

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ADRIANA SANTARÉM FERREIRA**

---

**RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E  
MAPEAMENTO GENÉTICO DO HIV-1 NO ESTADO DO MATO  
GROSSO**

---

**Goiânia  
2011**

**ADRIANA SANTAREM FERREIRA**

---

**RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E  
MAPEAMENTO GENÉTICO DO HIV-1 NO ESTADO DO MATO  
GROSSO**

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani

**Goiânia  
2011**

F383r Ferreira, Adriana Santarém.  
Resistência Primária aos Antirretrovirais e Mapeamento Genético do HIV-1 no Estado do Mato Grosso [manuscrito] / Adriana Santarém Ferreira. - 2011.  
xv, 99 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariane Martins de Araújo Stefani.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Medicina, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. HIV-1 2. Resistência Primária 3. Mapeamento genético HIV-1 I. Título.

CDU:616.98:578.828

**BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluna: Adriana Santarém Ferreira**

---

**Orientadora: Professora Doutora Mariane Martins de Araújo Stefani**

**Membros:**

**1. Sheila de Araújo Teles (Membro)**

**2. Valéria Christina de Rezende Feres (Membro)**

**3. Ludimila Paula Vaz Cardoso (Suplente)**

**4. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro (Suplente)**

**Data: 11/03/2011**

***“Ninguém pode voltar no tempo, e fazer um novo começo. Mas podemos começar agora e fazer um novo fim.”***

*Chico Xavier*

*Dedico este trabalho aos meus pais  
Therezinha e Aldo (in memoriam) pelo incentivo e  
apoio em todas as minhas escolhas e decisões.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu esposo Alan pelo incentivo, dedicação, amor, companherismo e confiança durante todos esses anos de convivência.

Aos meus filhos Juliana e Rodrigo, pelo carinho, compreensão, apoio e grande amor que nos une que, com certeza, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus familiares que durante o tempo de preparação desse trabalho muitas vezes me substituíram em meu papel de mãe.

A minha orientadora, Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani, pela paciência, disponibilidade e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

Ao Alexander, Mônica e Bruna por cada exame realizado em bancada.

A Dra. Ludimila Vaz Cardoso, por todos os momentos de incentivo, compreensão e competência; e também por suas valiosas contribuições na elaboração desse trabalho.

A todos os companheiros do Laboratório de Aids e Hanseníase do IPTSP que me receberam e acolheram em tantos momentos desde o início do mestrado.

Aos pacientes que gentilmente participaram dessa pesquisa e tornaram esse trabalho possível.

Aos profissionais do LACEN/MT, pelo constante incentivo.

Ao Dr. Mário Ardenes de Andrade Ribeiro e a toda equipe do Hospital Santa Rosa pela imensa compreensão devido a minha ausência no decorrer deste trabalho.

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

A Deus por cada momento da minha vida.

## SUMÁRIO

---

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Vírus da Imunodeficiência Humana - Estrutura e Genoma Viral.....	20
1.2	Ciclo Replicativo.....	22
1.3	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART).....	23
1.3.1	Inibidores da Transcriptase Reversa.....	24
1.3.2	Inibidores da Protease.....	26
1.3.3	Inibidores da Integrase.....	27
1.3.4	Inibidores de Fusão.....	27
1.4	Mutação e Resistência do HIV-1 aos Antirretrovirais.....	28
1.4.1	Resistência associada aos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos ao Nucleosídeo.....	29
1.4.2	Resistência associada aos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos ao Nucleosídeo.....	31
1.4.3	Resistência associada aos Inibidores da Protease.....	32
1.4.4	Resistência associada aos Inibidores da Integrase.....	34
1.4.5	Resistência associada aos Inibidores de Fusão.....	34
1.5	Resistência Primária do HIV-1 aos Antirretrovirais.....	35
1.6	Falha Terapêutica.....	37
1.7	Teste de Genotipagem para Determinação de Resistência às Drogas Antirretrovirais.....	38
1.8	Terapia de Resgate.....	40
1.9	Mecanismos da Diversidade Genética do HIV-1.....	41
1.10	Tópicos de Epidemiologia Molecular do HIV-1.....	41
1.11	Formas Recombinantes do HIV-1.....	44
2	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO.....	46

3	OBJETIVOS.....	47
3.1	Objetivo Geral.....	47
3.2	Objetivos Específicos.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	Ética em Pesquisa.....	48
4.2	Grupo de Estudo.....	48
4.3	Quantificação da carga viral do HIV-1.....	49
4.4	Contagem de linfócitos TCD4 <sup>+</sup> /TCD8 <sup>+</sup> .....	49
4.5	Caracterização genotípica do HIV-1 .....	49
4.6	Análise Genética.....	55
4.7	Análise Estatística.....	56
5	RESULTADOS.....	57
5.1	Características Sócio-Demográficas e Epidemiológicas.....	57
5.2	Resistência Primária nos Genes da PR e TR.....	59
5.3	Diversidade Genética do HIV-1 nos genes da PR e TR.....	61
6	DISCUSSÃO.....	65
7	CONCLUSÕES / RECOMENDAÇÕES.....	71
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
9.	ANEXOS	
	ANEXO 1 - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás.....	88
	ANEXO 2 - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller - Universidade Federal de Mato Grosso.....	89
	ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	90
	ANEXO 4 - Questionário Sobre Fatores de Risco para Infecção pelo HIV-1....	92

## TABELAS, FIGURAS E GRÁFICOS

---

Tabela 1	Sequência dos <i>Primers</i> de 5' → 3' para o Gene <i>pol</i> do HIV-1.....	52
Tabela 2	Perfil dos pacientes recrutados em Mato Grosso .....	58
Tabela 3	Mutações no gene da PR e TR relacionadas à resistência primária às drogas ARVs .....	59
Figura 1	Estrutura do HIV-1.....	21
Figura 2	Organização genômica do HIV-1.....	21
Figura 3	Ciclo Replicativo do HIV-1.....	22
Figura 4	Estrutura da enzima TR .....	25
Figura 5	Estrutura da enzima PR .....	26
Figura 6	Mutações no gene da transcriptase reversa associadas com a resistência aos INTRs .....	31
Figura 7	Mutações no gene da transcriptase reversa associadas com a resistência aos INNTRs .....	32
Figura 8	Mutações no gene da PR associadas com a resistência aos IPs	33
Figura 9	Mutações no gene da integrase associadas com a resistência aos IIs .....	34
Figura 10	Mutações no gene do envelope associado com a resistência aos IFs .....	35
Figura 11	Subtipos encontrados nos genes da PR e TR .....	61
Figura 12	Análise de recombinação da amostra pelo programa Simplot 3.5.1 de acordo com a comparação com os subtipos de referência na região da polimerase do HIV-1 .....	62
Figura 13	Classificação filogenética nos genes da PR e TR .....	63
Gráfico 1	Mutações Acessórias no Gene da PR e TR relacionadas aos INTRs, INNTRs e IPs em pacientes recrutados no Estado de Mato Grosso (n=92).....	61

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

- % - porcentagem
- °C - graus Celsius
- µg - micrograma
- µl - microlitro
- 3TC** - lamivudina
- A** - adenosina
- ABC** - abacavir
- AIDS** - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- APV** - amprenavir
- ARV** - droga antirretroviral
- ATV** - atazanavir
- AZT** - zidovudina
- C** - citosina
- cDNA** - DNA complementar
- CPR** - calibração da população com resistência
- CRF** - forma recombinante circulante (circulating recombinant form)
- d4T** - estavudina
- dATP** - desoxiAdenina trifosfatada;
- dCTP** - desoxiCitosina trifosfatada
- ddC** - zalcitabina
- ddl** - didanosina
- dGTP** - desoxiGuanina trifosfatada
- DLV** - delavirdina
- DNA** - ácido desoxirribonucleico
- dNTP** - desoxirribonucleotídeo trifosfatado
- DST/AIDS** - Programa de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS
- DTT** - agente redutor ditiotreitól
- dTTP** - desoxiTimina trifosfatada
- EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético
- EFV** - efavirenz
- env** - envelope

