prisons in Goiás State (GenBank accession numbers: FJ548787–FJ548805; FJ548808–FJ548818; FJ548820–FJ548823; FJ594127–FJ594134; FJ594136–FJ594177 and FJ594180–FJ594185) and in Mato Grosso do Sul State (GenBank accession numbers: JF342273–JF342274; JF342276–JF342291; JF342293; JF342296–JF342297; JF342299–JF342314; JF342317–JF342321, unpublished).¹¹ The unpublished sequences from MS State are among the first regional sequences from this area deposited in the GenBank.

Resistance Analysis

ARV mutation susceptibility profile in PR and RT genes was analyzed by Stanford HIV Drug Resistance Database and the International AIDS Society (IAS-USA) major mutation list (accessed: February/2011).^{19,20}

GenBank accession numbers of the sequences presented in this study are HQ831450–HQ831476.

Statistical Analysis

Frequencies and medians of main variables were assessed using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software for Windows version 13.0 (Chicago, IL, USA).

Results

The median age of male patients from Mato Grosso do Sul State (n=16) was 34 years (range 21–52 years), 4/16 patients related to be IVDU and 3/16 were men who have sex with men (MSM). The median of CD4 cell counts was 232.5 cells/ μ L (range: 227–664 cells/ μ L) and the median of plasma viral loads (PVL) was 26263.5 copies/mL (range: 2009–243422 copies/mL). Among female prisoners the median age was 33 years (range: 27–48 years), the median of CD4 cell counts was 243.5 cells/ μ L (range: 241–262 cells/ μ L) and the median of PVL was 5833 copies/mL (range: 375–102414 copies/mL). Two of these patients reported IVDU. Regarding male prisoners from Goiás State the median age was 40 years (range: 28–58

years), the median of CD4 cell counts was 186 cells/ μ L (range: 57-405 cells/ μ L) and the median of PVL was 30530 copies/mL (range: 2005-303496 copies/mL). Three of these patients reported IVDU and the others referred heterosexual risk.

Altogether 10/27 (37%) of prisoners infected with HIV-1, prescribed with ARV therapy, presented HIV-1 drug-resistance mutations. Table 1 depicts the individual mutation profiles among prisoners and the level of resistance to distinct ARV drugs. The most frequent resistance mutations observed were K103N NNRTI mutation (7/10), followed by M184V (6/10) and M41L NRTI mutations (4/10) and K101Q NNRTI mutation (4/10). Resistance mutations associated with two ARV classes predominated (NRTI+NNRTI=5/10), 3 patients had resistance mutations associated with NRTI only and 2/10 patients were considered multidrug resistant (MDR) since resistance mutations associated to all three classes of ARV (NNRTI+NRTI+PI) were observed.

The phylogenetic classification of HIV-1 isolates from all prisoners in PR/RT genes indicates that HIV-1 subtype B^{PR}B^{RT} were 48% (13/27), subtype C^{PR}C^{RT} were 11% (3/27) and 41% (11/27) of the isolates were diverse and complex recombinants: F1^{PR}/B^{RT} (n=5); B^{PR}/F1^{RT} (n=2); F1B^{PR}/B^{RT} (n=1); F1B^{PR}/BC^{RT} (n=1); B^{PR}/BCB^{RT} (n=1) and C^{PR}/CBC^{RT} (n=1) (Figure 1).

Phylogenetic analyses including prisoners' HIV-1 isolates and local sequences from patients living outside prisons indicated clusters suggestive of intraprisson transmission links. In these analyses, prisoners' HIV-1 isolates remained clustered with high bootstrap values. The closely related HIV-1 subtype C BRMS28/BRMS44 isolates from two IVDU female prisoners may represent intraprisson transmission (Figure 2A). The same is true for HIV-1 subtype B BRMS97/BRMS99 and for BRMS206/BRMS257 isolates which are BF1 recombinants. These two clusters were detected in the male correctional institution in Mato Grosso do Sul State (Figure 2B). These findings suggest that these clusters with high bootstrap values identified among prisoners probably do not result from geographical grouping and may indicate possible intraprisson transmission links. Phylogenetic trees with prisoners isolates and local sequences from Goias State did not indicate any cluster with high support value.

Discussion

This study describes remarkable molecular features including ARV resistance mutations and HIV-1 molecular epidemiology among subgroups of high risk and hard-to-reach inmates recruited in Central West Brazil. Especially in developing countries, prisons have been recognized as hotspots of several infectious diseases including HIV-1 due to overcrowding, poor health assistance and risk behaviors including IVDU, promiscuity, unsafe homosexual intercourse and lack of hygiene.

The high prevalence of secondary drug resistance mutations observed is compatible with poor compliance to drugs, which is frequent among high risk behaviour groups as inmates. Under low adherence, selection of resistance mutations by drugs with a low genetic barrier or with prolonged plasma half lives, such as efavirenz (EFV-NNRTI) and lamivudine (3TC-NRTI) can be expected.^{21,22} In fact, in this study the most frequent mutations associated with resistance were K103N mutation to EFV which is currently the main NNRTI used in Brazil. The rate of mutations associated with drug resistance observed in this study (37%) is similar to the rate observed among treatment experienced inmates from Spain.²³

Several participants of this study reported IVDU especially inmates from Mato Grosso do Sul State, which is a known drug entry and traffic route from Bol via and Colombia into Brazil. IVDU is an important exposure category in this area. IVDU and lack of compliance to therapy are frequent among prisoners infected with HIV-1. Apprehension and stress inside prisons may contribute to nonobservance or discontinuation of prescribed treatment.^{3,24} Additionally some prisoners may deliberately discontinue ARV to gain legal benefits from deteriorating health conditions such as anticipated release, temporary or definitive suspension of imprisonment, deferral of detention, and home arrest, depending on the country's legislation.