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FPV** - fosamprenavir

**FTC** - emtricitabina

**g** - força centrífuga relativa a gravidade

**G** - guanosina

**H<sub>2</sub>O** - água

**HAART** - terapia antirretroviral altamente ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)

**HIV** - Vírus da Imunodeficiência Humana

**HIV-1** - Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1

**HIV-2** - Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 2

**HIV-BResNet** - Rede Brasileira para Vigilância de Resistência a Drogas para o HIV-1

**HMA** - ensaio de mobilidade de heteroduplex

**HR** – região hepta repetida da gp41

**IAS-USA** - *International Aids Society* dos Estados Unidos da América

**IC** - intervalo de confiança

**IDU/UDI** - Usuário de Droga Injetável

**IDV** – indinavir

**IF** – inibidor de fusão

**II** - inibidor da integrase

**IN** - integrase

**IP** - inibidor de protease

**IPTSP** - Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

**INTR** - inibidor de transcriptase reversa análogo ao nucleosídeo

**INNTR** - inibidor de transcriptase reversa não análogo ao nucleosídeo

**jpHMM-HIV** - programa *Jumping Profile Hidden Markov Model*

**KDa** - kilodaltons

**LACEN-MT** - Laboratório Central e de Saúde Pública de Mato Grosso

**LPV/r** - lopinavir

**LTR** - repetições terminais longas (*Long Terminal Repeat*)

**MgCl<sub>2</sub>** – cloreto de magnésio

**min** - minuto

**mL** - mililitro

**mM** - milimolar

**mm<sup>3</sup>** - milímetro cúbico

**MS** - Ministério da Saúde  
**MT** - Mato Grosso  
**n** - número  
**nef** - fator negativo  
**NFV** - nelfinavir  
**ng** - nanograma  
**nm** - nanômetro  
**NVP** - nevirapina  
**OMS** - Organização Mundial da Saúde  
**pb** - pares de base  
**PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase  
**PIC** - complexo pré-integração  
**pmoles/μL** - picomolar/microlitro  
**pol** - polimerase  
**PR** - Protease  
**qsp** - quantidade suficiente para  
**RENAGENO** - Rede Nacional de Genotipagem  
**rev**- regulador da expressão viral  
**RNA** - ácido ribonucléico  
**RNAm** - RNA mensageiro  
**rpm** - rotações por minuto  
**RT-PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase do Transcrito Reverso  
**RTV** - ritonavir  
**seg** - segundos  
**SGR** - segunda geração de recombinantes  
**SIDA** - síndrome da imunodeficiência adquirida  
**SIV** - Vírus da Imunodeficiência Símia  
**SIVcpz** - vírus da imunodeficiência símia do chimpanzé  
**SPSS** - software *Statistical Package for Social Sciences*  
**SQV** - saquinavir  
**T** - timina  
**T-20** - enfurvitida  
**TAE** - Tris-Acetato-EDTA  
**tat** - proteína de transativação

**TBE** - Tris-Borato-EDTA

**TCD3<sup>+</sup>** - linfócito TCD3<sup>+</sup>

**TCD4<sup>+</sup>** - Linfócito TCD4<sup>+</sup>

**TCD8<sup>+</sup>** - linfócito TCD8<sup>+</sup>

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TDF** - tenofovir

**TR** - Transcriptase Reversa

**U/μl** - unidades/microlitro

**UFG** - Universidade Federal de Goiás

**UNAIDS** - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids (*Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*)

**UNESCO** - Organização Educacional Científica e Cultural das Nações Unidas (*“United Nations Educational Scientific and Cultural Organization”*)

**URF** - forma recombinante única (unique recombiant form)

**Vif** - proteína viral Vif

**Vpr** - proteína viral r

**Vpu** - proteína viral u

**WHO** - Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

## RESUMO

---

O uso de antirretrovirais (ARVs) reduziu a morbi-mortalidade relacionada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Apesar deste avanço, as mutações de resistência aos antirretrovirais e a diversidade genética do HIV-1 permanecem os principais obstáculos na luta contra a AIDS. O padrão de resistência do HIV-1 aos ARVs pode ser determinado através de testes de resistência, especialmente a genotipagem que permite a detecção de mutações do genoma viral. Este estudo descreve a prevalência de resistência primária às drogas antirretrovirais e subtipos circulantes no Estado de Mato Grosso, no centro-oeste brasileiro. Foram colhidas 105 amostras de plasma de pacientes infectados com HIV-1, virgens de tratamento, durante o período de outubro de 2008 a setembro de 2009 para a realização do teste de resistência genotípica no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. A protease e fragmento da transcriptase reversa do HIV-1 foram amplificados e seqüenciados a partir do RNA plasmático. Os subtipos do gene *pol* do HIV-1 foram avaliados por análise filogenética por meio do banco de dados de Los Alamos. As mutações de resistência aos ARVs foram analisadas pelo banco de dados da Universidade de Stanford e *International AIDS Society*. Dos 105 pacientes, 92 tiveram o RNA do HIV-1 amplificado e seqüenciado, sendo que 5 (5,43%) apresentaram cepas resistentes. Entre os 5 pacientes com resistência, 3 (3,26%) apresentavam mutações para os inibidores da transcriptase reversa análogos ao nucleosídeo, 1 (1,08%) para os inibidores da transcriptase reversa não análogos ao nucleosídeo e 1 (1,08%) para os inibidores da protease. As mutações no gene da transcriptase reversa foram observadas nos códons 219 (K219E), 67 (D67N) e 103 (K103N). A mutação no gene da protease foi observada no códon 90 (L90M). Este estudo revelou que as principais mutações encontradas estão relacionadas aos inibidores da transcriptase reversa, principalmente INTR, refletindo o amplo uso de inibidores da transcriptase reversa no início da terapia antirretroviral. Além disso, mostra a grande diversidade genética com significativa proporção de recombinantes BF1 e a co-circulação de subtipos B, F1 e C no centro-oeste brasileiro.

Palavras-chave: Resistência Primária ao HIV-1; subtipos; Brasil.

## ABSTRACT

---

The antiretroviral therapy (ART) has reduced morbidity and mortality related to human immunodeficiency virus (HIV) infection. In spite of this advance, the antiretroviral resistance mutations and viral genetic diversity remain the main obstacles in the fight against AIDS. The resistance pattern of HIV-1 to antiretrovirals can be evaluated by resistance tests, specially the genotype testing that allows detection of mutations in the viral genome. This study describes the prevalence of primary HIV-1 drug resistance and subtypes circulating in Mato Grosso, Central West Brazil. Plasma samples from 105 naive patients were collected during the years 2008 and 2009 to perform the viral resistance genotyping at Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás. Protease (PR) and partial reverse transcriptase (RT) were amplified and sequenced from plasma RNA. HIV-1 *pol* subtypes were assigned by phylogenetic analysis through Los Alamos Database. ARV resistance mutations were analyzed by Stanford University Database and International AIDS Society. Ninety two of the 105 samples had their RNA amplified, 5 (5,43%) of them harboring a resistant strain. Nucleoside reverse-transcriptase inhibitors, nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors and protease inhibitors associated mutations were present in 3 (3,26%), 1(1,08%) and 1(1,08%) samples respectively. Reverse transcriptase gene mutations were observed at codons 219 (K219E), 67 (D67N) e 103 (K103N). Protease gene mutation was observed at codon 90 (L90M). This study revealed that the main mutations are related to reverse-transcriptase inhibitors, mainly INTR, reflecting the widespread use of reverse-transcriptase inhibitors in the initiation of antiretroviral therapy. Moreover, shows the wide genetic diversity with a significant proportion of distinct BF1 recombinants and the co-circulation of subtypes B, F1 and C in Central West Brazil.

Keywords: HIV-1 primary drug resistance; subtypes; Brazil.

# 1 INTRODUÇÃO

---

A síndrome da imunodeficiência adquirida é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Atualmente estima-se que existam 33,3 milhões de pessoas infectadas pelo HIV-1 em todo mundo e que ocorreram 2,6 milhões de novas infecções em 2009 (UNAIDS, 2010).

No Brasil, desde 1996, o Programa de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS do Ministério da Saúde (DST/AIDS/MS) distribui gratuitamente para a rede pública de saúde, a terapia antirretroviral altamente ativa (highly active antiretroviral therapy - HAART) para indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) com critérios para tratamento (BRASIL, 2010). Como consequência à implementação desse programa, houve uma melhora na qualidade de vida dos pacientes infectados pelo HIV-1, com aumento da sobrevida e diminuição de infecções oportunistas (CASSEB *et al.*, 1999). Apesar da HAART ter trazido uma nova perspectiva no controle da infecção, o surgimento de mutações que ocasionam a resistência aos ARVs pode comprometer esta conquista.

Atualmente cinco classes de ARVs estão disponíveis para o tratamento de pacientes com o HIV-1, incluindo inibidores de transcriptase reversa análogos ao nucleosídeo, inibidores de transcriptase reversa não análogos ao nucleosídeo, inibidores de protease, um inibidor de fusão (enfuvirtida) e um inibidor de integrase (raltegravir). Um tratamento bem sucedido pode resultar em acentuada redução da carga viral do HIV-1 até níveis indetectáveis (abaixo de 50 cópias/ml), o que pode reduzir significativamente as chances de transmissão do vírus (HAMMER *et al.*, 1997). Entretanto ainda é difícil obter a completa supressão viral por longos períodos em indivíduos infectados, devido a múltiplos fatores tais como: baixa adesão à medicação, intolerância à droga, interações medicamentosas ou administração em níveis inadequados (CRESPO-FIERRO, 1997; PIERSON *et al.*, 2000; GHOSN *et al.*, 2006). Outros fatores relacionados às características do vírus também representam um obstáculo para a obtenção da completa supressão viral. O HIV-1 caracteriza-se por extensa diversidade genética, consequência da alta taxa de replicação *in vivo* e ocorrência de eventos de recombinação como parte dos mecanismos naturais de sua replicação. A alta capacidade de recombinação do HIV-1 pode promover o surgimento de novas formas recombinantes circulantes do vírus distribuídas em

diferentes partes do mundo. O monitoramento da diversidade genética do HIV-1 em diferentes áreas geográficas é fundamental para identificar os subtipos circulantes e monitorar a introdução e disseminação dos subtipos pelas diversas regiões brasileiras (SUCUPIRA *et al.*, 2007)

A fase inicial da infecção pelo HIV-1 ou fase inicial aguda pode ocorrer de maneira assintomática, porém muitos pacientes manifestam uma síndrome viral aguda inespecífica em duas a seis semanas após à exposição ao vírus (KAHN *et al.*, 1998; POPE & HAASE, 2003). Este período é caracterizado 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, na qual ocorre a produção de anticorpos específicos, com equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune do hospedeiro (HAMMER *et al.*, 2006). Progressivamente no decorrer da infecção há uma queda no número de células TCD4<sup>+</sup>, que pode inicialmente ser mascarada pela linfocitose atribuída a um aumento das células TCD8<sup>+</sup> (MONTAGNIER, 1995). O número de células TCD4<sup>+</sup> no sangue periférico é considerado o principal marcador de dano imunológico causado pela infecção pelo HIV-1 e um importante indicador de progressão para aids. Adultos saudáveis possuem células TCD4<sup>+</sup> de 600 a 1200 céls/mm<sup>3</sup>. Os valores de células TCD4<sup>+</sup> abaixo de 350 céls/mm<sup>3</sup> em pacientes HIV+ são indicativos de tratamento com terapia ARV (BRASIL, 2010).

Na ausência de tratamento a replicação viral pode acelerar, a contagem de células TCD4<sup>+</sup> pode cair abaixo de 200 céls/mm<sup>3</sup> e manifestações clínicas devido às infecções oportunistas podem aparecer. Nesse momento, a doença evolui para a fase sintomática, a aids, e nesses pacientes imunossuprimidos a taxa de destruição do sistema imune e o grau de imunodeficiência podem provocar a morte na ausência da terapia ARV (MARGOLICK *et al.*, 1998; SIMON *et al.*, 2006).

A presença de indicadores laboratoriais e da imunodeficiência, tais como a contagem de células TCD4<sup>+</sup> e a quantificação da carga viral são os principais parâmetros laboratoriais utilizados no acompanhamento dos pacientes com infecção pelo HIV-1.

## 1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana – Estrutura e Genoma Viral

O HIV-1 pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus* de alta complexidade genômica, heterogeneidade e patogenicidade. O vírus apresenta um envelope viral constituído de bicamada lipídica derivada da membrana da célula do hospedeiro. O envelope viral apresenta duas proteínas principais, a gp120 e gp41, formadas a partir de um precursor, a gp160. Internamente ao envelope encontra-se a proteína matriz p17, o capsídeo viral composto pela proteína p24 que envolve o nucleocapsídeo composto pelas proteínas p7/p9, o genoma composto de duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNA) idênticas, e as enzimas virais necessárias para sua replicação: PR, TR e IN (BARRE-SINOUSSE *et al.* 1996) (Figura 1).

O genoma do HIV-1 é constituído por três genes estruturais (*gag*, *env* e *pol*) e um conjunto de genes acessórios e reguladores (*vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* e *nef*) que controlam a replicação do vírus (BARRE-SINOUSSE *et al.* 1996). Em ambas as extremidades do genoma há longas seqüências repetidas denominadas LTR (LTR-*gag-pol-env-LTR* 3'), com função de integração entre o genoma viral e o celular durante o processo replicativo do vírus (VAISHNAV, 1991).

O gene *gag* codifica uma poliproteína de 55 kDa denominada Gag, que é clivada durante a maturação do vírus originando as proteínas da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo viral (p7/p9). O gene *env* codifica a glicoproteína precursora gp160, que posteriormente é clivada por uma protease celular originando a glicoproteína de superfície (gp120) e a proteína transmembrana (gp41), responsáveis pela fusão da membrana viral com a membrana celular. O gene *pol* codifica as enzimas PR, TR e IN, responsáveis respectivamente pela tradução das proteínas virais, transcrição do RNA viral em DNA pró-viral e integração do genoma do vírus com o da célula hospedeira (BARRE-SINOUSSE *et al.* 1996) (Figura 2).