Transmission of HIV-1 inside prisons is an important public health issue. Usually HIV-1 positive inmates become infected before incarceration, however transmission can also occur within prisons.^{25,26} The *pol* phylogenetic analyses from this study indicated 6 isolates in three clusters that suggest intraprison transmission links. These isolates showed high support values in phylogenetic trees including samples from the same city but from patients outside prisons. Although only 4 females of one correctional institution from MS State were included, two of them, who reported IVDU, shared HIV-1 subtype C virus with a very high support value. Sharing of needles is known to be common inside prisons. Possible transmission links among IVDU illustrates why illicit drug consumption represents a potentially explosive health care problem in prisons.

In the male prison from MS State, two clusters, one among homosexual prisoners, also suggest intraprisson transmission links. None of the cases suggestive of intraprisson transmission had drug resistance mutations. Molecular studies showing intraprisson transmission clusters of HIV-1 were well described in Scotland.^{4,5} Clonal analysis of the viruses herein presented, although not performed, could corroborate these findings.

In this study the prevalence of HIV-1 subtype C among inmates was higher than previously reported for this geographic region.¹⁰ Our phylogenetic analyses confirmed the monophyletic profile of subtype C viruses circulating in Mato Grosso do Sul State indicating that this subtype that originated in the south is spreading in inland Brazil. As demonstrated by other Brazilian studies, a high percentage of recombinant viruses (41%), mainly B/F1 were observed. Only full-length or near-full-length sequences from these isolates can indicate new or already described circulating recombinant forms or unique recombinant forms. Co-infection and superinfection with different HIV-1 subtypes among these high risk behavior patients are compatible with higher chances of recombination events. Surveillance of HIV-1 infection among special subgroups, such as prisoners, should include molecular data on subtypes identifying the entry and dissemination of new variants within this high risk group.

We acknowledge that our sample size is not representative of the entire inmate population in Brazil. However the remarkable HIV-1 genetic diversity, especially the complex recombination patterns, the high rate of secondary drug resistant mutations and the possible intraprisson transmission links reported herein, represent important public health issues. These data indicate the need for routine surveillance of HIV-1 infection and the use of resistance genotypic tests among inmates. Moreover our data highlight also the need for improved prevention, counseling and treatment strategies for prisoners by the public health institutions. Considering the high disease burden and risk behaviors inside correctional facilities and the dynamic relationships of prisoners with the outside community, great benefits could be achieved from specific programs aimed at STD and HIV prevention, screening, and treatment.

Acknowledgments

We thank all the educators and social workers of the prisons where patients were recruited for their administrative support and technical assistance.

Funding

This work was supported by United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization/UNESCO and AIDS National Program, Brazilian Ministry of Health (grant #310-06). Stefani MMA is a recipient of a fellowship from The National Counsel of Technological and Scientific Development/CNPq (grant #304869/2008-2) and Cardoso LPV (grant# 141820/2006-3) and Silveira AA (grant#141211/2008-3) were supported by scholarships from CNPq.

.

References

1. Strazza L, Azevedo RS, Carvalho HB *et al.* The vulnerability of Brazilian female prisoners to HIV infection. *Braz J Med Biol Res* 2004; **37**:771-6.
2. Long J, Allwright S, Barry J *et al.* Prevalence of antibodies to hepatitis B, hepatitis C, and HIV and risk factors in entrants to Irish prisons: a national cross sectional survey. *BMJ* 2001; **323**:1209-14.
3. Thaisri H, Leritworapong J, Vongsheree S *et al.* HIV infection and risk factors among Bangkok prisoners, Thailand: a prospective cohort study. *BMC Infect Dis* 2003; **3**:25.
4. Yirrell DL, Hutchinson SJ, Griffin M *et al.* Completing the molecular investigation into the HIV outbreak at Glenochil prison. *Epidemiol Infect* 1999; **123**:277-82.
5. Yirrell DL, Robertson P, Goldberg DJ *et al.* Molecular investigation into outbreak of HIV in a Scottish prison. *BMJ* 1997; **314**:1446-50.
6. Briones C, Soriano V, González-Lahoz J. Prevalence of drug-resistant HIV-1 genotypes in heavily pre-treated patients on current virological failure. *AIDS* 2000; **14**:1659-60.
7. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC *et al.* Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; **17**:1063-9.
8. Brígido LF, Franco HM, Custodio RM *et al.* Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; **21**:673-82.
9. Soares EAJM, Martínez AMB, Souza TM *et al.* HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; **19**:81-6.
10. Stefani MM, Pereira GA, Lins JA *et al.* Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 2007; **39**: 205-9.

11. Cardoso LPV, Queiroz BB, Stefani MMA. HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 2009; **46**:134-9.
12. Sá-Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM *et al.* Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; **22**:1-13.
13. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC *et al.* Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008; **22**:433-8.
14. Oliveira T, Deforche K, Cassol S *et al.* An Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics* 2005; **21**:3797-800.
15. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**:4876-82.
16. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; **16**:111-20.
17. Tamura K, Dudley J, Nei M *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol and Evol* 2007; **24**:1596-9.
18. . Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS *et al.* Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999; **73**:152-60.
19. Shafer RW. Rationale and Uses of a Public HIV Drug-Resistance Database. *J Infec Dis* 2006; **194** Suppl 1:51-8.
20. Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B *et al.* Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med* 2010; **18**:156-63.

- 21.** Schuurman R, Nijhuis M, van Leeuwen R *et al.* Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine [3TC]. *J Infect Dis* 1995; **171**:1411-9.
- 22.** Bachelier LT, Anton ED, Kudish P *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 mutations selected in patients failing efavirenz combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**:2475-84.
- 23.** García-Guerrero J, Sáiz de la Hoya P, Portilla J *et al.* Prevalence of HIV-1 drug resistance mutations among Spanish prison inmates. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006; **11**:695-701.
- 24.** Small W, Wood E, Betteridge G *et al.* The impact of incarceration upon adherence to HIV treatment among HIV-positive injection drug users: a qualitative study. *AIDS Care* 2009; **21**:708-14.
- 25.** Spaulding A, Stephenson B, Macalino G *et al.* Human immunodeficiency virus in correctional facilities:a review. *Clin Infect Dis* 2002; **35**:305-12.
- 26.** Testa AC, Weilandt C, Ncube F *et al.* HIV transmission in part of the USA prison system: Implication for Europe. *Euro Surveill* 2006; **11**:E060525.2.