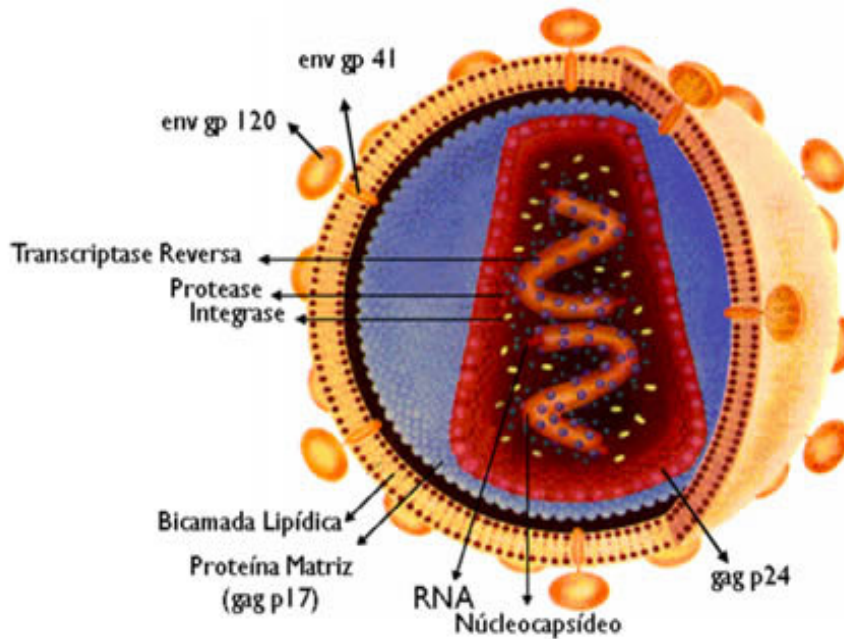


Figura 1 – Estrutura do HIV-1.  
Adaptado de: <http://bmb.pharma.hr/predavanja/molmed/sld021.htm>.

Os genes acessórios e reguladores *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* e *vpu* regulam ou auxiliam os vários processos biológicos virais envolvidos na replicação como transcrição do RNA viral em DNA pró-viral, integração do DNA pró-viral ao DNA do hospedeiro, tradução de proteínas virais, maturação da partícula viral e infectividade (BARRÉ-SINOUSI *et al.*, 1996).

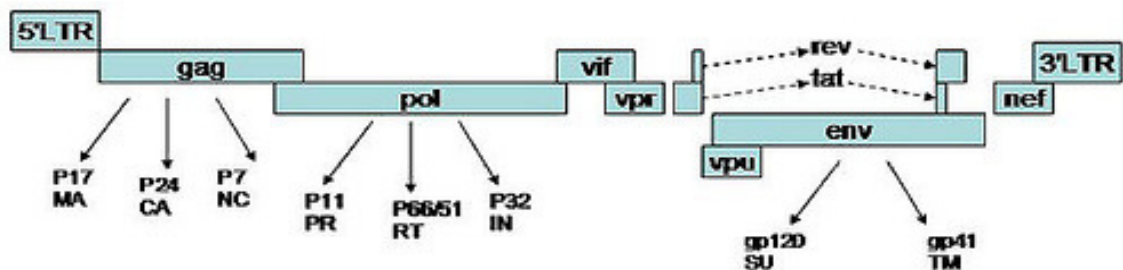


Figura 2 – Organização genômica do HIV-1. 5'LTR e 3'LTR – repetições terminais longas; gag – codifica proteínas estruturais do capsídeo; pol – codifica proteínas virais; vif – fator de infecção do vírion; vpr – proteína r do vírion; vpu – proteína u do vírion; tat – proteína transativadora; rev – regulador da expressão viral; env – codifica proteínas do envelope; nef – fator negativo; MA – matriz; CA – capsídeo; NC – nucleocapsídeo; PR – protease; RT – transcriptase reversa; IN – integrase; SU – superfície; TM – região transmembrânica.

Adaptado de: <http://www.microbiologybytes.com/blog/category/microbiology/page/38/>

## 1.2 Ciclo Replicativo

O ciclo replicativo do HIV-1 inicia-se com a ligação da proteína gp120 do envelope viral com o seu receptor primário- as células TCD4<sup>+</sup> presentes na superfície da célula hospedeira. A gp120 é uma proteína que apresenta cinco regiões constantes (C1 a C5) e cinco regiões variáveis (V1 a V5) (DENG *et al.*, 1996), sendo essencial ao ciclo replicativo viral. A ligação da gp120 ao receptor CD4 induz uma alteração conformacional na alça V3 da gp120, possibilitando a sua ligação a um co-receptor que pode ser o CCR5 presente em macrófagos e células dendríticas e/ou o co-receptor CXCR4 presente em linfócitos (CLAPHAM,1997). Com esta ligação, ocorre inserção da gp41 na bicamada lipídica da célula do hospedeiro, ativando seus peptídeos de fusão que promovem a fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira e consequentemente a liberação do RNA genômico e das enzimas virais no citoplasma da célula do hospedeiro (BARRÉ-SINOUSI *et al.*, 1996) (Figura 3).

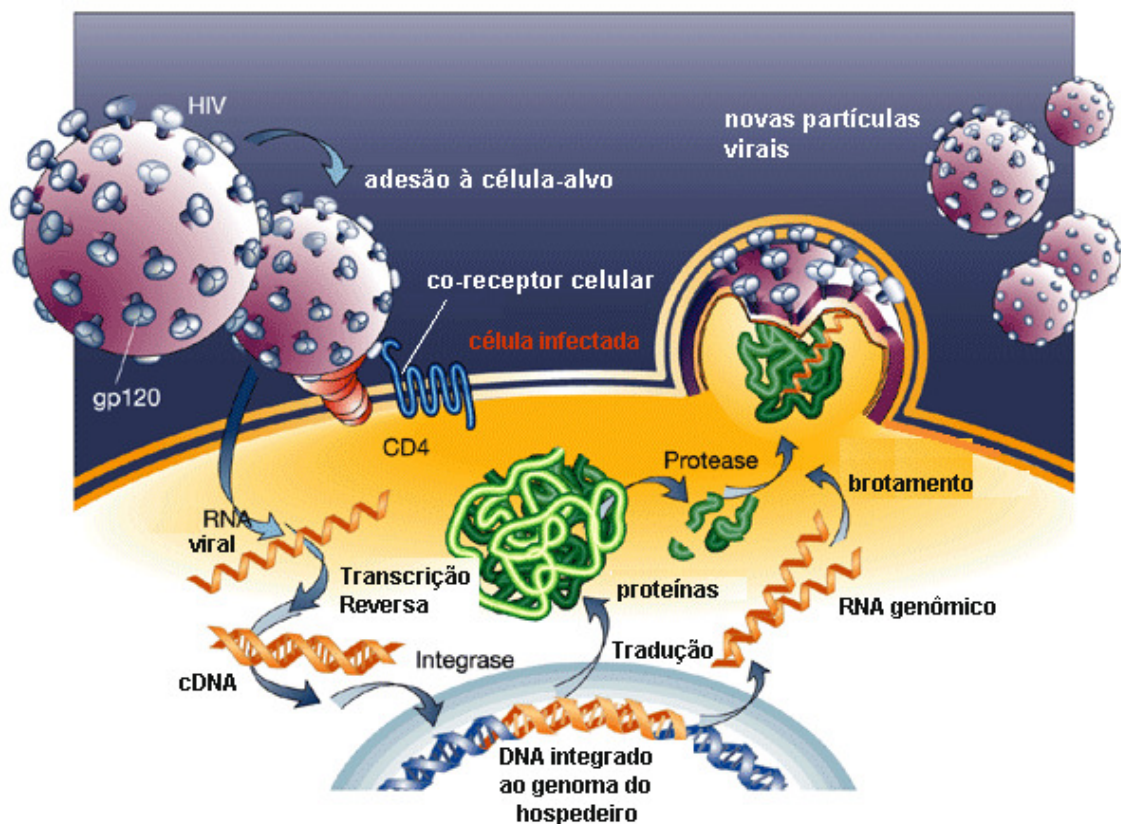


Figura 3 – Ciclo Replicativo do HIV-1  
Adaptado de: [http://www.flstdhivptc.com/html/hiv\\_aids.html](http://www.flstdhivptc.com/html/hiv_aids.html)

O RNA genômico é convertido em cDNA pela ação da enzima viral TR. A seguir o cDNA é transportado para o núcleo celular na forma de PIC associado a vários outros fatores. No núcleo sofre clivagens específicas e é integrado ao DNA da célula do hospedeiro pela ação da enzima viral IN, constituindo o provírus. Nesta fase o HIV-1 pode permanecer latente, apenas integrado ao DNA celular, sem ser replicado pela célula hospedeira (BARRÉ-SINOUSSE *et al.*, 1996; FRANKEL *et al.*, 1998).

Quando a célula é ativada ocorre a transcrição do DNA em RNAm. O conjunto de RNAs transcritos são então transportados para o citoplasma/ribossomos onde as proteínas são produzidas. Os vírions são inicialmente montados próximo à membrana celular na forma de partículas imaturas, compostas de um envelope glicoprotéico, RNA genômico e poliproteínas virais. Durante ou após o “brotamento”, as partículas virais passam por uma modificação morfológica denominada maturação, que consiste na clivagem das poliproteínas *gag* e *gag-pol* pela ação da PR, produzindo enzimas e proteínas estruturais do capsídeo (KAPLAN *et al.*, 1994). O processamento das poliproteínas no vírion completa o ciclo de replicação do HIV-1, tornando os vírions maduros capazes de infectar outra célula (VAISHNAV & WONG-STAAAL, 1991).

### **1.3 Terapia Antiretroviral Altamente Ativa (HAART)**

A primeira classe de drogas ARVs introduzida para o tratamento do HIV-1 foi a dos INTRs, inicialmente na monoterapia com zidovudina (AZT). A introdução da monoterapia levou a um rápido aparecimento de variantes de HIV-1 resistentes a esta droga (ERICE *et al.*, 1993). Este fato motivou a busca de outros compostos com novos mecanismos de ação. Em seguida, INNTRs foram desenvolvidos e, em 1996, novas drogas ARVs, representadas pelos IPs, foram introduzidas. A partir de 1996, o Ministério da Saúde passou a disponibilizar gratuitamente a HAART aos pacientes com HIV-1+/aids com indicação de tratamento. A HAART baseia-se na administração de pelo menos três drogas ARVs de duas classes diferentes, que bloqueiam a ação de enzimas virais importantes para a replicação e funcionamento do HIV-1, impedindo assim a formação de novos vírions (WHO, 2010). As drogas incluem INTRs, INNTRs e IPs (MENÉNDEZ-ARIAS *et al.*, 2002). Os objetivos da

HAART são obter supressão máxima da replicação viral, restaurar e/ou preservar a função imunológica, melhorar da qualidade de vida do doente, e reduzir a morbidade e mortalidade relacionadas com a infecção pelo HIV-1 e conseqüentemente a transmissão (HAMMER *et al.*, 2006). O esquema de tratamento inicial da HAART deve incluir combinações de três drogas: dois INTRs (TDF e FTC) associados a um INNTR (EFV); dois INTRs (TDF e FTC) associados a um IP reforçado (ATV/r ou DRV/r); ou dois INTRs (TDF e FTC) associados a um II (raltegravir) (GUIDELINES FOR THE USE OF ANTIRETROVIRAL AGENTS IN HIV-1-INFECTED ADULTS AND ADOLESCENTS, 2011).

De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde, os critérios para início da terapia ARV incluem: pacientes sintomáticos; pacientes assintomáticos com contagem de células TCD4<sup>+</sup> inferior a 350 céls/ mm<sup>3</sup>; gestantes, independente da presença de sintomas e da contagem de células TCD4<sup>+</sup>; e pacientes com contagem de TCD4<sup>+</sup> entre 350 e 500 células nas seguintes condições: coinfeção pelo vírus da hepatite B com indicação de tratamento, coinfeção pelo vírus da hepatite C, idade igual ou superior a 55 anos, doença cardiovascular estabelecida ou com risco elevado (acima de 20%, segundo escore de Framingham), nefropatia do HIV, neoplasias incluindo as não definidoras de aids e carga viral superior a 100.000 cópias (BRASIL, 2010).

### 1.3.1 Inibidores da Transcriptase Reversa (ITRs)

A enzima TR do HIV-1 é um heterodímero composto das subunidades p66 e p51. A subunidade p66 contém o domínio catalítico da TR que apresenta dois sítios de ligação que podem ser alvos dos ARVs: o sítio de ligação do substrato, local de atuação dos INTRs; e um sítio de ligação alostérico, onde atuam os INNTRs (figura 4). A subunidade p51 é constituída pela clivagem proteolítica da p66 e não detém atividade enzimática, mas funciona como suporte para a atividade da p66 (KOHLSTAEDT *et al.*, 1992). A estrutura da TR é semelhante à mão humana, com subdomínios referidos como dedos, palma e polegar (ARTS *et al.*, 1994).

Os inibidores da transcriptase reversa análogos ao nucleosídeo são drogas que se tornam eficazes após serem convertidas em trifosfatos (forma ativa). Para isso, necessitam ser fosforilados pelo organismo pelas enzimas celulares

denominadas quinases. Os nucleosídeos fosforilados competem com o desoxinucleótido trifosfato que existe dentro das células (dNTPs). A incorporação de um INTR trifosfato na cadeia de DNA viral em formação bloqueia a incorporação de mais nucleotídeos interrompendo a formação do DNA viral (MEYER *et al.*, 1998). Os inibidores da transcriptase reversa análogos ao nucleotídeo atuam de modo semelhante, contudo, já vem pré-fosforilados, necessitando de uma etapa a menos de fosforilação. Desse modo, os análogos ao nucleotídeo são ativados intracelularmente somente através de duas etapas de fosforilação (SHAFER, 2002). Atualmente existem seis medicamentos da classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos ao nucleosídeo/nucleotídeo disponíveis no Brasil: AZT, d4T, 3TC, ddl, ABC e TDF (BRASIL, 2010).

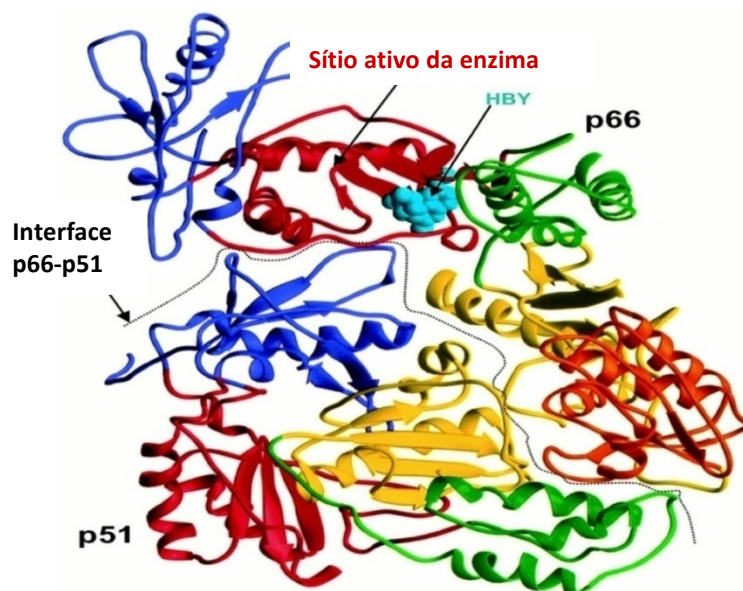


Figura 4 – Estrutura da enzima TR do HIV-1 composta de duas subunidades (p51 e p66), e a analogia dos subdomínios da TR com a mão humana identificada por cores: azul - dedos; vermelho – palma; verde - polegar. Em amarelo, o subdomínio de conexão dos domínios. A interface entre estas duas subunidades é mostrada pela linha pontilhada. Fonte: Adaptado de HSIU *et al.*, 1996.