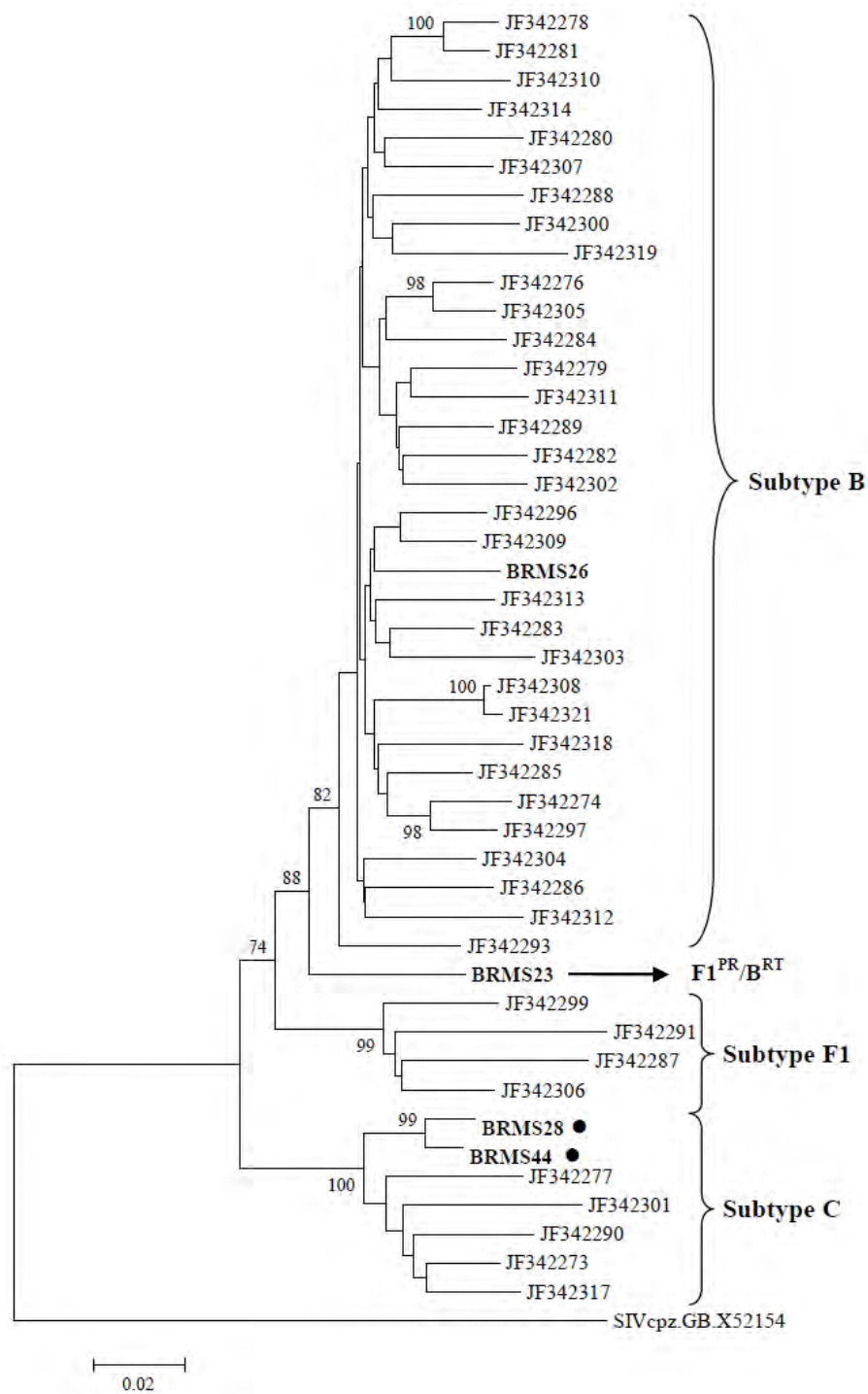


Figure 1. Phylogenetic analyses of HIV-1 in PR and RT fragments among female patients from Campo Grande/MS. The isolates characterized in this study are given in bold and the cluster is marked with ●.