Os INNTRs ligam-se de modo não-competitivo e reversível ao sítio alostérico da enzima. Como resultado desta interação, o sítio ativo responsável pela formação da dupla hélice de DNA tem sua mobilidade e flexibilidade restritas, tendo como consequência uma drástica redução da eficiência da enzima (SHEN *et al.*, 2003). A forma ideal de utilização destes fármacos é na terapia combinada com INTRs ou IPs, onde a atividade sinérgica deles é mais potente (LAVRA, 2006). No Brasil as drogas disponíveis desta classe incluem a NVP, EFV e a Etravirina (BRASIL, 2010).

### 1.3.2 Inibidores da Protease (IPs)

A PR é uma enzima aspártica formada por duas subunidades simétricas constituídas por uma cadeia de 99 aminoácidos, com o sítio ativo localizado entre essas duas subunidades. O sítio ativo contém uma tríade conservada, Asp-Thr-Gly, nas posições 25-27 que reconhece e cliva nove diferentes sequências de peptídeos para produzir as proteínas da matriz, do capsídeo, do nucleocapsídeo, as proteínas p6 da poliproteína *Gag*, e as proteínas da TR e IN integrantes da poliproteína *Gag-Pol* (TURNER & SUMMERS, 1999).

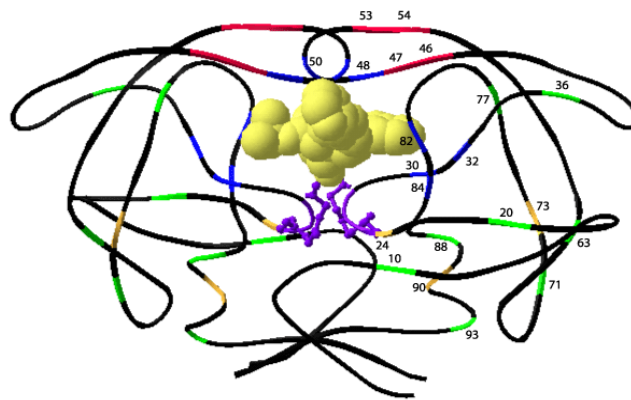


Figura 5 – Estrutura da enzima protease contendo as duas subunidades simétricas (lado esquerdo e direito). O sítio ativo está representado em amarelo. Fonte: CHEN *et al.*, 1994.

O resíduo aspartil forma um intermediário tetraédrico que possui grande afinidade pelo sítio ativo. Os IPs ao imitarem esse intermediário tetraédrico ligam-se fortemente ao substrato do sítio ativo, impedindo a clivagem da poliproteína, provocando assim a produção de partículas virais imaturas e não infecciosas (DORSEY & VACCA, 2001).

No Brasil são distribuídos oito medicamentos capazes de inibir a enzima PR: SQV, RTV, IDV, LPV/r, NFV, APV, ATV, e DRV (BRASIL, 2010).

### 1.3.3 Inibidores da Integrase (IIs)

A enzima IN é responsável pela integração do DNA viral ao cromossomo do hospedeiro, permitindo assim a continuação do ciclo replicativo do HIV-1 (SAKAI *et al.*, 1993). A IN é constituída por 288 aminoácidos (32KDa) codificados pelo final 3' do gene *pol* do HIV-1. Possui três domínios funcionais: o domínio N terminal (resíduos 1-50) que promove a ligação com o zinco; o domínio central catalítico (resíduos 50-212) que contém a tríade catalítica D64, D116 e E152 que liga-se a dois íons  $Mg^{+2}$  que são essenciais para a clivagem/formação da ligação fosfodiéster; e o domínio C terminal (resíduos 213-288) que liga-se ao DNA do hospedeiro (FRANKEL & YOUNG, 1998). A incorporação do DNA próviral ao genoma do hospedeiro é um processo com várias etapas e é essencial para a infecção. A primeira etapa consiste na remoção de dois nucleotídeos das terminações 3' do DNA viral. Na etapa seguinte, chamada de transferência de fita de DNA, duas transesterificações integram as terminações do DNA viral no cromossomo do hospedeiro (BROWN, 1990). A enzima IN tem em seu sitio de ligação três resíduos de lisina responsáveis pela ligação com DNA. Os inibidores da IN são capazes de se ligar a este mesmo sitio, deslocando o DNA. Em 2007 foi aprovado o primeiro inibidor de IN, o raltegravir, aumentando o número de classes de ARVs disponíveis aos pacientes infectados o HIV-1 (NAIR & CHI, 2007).

### 1.3.4 Inibidores de Fusão (IFs)

Os inibidores da fusão diferem dos INTRs, INNTRs e IPs pois ao invés de bloquearem a replicação viral dentro das células, impedem que o vírus penetre nas células-alvo evitando assim a infecção. Os compostos desta classe são capazes de bloquear três tipos de interação: com a gp 41; da gp 120 com o CD4; da gp 120 com os co-receptores (BISWAS *et al.*, 2007).

O primeiro passo da entrada do HIV-1 na célula ocorre quando a gp120 se liga ao receptor TCD4<sup>+</sup> e posteriormente aos co-receptores das quimiocinas, CCR5 ou CXCR4 da célula alvo. Interações entre as duas regiões HR1 e HR2 na subunidade gp41 dão origem a uma alteração conformacional na gp41, permitindo a fusão das membranas virais e celulares, e conseqüentemente a entrada do HIV-1 na

célula hospedeira. O inibidor da fusão T-20, um peptídeo sintético composto por 36 aminoácidos, imita o domínio C-terminal HR2 da gp41 e liga-se competitivamente ao HR1. Assim, as interações entre HR1 e HR2 são bloqueadas e a alteração conformacional da gp41, que é necessária para a fusão dos vírions às células hospedeiras, é inibida (HIRSCH *et al.*, 2008). O T-20 é indicado para o tratamento anti-HIV em terapias de resgate de pacientes multi experimentados com falha terapêutica. Outro IF aprovado para a utilização nos esquemas terapêuticos é o Maraviroc, que liga-se ao co-receptor CCR5, evitando a sua interação com a proteína gp120 (PUGACH *et al.*, 2008).

#### **1.4 Mutação e Resistência do HIV-1 aos ARVs**

Uma característica importante do HIV-1 é a sua grande diversidade genética que pode ocasionar o surgimento de mutações. Uma mutação pode gerar alterações de aminoácidos, ocasionando alteração da estrutura e função da proteína. As mutações associadas à resistência podem conferir diminuição da susceptibilidade às drogas utilizadas, resistência cruzada ou aumento de susceptibilidade a ARVs ainda não utilizados, limitando assim as opções de tratamento (KANTOR *et al.*, 2004). Apesar disso, os vírus com mutação de resistência apresentam uma capacidade replicativa viral, ou seja, um fitness viral, menor que os vírus selvagens. Por esse motivo, quando o uso de drogas é interrompido, deixando de exercer pressão seletiva, os vírus selvagens, por terem maior vantagem replicativa, voltam a prevalecer no paciente em relação aos vírus resistentes (MILLER, 2001).