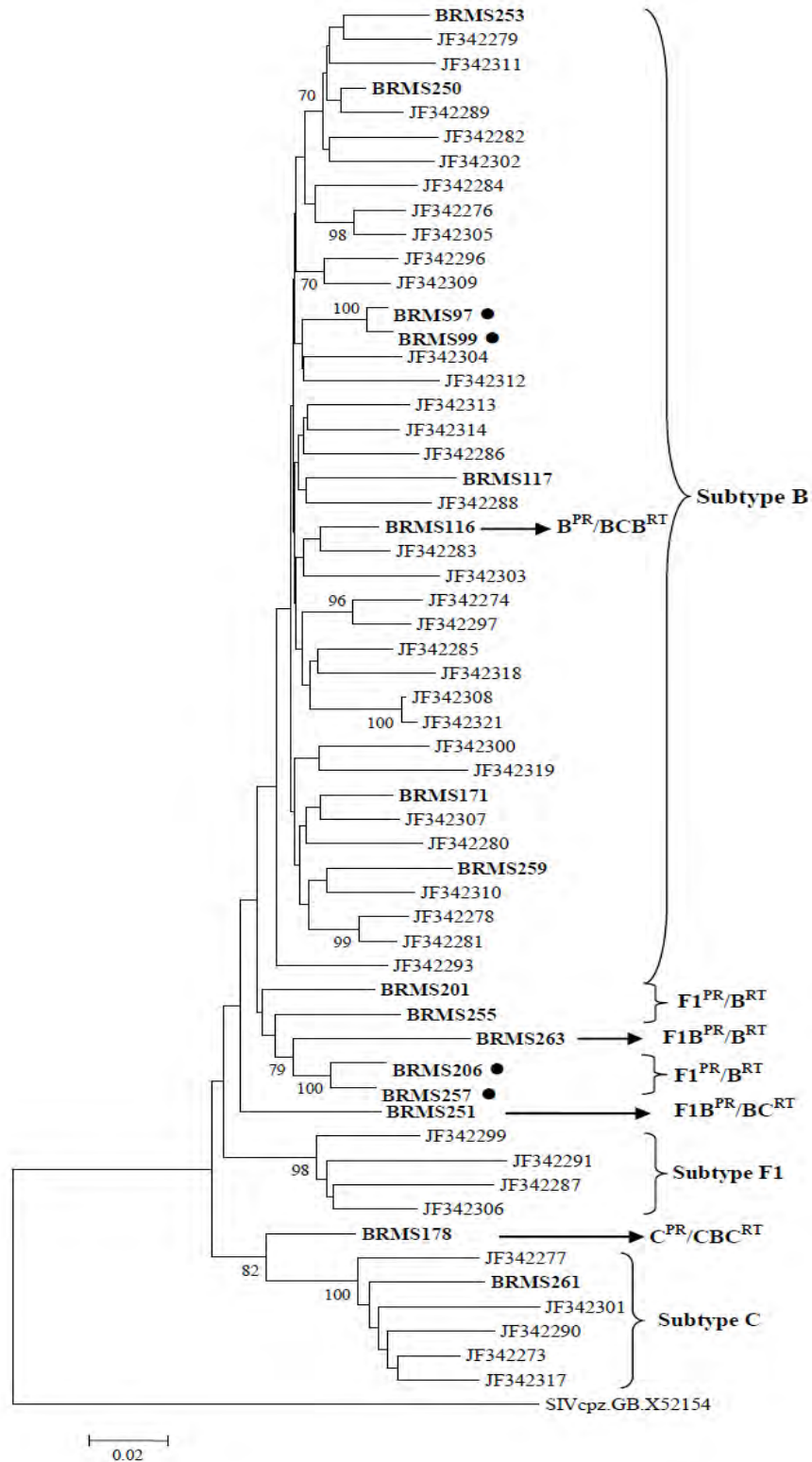


Figure 2. Phylogenetic analyses of HIV-1 in PR and RT fragments among male patients from Campo Grande/MS. The isolates characterized in this study are given in bold and the clusters are marked with ●.

5. CONCLUSÕES

- Dois pacientes sem tratamento ARV do MS, que relataram a prática de sexo com parceiro do mesmo sexo, apresentaram a mutação V75M de resistência aos ITRNs. Outro paciente apresentou a mutação de reversão T215S e quatro pacientes apresentaram vírus com a mutação V179D/E;
- Análises filogenéticas das amostras de pacientes não tratados do Estado do MS mostraram 87,3% destes pacientes com subtipos puros nos fragmentos da PR e TR do HIV-1. Os subtipos identificados nesta população foram os B (65,3%), C (10,2%) e F (8,2%). Em 16, 3% das amostras observaram-se formas discordantes nos fragmentos da PR e TR;
- Três pacientes sem tratamento ARV apresentaram resistência transmitida associada ao enfuvirtida (T-20);
- Quando analisado o fragmento do gene *env* gp41 do HIV-1 nos pacientes sem tratamento com ARV 84% das amostras apresentaram o subtipo B, 12,5% eram subtipo F1 e 3% subtipo C;

Nossos estudos mostraram que em pacientes sem tratamento ARV do MS houve uma baixa prevalência de resistência associada aos fármacos que atuam nas enzimas codificadas pelo gene *pol* e uma moderada prevalência de resistência transmitida associada ao T-20. Isso demonstra a necessidade do monitoramento das taxas de transmissão de resistência transmitida no Centro Oeste e subseqüentes estudos. Nosso estudo apresenta resultados importantes sobre resistência primária e diversidade genética do HIV-1 no Centro Oeste. Esses resultados auxiliaram a compor o cenário da diversidade genética do HIV-1 e resistência transmitida no Brasil.

- Quando analisada a resistência secundária nos pacientes presidiários 37% das amostras apresentaram resistência associada aos ARVs. Em 5/10 dos pacientes foram observadas mutações para as classes dos ITRNs e ITRNNs

simultaneamente, em 3/10 dos pacientes observaram-se mutações de resistência para os ITRNs e 2/10 eram multi-resistentes aos ARVs.

- As análises filogenéticas mostraram sequências dos vírus HIV-1 do MS sugestivos de transmissão intrapresídio entre mulheres usuárias de drogas injetáveis e homens que fazem sexo com homens.
- Em relação aos subtipos dos isolados de HIV-1 entre os pacientes dos presídios dos Estados do MS e de GO a prevalência foi de 48% para o subtipo B e 11% de subtipo C nos fragmentos da PR e TR do HIV-1. Padrões de recombinação complexos foram observados em 41% dos pacientes.

A alta frequência de resistência secundária associada aos ARVs nos pacientes presidiários dos estados do MS e GO sugerem uma inadequada adesão ao tratamento com os ARVs. As complexas formas recombinantes do HIV-1 e a possível transmissão intrapresídio observadas em nosso estudo acentuam a necessidade de estratégias de aconselhamento, prevenção e tratamento para a população presidiária por instituições de saúde pública.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboul-ela F, Karn J, Varani G 1995. The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J Mol Biol* 253: 313-32.