As mutações genéticas do HIV-1 podem ser classificadas como principais ou acessórias. As mutações principais, apesar de terem como consequência uma diminuição do *fitness* viral, alteram a ligação de uma droga ao sítio ativo da enzima, reduzindo diretamente a susceptibilidade da enzima aos ARVs (SHAFER, 2002). As mutações acessórias aparecem para compensar a diminuição do *fitness* viral causada pelas mutações principais, reconstituindo a capacidade replicativa do vírus, porém são incapazes, na ausência de mutações primárias, de conferir resistência aos ARVs (SCHÜPBACH, 2003).

A nomenclatura das mutações é baseada em um consenso com base nas sequências do subtipo B do HIV Sequence Database, do Laboratório Nacional de

Los Alamos (KORBER *et al.*, 1998). Para indicar a mutação, usa-se em primeiro lugar o aminoácido normalmente encontrado nessa posição seguido da sua posição no códon e posteriormente o aminoácido que o substituiu causando a mutação, como por exemplo na mutação M41L que indica que houve substituição de uma metionina por uma valina no códon 41.

Os polimorfismos naturais do HIV-1 não conferem resistência aos ARVs, consistindo apenas de variantes genéticas com capacidade de replicação semelhante à variante selvagem. Estas variantes polimórficas ocorrem com frequência em pacientes não submetidos a qualquer terapêutica (WILSON & BEAN, 2000). A resistência genotípica é decorrente da presença de mutações virais associadas com comprometimento da susceptibilidade à droga ou resposta virológica, constituindo uma importante limitação para a terapia com ARVs. (HIRSCH, 2008).

O acúmulo de mutações de resistência diminui a suscetibilidade às drogas, reduzindo progressivamente a potência dos componentes do esquema terapêutico. A replicação contínua do vírus na presença das drogas aumenta a resistência às mesmas. Sendo assim, esquemas terapêuticos pouco potentes, adesão sub-ótima e absorção limitada dos ARVs podem favorecer o surgimento de vírus resistentes; fato este que origina um ciclo vicioso de falha terapêutica, deixando o tratamento ainda mais difícil (RICHMAN *et al.*, 2003).

#### 1.4.1 Resistência associada aos INTRs

As mutações de resistência aos INTRs predominam no mundo, pois historicamente os INTRs foram a primeira classe de ARV introduzida no tratamento de pacientes com HIV-1 (SHET *et al.*, 2006).

Há dois mecanismos bioquímicos principais que conduzem à resistência aos INTRs. A inibição alostérica provocada por mutações como a M184V, Q151M, L74V ou K65R permitem a TR distinguir entre dNTP fisiológico e o INTR, preferindo incorporar os dNTPs. A fosforólise via ATP (adenosina trifosfato) é provocada por mutações dos análogos da timina como a M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y e K219Q, que removem os INTRs que já tinham sido incorporados na cadeia de DNA proviral em formação, permitindo assim que seja retomada a síntese do DNA

complementar. A fosforólise promove a resistência cruzada entre INTRs (MENDOZA *et al.*, 2003; NAEGER *et al.*, 2001; CLAVEL & HANCE, 2004).

A resistência aos INTRs pode desenvolver-se através de uma única mutação ou através de um acúmulo sucessivo de mutações, como no caso da resistência que se desenvolve ao AZT. Após falha terapêutica com uso do AZT geralmente torna-se detectável uma mutação no códon 70 da TR, mas é substituída pela mutação, mais estável, no códon 215. Com o tratamento prolongado, outras mutações nos códons 41, 67 e novamente 70 desenvolvem-se, conferindo ao HIV maior resistência ao AZT (HIRSCH *et al.*, 1998).

As mutações aos análogos da timina (TAMs) são comuns em regiões onde a combinação de ARVs contendo análogos da timina (AZT e d4T) são a base da terapia (SHAFFER & SCHAPIRO, 2008). As TAMs apresentam dois padrões de resistência. As TAMs do tipo I incluem as mutações M41L, L210W e T215Y, que causam altos níveis de resistência aos análogos da timina e em menor grau ao ABC, ddl e TDF. As TAMs do tipo II incluem as mutações D67N, K70R, T215F e K219Q/E. A mutação D67N também ocorre freqüentemente com a TAM do tipo I (SHAFFER & SCHAPIRO, 2008 ; WHITCOMB *et al.*, 2003).

As mutações de reversão T215C/D/E/I/S/V surgem na ausência da pressão seletiva exercida pelos ARVs originadas da mutação T215Y/F. Estas mutações não tem efeito sobre a susceptibilidade à droga, mas a presença de mutações de reversão em indivíduos não tratados sugere que o paciente possa ter sido infectado originalmente com o vírus contendo T215Y ou F que posteriormente sofreu reversão (SHAFFER & SCHAPIRO, 2008). Em indivíduos tratados a mutação T215Y/F é decorrente do uso do AZT e d4T (GARCIA-LERMA *et al.*, 2001).

As mutações acessórias K43EQN, E44DA, V118I, H208Y, D218E, H221Y, L228HR e N348I ocorrem em aproximadamente 1% dos indivíduos não-tratados, e estão associadas à redução na susceptibilidade a múltiplos INTRs. A combinação E44DA com V118I causam resistência de baixo nível ao 3TC, porém quando estão associadas a TAM, estas mutações reduzem a susceptibilidade a maioria dos INTRs.

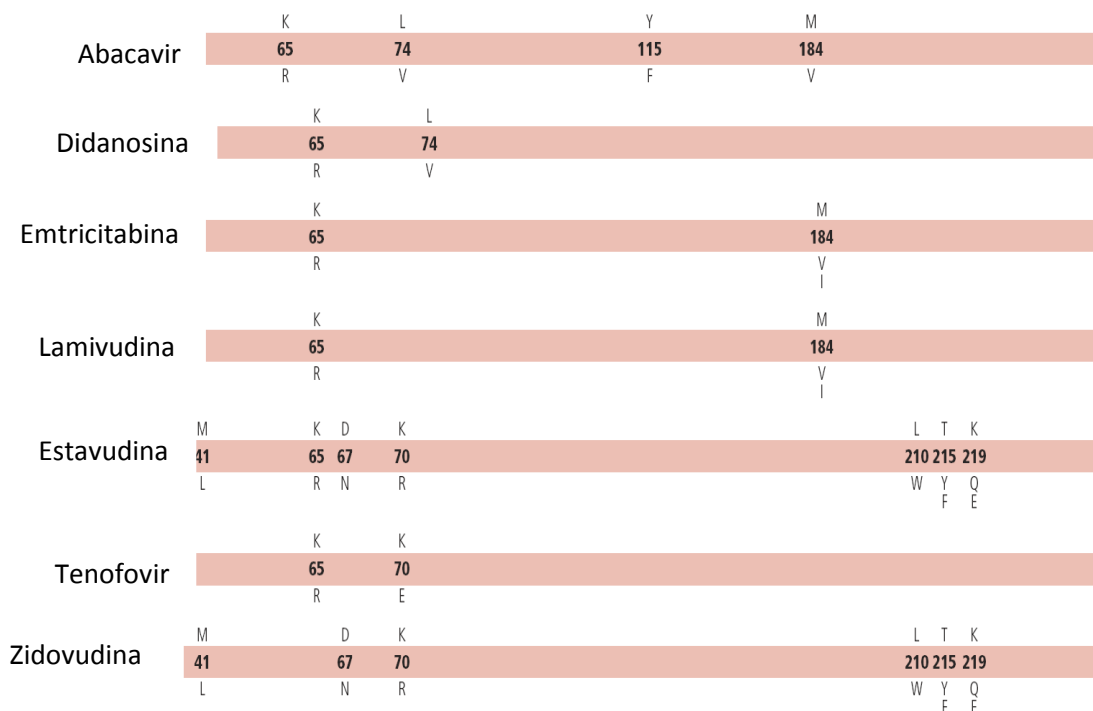


Figura 6 - Mutações no gene da TR associadas com a resistência aos INTRs. Na figura as linhas verticais indicam TAMs (*Thimidine-Associated Mutations*), a letra superior refere-se ao aminoácido do vírus selvagem sem mutação (*wild type*), a letra inferior ao aminoácido de substituição, a numeração em negrito indica as mutações primárias e a restante as mutações acessórias (adpatada de JOHNSON *et al.*, 2009).