Antinori A, Zaccarelli M, Cingolani A, Forbici F, Rizzo MG, Trotta MP, DiGiambenedetto S, Narciso P, Ammassari A, Girardi E, De Luca A, Perno CF 2002. Cross-resistance among nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors limits recycling of efavirenz after nevirapine failure. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 835-8.

Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, Busch MP, Segal MR, Petropoulos CJ, Grant RM 2004. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *Aids* 18: 1683-9.

Barre-Sinoussi F 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348: 31-5.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-71.

Baxter JD, Mayers DL, Wentworth DN, Neaton JD, Hoover ML, Winters MA, Mannheimer SB, Thompson MA, Abrams DI, Brizz BJ, Ioannidis JP, Merigan TC 2000. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. *Aids* 14: F 83-93.

Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimaraes ML, Lopez-Galindez C, Casado C, Chiparelli H, Rocco C, Mangano A, Se L, Morgado MG 2010. Phylodynamics of HIV-

1 circulating recombinant forms 12_BF and 38_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology* 7: 22.

Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH 2002. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 34: 1108-14.

Bobkov A, Cheingsong-Popov R, Garaev M, Weber J 1996. Glycoprotein 120 polymorphism in an HIV type 1 epidemic originating from a point source: nucleotide sequence analysis of variants with conserved V3 loop sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12: 251-3.

Bobkov A, Kazennova E, Selimova L, Bobkova M, Khanina T, Ladnaya N, Kravchenko A, Pokrovsky V, Cheingsong-Popov R, Weber J 1998. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14: 669-76.

Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, Tsay J, Ip J, Farthing C, Limoli K, Parkin N, Markowitz M 1999. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 282: 1135-41.

Bongertz V, Costa CI, Veloso VG, Grinsztejn B, Filho EC, Calvet G, Pilotto JH 2002. Neutralization titres and vertical HIV-1 transmission. *Scand J Immunol* 56: 642-4.

Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH 2001. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 75: 4832-42.

Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, Marlink RG, Schapiro J, Roger M, Wainberg MA 2003. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Aids* 17: F1-5.

Brindeiro R, Vanderborght B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, Stuyver L, Tanuri A 1999. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1674-80.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *Aids* 17: 1063-9.

Broder CC, Jones-Trower A 1999. Coreceptor use by primate lentiviruses in human retroviruses and AIDS. *Los Alamos, NM* p. 517-541.

Cao H, Walker BD 2000. Immunopathogenesis of HIV-1 infection. *Clin Dermatol* 18: 401-10.

Cardoso LP, Pereira GA, Viegas AA, Schmaltz LE, Stefani MM 2010. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. *J Med Virol* 82: 351-7.

Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM 2009. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 46: 134-9.

Cardoso LP, Stefani MM 2009. High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 pol gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 943-50.

Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, Salomon H, Hierholzer J, Watanaveeradej V, Pando MA, Negrete M, Russell KL, Sanchez J, Birx DL, Andrade R, Vinales J, McCutchan FE 2001. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *Aids* 15: F41-7.

Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S 2007. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 785-92.

Chan DC, Chutkowski CT, Kim PS 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15613-15617.

Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR 2004. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 877-82.

Chaix ML, Descamps D, Wirden M, Bocket L, Delaugerre C, Tamalet C, Schneider V, Izopet J, Masquelier B, Rouzioux C, Meyer L, Costagliola D 2009. Stable frequency of HIV-1 transmitted drug resistance in patients at the time of primary infection over 1996-2006 in France. *Aids* 23: 717-24.

Church JA, Cunningham C, Hughes M, Palumbo P, Mofenson LM, Delora P, Smith E, Wiznia A, Purdue L, Hawkins E, Sista P 2002. Safety and antiretroviral activity of chronic subcutaneous administration of T-20 in human immunodeficiency virus 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 21: 653-9.

Cilliers T, Morris L 2002. Coreceptor usage and biological phenotypes of HIV-1 isolates. *Clin Chem Lab Med* 40: 911-7.

Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M., Montagnier L, Alizon M 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324: 691-5.

Clotet B, Menéndez-Arias L, Schapiro J KD, Burger D, Talenti A, Brun-Vezinet F, Geretti A, Boucher CA 2009. Guide to management of HIV drug resistance, antiretrovirals pharmacokinetics and viral hepatitis in HIV infected subjects.

Cohen EA, Subbramanian RA, Gottlinger HG 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 214: 219-35.

Costagliola D, Descamps D, Assoumou L, Morand-Joubert L, Marcelin AG, Brodard V, Delaugerre C, Mackiewicz V, Ruffault A, Izopet J, Plantier JC, Tamalet C, Yerly S, Saidi S, Brun-Vezinet F, Masquelier B 2007. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients: a French nationwide study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46: 12-8.

Couto-Fernandez JC, Morgado MG, dos Santos JI, Galvao-Castro B 1992. Molecular and biological diversity of HIV-1 in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 249-55.

Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG 2006. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 207-11.

Covens K, Kabeya K, Schrooten Y, Dekeersmaeker N, Van Wijngaerden E, Vandamme AM, De Wit S, Van Laethem K 2009. Evolution of genotypic resistance to enfuvirtide in HIV-1 isolates from different group M subtypes. *J Clin Virol* 44 325-8.

Covens K, Megens S, Dekeersmaeker N, Kabeya K, Balzarini J, De Wit S, Vandamme AM, Van Laethem K 2010. The rare HIV-1 gp41 mutations 43T and 50V elevate enfuvirtide resistance levels of common enfuvirtide resistance mutations that did not impact susceptibility to sifuvirtide. *Antiviral Res* 86: 253-60.

de Mendoza C, Garrido C, Poveda E, Corral A, Zahonero N, Trevino A, Anta L, Soriano V 2009. Changes in drug resistance patterns following the introduction of HIV type 1 non-B subtypes in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 967-72.

de Sa-Filho, DJ, Soares M S, Candido V, Gagliani LH, Cavaliere E, Diaz RS, Caseiro MM 2008. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 347-53.

de Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM 2006. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 1-13.

DeGruttola V, Dix L, D'Aquila R, Holder D, Phillips A, Ait-Khaled M, Baxter J, Clevenbergh P, Hammer S, Harrigan R, Katzenstein D, Lanier R, Miller M, Para M, Yerly S, Zolopa A, Murray J, Patick A, Miller V, Castillo S, Pedneault L, Mellors J 2000. The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. *Antivir Ther* 5: 41-8.

Delaugerre C, Morand-Joubert L, Chaix ML, Picard O, Marcelin AG, Schneider V, Krivine A, Compagnucci A, Katlama C, Girard PM, Calvez V 2004. Persistence of multidrug-resistant HIV-1 without antiretroviral treatment 2 years after sexual transmission. *Antivir Ther* 9: 415-21.

Demeter L, Haubrich R 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Phenotypic and genotypic resistance assays: methodology, reliability, and interpretations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26 Suppl 1: S3-9.

Detels R, Muñoz A, McFarlane G, Kingsley LA, Margolick JB, Giorgi J, Schragger LK, Phair JP 1998. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on the time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. Multicenter AIDS cohort study investigators. *JAMA* 280:1497-503.

Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ 1997. RNA virus fitness. *Rev Med Virol* 7: 87-96.

Domingo P, Guardiola JM, Ris J, Nolla J 1998. The impact of new antiretroviral regimes on HIV-associated hospital admissions and deaths. *Aids* 12: 529-30.

Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective

small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 4721-32.

Drews J 2006. Case histories, magic bullets and the state of drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 5: 635-40.

Elzi L, Marzolini C, Furrer H, Ledergerber B, Cavassini M, Hirschel B, Vernazza P, Bernasconi E, Weber R, Battegay M, Swiss HIV Cohort Study 2010. Treatment modification in human immunodeficiency virus-infected individuals starting combination antiretroviral therapy between 2005 and 2008. *Arch Intern Med.* 170:57-65.

Esteves A, Parreira R, Venenno T, Franco M, Piedade J, Germano De Sousa J, Canas-Ferreira WF 2002. Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 313-25.

Fletcher CV 2003. Enfuvirtide, a new drug for HIV infection. *Lancet* 361: 1577-8.

Freed EO 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26: 13-33.

Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, Greene BM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH 1992. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in West Africa. *Nature* 356:495-9.

Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw GM, Sharp PM, Hahn BH 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 391:436-41.

Gallo RC 1984. Kaplan memorial lecture. The family of human lymphotropic retroviruses called HTLV: HTLV-I in adult T-cell leukemia (ATL), HTLV-II in hairy cell leukemias, and HTLV-III in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 15: 13-38.

Galvao-Castro B, Couto-Fernandez JC, Mello MA, Linhares-de-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bongertz V, Ferreira PC, Morgado M, Sabino E, Tanuri A 1996. A nationwide effort to systematically monitor HIV-1 diversity in Brazil: preliminary

results. Brazilian Network for the HIV-1 Isolation and Characterization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 335-8.

Ghosn J, Chaix ML, Delaugerre C 2009. HIV-1 resistance to first- and second-generation non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* 11: 165-73.

Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227: 173-7.

Guimarães ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado, MG 2002a. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1261-9.

Guimarães ML, Moreira AS, Morgado MG 2002b. Polymorphism of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Brazil: genetic characterization of the nef gene and implications for vaccine design. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 523-6.

Guimaraes ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG 2008. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *Aids* 22: 433-5.

Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 5453:607-14. Review.

Hammer SM, Eron JJ, Reis P et al. 2008. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 300: 555-70.

Hanna GJ, D'Aquila RT 2001. Clinical use of genotypic and phenotypic drug resistance testing to monitor antiretroviral chemotherapy. *Clin Infect Dis* 32: 774-82.

Haubrich R, Demeter L 2001. International perspectives on antiretroviral resistance. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26 Suppl 1 S51-9.

Heilek-Snyder G, Bean P 2002. The benefits of HIV resistance testing in optimizing drug discovery. *Am Clin Lab* 21: 13-4.

Hicks C, Gulick RM 2009. Raltegravir: the first HIV type 1 integrase inhibitor. *Clin Infect Dis* 48: 931-9.

Hirsch HH, Battegay M 2003. HIV-infection, HAART (highly-active antiretroviral therapy) and hyperlipidemia. *Dtsch Med Wochenschr* 128: 1051-4.

Hirsch MS, Brun-Vezinet F, D'Aquila RT, Hammer SM, Johnson VA, Kuritzkes DR, Loveday C, Mellors JW, Clotet B, Conway B, Demeter LM, Vella S, Jacobsen, DM, Richman DD 2000. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* 283: 2417-26.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-6.

Hope TJ 1997. Viral RNA export. *Chem Biol* 4: 335-44.

Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, Luo CC, Kalish ML, Weniger BG, Pau CP, Schable CA, Curran JW 1996. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 275: 210-6.

Hu WS, Temin HM 1990. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250: 1227-33.

Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza DF, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simao MB, Tanuri A 2009. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 12 20.

Janssens W, Buve A, Nkengasong JN 1997. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *Aids* 11: 705-12.

Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD 2009. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2009. *Top HIV Med* 17: 138-45.

Katz RA, Skalka AM 1994. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63: 133-73.

Kitahata MM, Gange SJ, Abraham AG et al. 2009. Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival. *N Engl J Med* 360: 1815-26.

Lee SF, Ko CY, Wang CT, Chen SS 2002. Effect of point mutations in the N terminus of the lentivirus lytic peptide-1 sequence of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41 on Env stability. *J Biol Chem* 277: 15363-75.

Levy JA 1996. Infection by human immunodeficiency virus--CD4 is not enough. *N Engl J Med* 335: 1528-30.

Little E 2004. The past, present and future of antiviral drug discovery. *IDrugs* 7: 1104-12.

LosAlamos 2012: HIV Sequence Database. www.hiv.lanl.gov. Data de Acesso: 20/02/2012

Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, Souza MI, Fernandes LM, Souza LL, Ishak R 2009. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 961-6.

Marcelin AG, Reynes J, Yerly S, Ktorza N, Segondy M, Piot JC, Delfraissy JF, Kaiser L, Perrin L, Katlama C, Calvez V 2004. Characterization of genotypic determinants in HR-1 and HR-2 gp41 domains in individuals with persistent HIV viremia under T-20. *Aids* 18: 1340-2.

Markowitz M, Louie M, Hurley A, Sun E, Di Mascio M, Perelson AS, Ho DD 2003. A novel antiviral intervention results in more accurate assessment of human immunodeficiency virus type 1 replication dynamics and T-cell decay in vivo. *J Virol* 77: 5037-8.

Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH, et al 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265(5178):1587-90.

Martinez AM, Hora VP, Santos AL, Mendoza-Sassi R, Von Groll A, Soares EA, D'Avila N, Silveira J, Leal RG, Tanuri A, Soares MA 2006. Determinants of HIV-1 mother-to-child transmission in Southern Brazil. *An Acad Bras Cienc* 78: 113-21.

Matthews T, Salgo M, Greenberg M, Chung J, DeMasi R, Bolognesi D 2004. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat Rev Drug Discov* 3: 215-25.

Mayer V, Apetrei C, Habekova M, Tchentsova N, Bruckova M, Klaskala W, Baum MK, Brun-Vezinet F, Simon F 1998. HIV-1 diversity in heterosexual population in Slovakia, Ukraine and the Czech Republic. *Aids* 12: 1106-8.

Melby T, Sista P, DeMasi R, Kirkland T, Roberts N, Salgo M, Heilek-Snyder G, Cammack N, Matthews TJ, Greenberg ML 2006. Characterization of envelope glycoprotein gp41 genotype and phenotypic susceptibility to enfuvirtide at baseline and on treatment in the phase III clinical trials TORO-1 and TORO-2. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22: 375-85.

Ministério da Saúde 2010: Boletim Epidemiológico Aids/DST.

Modrow S, Hahn BH, Shaw GM, Gallo RC, Wong-Staal F, Wolf H 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J Virol* 61: 570-8.

Moore JP, Doms RW 2003. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10598-602.

Moore RD, Keruly JC 2007. CD4+ cell count 6 years after commencement of highly active antiretroviral therapy in persons with sustained virologic suppression. *Clin Infect Dis* 44: 441-6.

Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B 2002. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 143-50.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, Castilho EA, Galvao-Castro B, Mullins JI, Hendry RM et al. 1994. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 569-76.

Nájera R, Delgado E, Perez-Alvarez L, Thomson MM 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *Aids* 16 Suppl 4: S3-16.

Nolan D, Mallal S 2003. Thymidine analogue-sparing highly active antiretroviral therapy (HAART). *J HIV Ther* 8: 2-6.

Oliveira AC, Martins AN, Pires AF, Arruda MB, Tanuri A, Pereira HS, Brindeiro RM 2009. Enfuvirtide (T-20) resistance-related mutations in HIV type 1 subtypes B, C, and F isolates from Brazilian patients failing HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 193-8.

Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29: 184-90.

Passaes CP, Guimaraes ML, Bello G, Morgado MG 2009. Near full-length genome characterization of HIV type 1 unique BC recombinant forms from Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 1339-44.

Perrin L, Kaiser L, Yerly S 2003. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect Dis* 3: 22-7.

Peuchant O, Capdepon S, Ragnaud JM, Aurillac-Lavignolle V, Thiebaut R, Fleury H, Masquelier B 2007. Primary resistance to enfuvirtide (T20) in recently HIV-1 infected, antiretroviral-naïve patients from the ANRS Aquitaine Cohort. *Antivir Ther* 12: 559-62.

Pires IL, Soares MA, Speranza FA, Ishii SK, Vieira MC, Gouvea MI, Guimaraes MA, de Oliveira FE, Magnanini MM, Brindeiro RM, Tanuri A 2004. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naïve, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 42: 426-30.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15: 871-2.

Pommier Y, Johnson AA, Marchand C 2005. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 4: 236-48.

Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, Alves CB, Badaro R, Suleiman J, Ferreira O et al. 1993. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *Aids* 7: 1191-7.

Richman DD 2001. HIV chemotherapy. *Nature* 410: 995-1001.

Riddler SA, Haubrich R, DiRienzo AG et al 2008. Class sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. *N Engl J Med* 358:2095.

Rimsky LT, Shugars DC, Matthews TJ 1998. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol* 72: 986-93.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish ML, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288: 55-6.

Roman F, Gonzalez D, Lambert C, Deroo S, Fischer A, Baurith T, Staub T, Boulme R, Arendt V, Schneider F, Hemmer R, Schmit JC 2003. Uncommon mutations at residue positions critical for enfuvirtide (T-20) resistance in enfuvirtide-naïve patients infected with subtype B and non-B HIV-1 strains. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33: 134-9.

Rucker J, Samson M, Doranz BJ, Libert F, Berson JF, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Broder CC, Vassart G, Doms RW, Parmentier M 1996. Regions in β - Chemokine Receptors CCR5 and CCR2b that Determine HIV-1 Cofactor Specificity. *Cell* 87: 437-46.

Russell KL, Carcamo C, Watts DM, Sanchez J, Gotuzzo E, Euler A, Blanco JC, Galeano A, Alava A, Mullins JI, Holmes KK, Carr JK 2000. Emerging genetic diversity of HIV-1 in South America. *Aids* 14: 1785-91.

Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, Vandamme AM, Tanuri A, Cassol S, Fitch WM 2005. Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol* 60: 598-605.

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

Sanabani SS, Pastena ER, Kleine N W, Barreto CC, Ferrari KT, Kalmar EM, Ferreira S, Sabino EC 2009. Near full-length genome analysis of low prevalent human immunodeficiency virus type 1 subclade F1 in Sao Paulo, Brazil. *Virol J* 6: 78.

Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, Silveira J, Sabino EC, Tanuri A, Soares MA 2006. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *Aids* 20: 2011-9.

Shafer RW 2002. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 15: 247-77.

Sharp PM, Bailes E, Gao F, Beer BE, Hirsch VM, Hahn BH 2000. Origins and evolution of AIDS viruses: estimating the time-scale. *Biochem Soc Trans* 28: 275-82.

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

Simon V, Ho DD, Karim QA 2006. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *The Lancet* 368 (5):489-504.

Sista PR, Melby T, Davison D, Jin L, Mosier S, Mink M, Nelson EL, DeMasi R, Cammack N, Salgo MP, Matthews TJ, Greenberg ML 2004. Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *Aids* 18: 1787-94.

Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA 2003a. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34: 520-6.

Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, Pires IL, Morgado MG, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A 2003b. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *Aids* 17: 11-21.

Sprinz, E., Netto, E.M., Patelli, M., Lima, J.S., Furtado, J.J., da Eira, M., Zajdenverg, R., Madruga, J.V., Lewi, D.S., Machado, A.A., Pedro, R.J. and Soares, M.A. 2009: Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 861-7.

Sepkowitz KA 2001. AIDS-the first 20 years. *N Engl J Med* 344: 1764-1772.

Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC et al. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45: 637-48.

Stefani MMA, Pereira GAS, Martelli CMT, Shindo N, Galvão-Castro B 2000. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23(2): 205-7.

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, Maya NC, Mussi AH 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 39: 205-9.

Sterne JA, May M, Costagliola D et al. 2009. Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1 infected patients: a collaborative analyses of 18 HIV cohort studies. *Lancet* 373: 1352-63.

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

Teixeira C, de Sa-Filho D, Alkmim W, Janini LM, Diaz RS, Komninakis S 2010. Short communication: high polymorphism rates in the HR1 and HR2 gp41 and presence of primary resistance-related mutations in HIV type 1 circulating in Brazil: possible impact on enfuvirtide efficacy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26: 307-11.

Thomson MM, Villahermosa ML, Vazquez-de-Parga E, Cuevas MT, Delgado E, Manjon N, Medrano L, Perez-Alvarez L, Contreras G, Carrillo MG, Salomon H, Nájera R 2000. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *Aids* 14: 897-9.

Thomson MM, Nájera R 2001. Travel and the introduction of human immunodeficiency virus type 1 non-B subtype genetic forms into Western countries. *Clin Infect Dis* 32: 1732-7.

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

Tolstrup M, Selzer-Plon J, Laursen AL, Bertelsen L, Gerstoft J, Duch M, Pedersen FS, Ostergaard L 2007. Full fusion competence rescue of the enfuvirtide resistant HIV-1 gp41 genotype (43D) by a prevalent polymorphism (137K). *Aids* 21: 519-21.

Tumas K, Poszgay J, Avidan N 2001. Loss of antigenic epitopes as the result of env gene recombination in retrovirus induced leukemia in immunocompetent mice. *Virology* 192: 587-595.

Vaishnav YN, Wong-Staal F 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu Rev Biochem* 60: 577-630.

Véras NM, Véras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM, Martins CR 2007. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:1481-90.

Vernazza PL, Troiani L, Flepp MJ, Cone RW, Schock J, Roth F, Boggian K, Cohen MS, Fiscus SA, Eron JJ 2000. Potent antiretroviral treatment of HIV-infection results in suppression of the seminal shedding of HIV. The Swiss HIV Cohort Study. *Aids* 14: 117-21.

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

Vidal N, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Delaporte E, Peeters M 2000. Identification of a complex env subtype E HIV type 1 virus from the democratic republic of congo, recombinant with A, G, H, J, K, and unknown subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 2059-64.

Volberding PA, Deeks SG 2010. Antiretroviral therapy and management of HIV infection. *Lancet* 376:49-62. Review.

Wei X, Decker JM, Liu H, Zhang Z, Arani RB, Kilby JM, Saag MS, Wu X, Shaw GM, Kappes JC 2002. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 1896-905.

Weidle PJ, Ganea CE, Irwin KL, Pieniazek D, McGowan JP, Olivo N, Ramos A, Schable C, Lal RB, Holmberg SD, Ernst JA 2000. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1, group M, non-B subtypes, Bronx, New York: a sentinel site for monitoring HIV genetic diversity in the United States. *J Infect Dis* 181: 470-5.

Wheeler WH, Ziebell RA, Zabina H, Pieniazek D, Prejean J, Bodnar UR, Mahle KC, Heneine W, Johnson J, Hall HI 2010. Prevalence of transmitted drug resistance associated mutations and HIV-1 subtypes in new HIV-1 diagnoses, U.S.-2006. *Aids* 24: 1203-12.

Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9770-4.

Willey RL, Rutledge RA, Dias S, Folks T, Theodore T, Buckler CE, Martin MA 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 5038-42.

Wilkins E 2008. The current role of ritonavir-boosted protease inhibitors in the management of HIV infection. *J HIV Ther* 13: 9-18.

www.crtv.cm/cont/nouvelles. Data Acesso:10/06/2010.

www.georg-speyer-haus.de/agdietrich/research. Data Acesso:20/02/2011.

www.medscape.com/content/2003. Data Acesso:20/02/2011.

www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19393/. Acesso:20/02/2011.

www.stanford.edu/goup/eqüe/retro/HIV.html. Data Acesso:20/06/2010.

Xu L, Pozniak A, Wildfire A, Stanfield-Oakley SA, Mosier SM, Ratcliffe D, Workman J, Joall A, Myers R, Smit E, Cane PA, Greenberg ML, Pillay D 2005. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1113-9.

Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391: 594-7.

7. ANEXOS