#### 1.4.2 Resistência associada aos INNTRs

As mutações que conferem resistência aos INNTRs ocorrem em dois clusters, entre os códons 100-108 e 179-190, próximos ao sítio alostérico de ligação da TR do HIV-1, desestabilizando o local de ação das drogas, impedindo seu acoplamento e inibindo a ação da enzima (TOLEDO, 2010). A ligação entre a enzima TR e os diferentes INNTRs pode desencadear diferentes mutações no sítio ativo da enzima, sendo as mutações K103N e Y181C mais frequentes associadas à resistência aos INNTRs (BOYER *et al.*, 1993).

Devido à baixa barreira genética para resistência aos INNTRs, uma única mutação no sítio de ligação da TR pode resultar em alto grau de resistência a um ou mais INNTRs, ocasionando um alto nível de resistência cruzada (LECOSSIER *et al.*, 2005).

As mutações principais K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188L/C/H e G190A/S/E causam alto nível de resistência à NVP e níveis variados de resistência ao EFV. As mutações P225H e K238T/N usualmente ocorrem em combinação com a

K103N e reduzem sinergicamente a susceptibilidade a NVP e ao EFV. As mutações secundárias L100I, K101P, P225H, F227L, M230L e K238T usualmente ocorrem em combinação com uma das mutações principais de resistência aos INNTRs. As mutações L100I e K101P em combinação com a K103N promovem uma diminuição da susceptibilidade à NVP e EFV (Figura 7).

Efavirenz				L	K	K	V	V			Y	Y	G		P
				<b>100</b>	<b>101</b>	<b>103</b>	<b>106</b>	<b>108</b>			<b>181</b>	<b>188</b>	<b>190</b>		<b>225</b>
				I	P	N	M	I			C	L	S		H
											I		A		
Etravirina		V	A	L	K		V		E	V	Y		G		M
		90	98	<b>100</b>	<b>101</b>		106		138	179	<b>181</b>		190		230
		I	G	I	E		I		A	D	C		S		L
					H					F	I		A		
					P					T	V				
Nevirapina				L	K	K	V	V			Y	Y	G		
				<b>100</b>	<b>101</b>	<b>103</b>	<b>106</b>	<b>108</b>			<b>181</b>	<b>188</b>	<b>190</b>		
				I	P	N	A	I			C	C	A		
							M				I	L			
												H			

Figura 7 - Mutações no gene da TR associadas com a resistência aos INNTRs. A letra superior refere-se ao aminoácido do vírus selvagem sem mutação (*wild type*), a letra inferior ao aminoácido de substituição, a numeração em negrito indica as mutações primárias e as demais indicam as mutações acessórias (adpatada de JOHNSON *et al.*, 2009).

### 1.4.3 Resistência associada aos IPs

As mutações no gene da PR ocorrem por substituições de aminoácidos que emergem no sítio de ligação do substrato da enzima ou em sítios distantes. Estas alterações de aminoácidos modificam a afinidade e os pontos de contato da enzima com os IPs (CONDRA *et al.*, 1995; KAPLAN *et al.*, 1994). As mutações da PR nas posições 46, 54, 82 e 90 estão entre as mais freqüentes nas mutações de resistência aos IPs (SHAFER, 2009).

Dentre as mutações de resistência para IPs, as mutações primárias ou maiores ocorrem inicialmente, promovem redução substancial da sensibilidade ao IP e reduzem a capacidade replicativa viral. Geralmente ocorrem no sítio de ligação às drogas (HIRSCH *et al.*, 1998). Mutações menores ou secundárias emergem posteriormente e isoladamente tem menor efeito na resistência, podem alterar a taxa de replicação viral e podem estar presentes como polimorfismos, principalmente em vírus de subtipo não-B (JOHNSON *et al.*, 2005). Normalmente, a resistência a IPs desenvolve-se gradualmente com o acúmulo de múltiplas mutações maiores e



A mutação L90M tem sido relatada em isolados de pacientes tratados com SQV, NFV, IDV e RTV e contribui para a resistência de cada um dos IPs aprovados. Mutações no códon 73, incluindo a G73C/S/T tem sido relatadas em 10% dos pacientes recebendo IDV ou SQV. Entretanto, esta mutação ocorre mais frequentemente em pacientes com falha de múltiplo IPs, usualmente em conjunto com a L90M.

#### 1.4.4 Resistência associada aos Inibidores da IN

As mutações de resistência aos inibidores de IN aparecem com frequência como polimorfismos naturais (JOHNSON *et al.*, 2008). As mutações de resistência relacionadas ao raltegravir encontram-se nos códons 143, 148 e 155 da IN. Mutações nas posições 92, 121, 140, 148 e 155 estão associadas com uma redução de 5 a 10 vezes da susceptibilidade do raltegravir e elvitegravir, enquanto mutações nas posições 66 e 147 são associadas com a redução da susceptibilidade somente ao elvitegravir (SHAFER & SCHAPIRO, 2008).

	Y	Q	N
Raltegravir	<b>143</b>	<b>148</b>	<b>155</b>
	R	H	H
	H	K	
	C	R	

Figura 9 - Mutações no gene da IN associadas com a resistência aos inibidores da integrase. A letra superior refere-se ao aminoácido do vírus selvagem sem mutação (*wild type*), a letra inferior ao aminoácido de substituição, a numeração em negrito indica as mutações primárias (adpatada de JOHNSON *et al.*, 2009).

#### 1.4.5 Resistência associada aos Inibidores de Fusão

A resistência ao T-20, inibidor de fusão aprovado pelo FDA, está associada primeiramente à mutações na região HR1 (“Heptad Repeat 1”) do gene que codifica a gp41. Além destas, mutações ou polimorfismos em outras regiões do envelope, como, por exemplo, na região HR2, pode também afetar a susceptibilidade a esta droga (JOHNSON *et al.*, 2008). Uma única substituição de aminoácidos na gp41 pode reduzir a eficácia do T-20.



4,42% para os INTRs e INNTRs, e 2,24% para os IPs (BRINDEIRO *et al.* 2003). Esta prevalência é considerada baixa em relação à outros países como Alemanha (13%), França (10%-17%), Reino Unido (14%), América do Norte (15%-26%), Espanha (23%-26%) e Argentina (15,4%) (DUWE *et al.*, 2001; CHAIX *et al.*, 1999; TAMALET *et al.*, 2000; UK COLLABORATIVE GROUP ON MONITORING THE TRANSMISSION OF HIV DRUG RESISTANCE, 2001; LITTLE *et al.*, 2001; BODEN *et al.*, 1999; BRODINE *et al.*, 1999; BRIONES *et al.*, 2001; PUIG *et al.*, 2000; GOMEZ-CANO *et al.*, 1998; KIJAK *et al.*, 2001). Outros estudos realizados em diversas regiões do Brasil evidenciaram uma variação da prevalência de resistência primária. Porto Alegre identificou apenas 2,78% de resistência primária em 76 isolados de pacientes virgens de tratamento com a presença das mutações para os INTRs e INNTRs (M41L, K103N, L210W e T215Y) (RODRIGUES *et al.*, 2006). Em Recife verificou-se 3,6% de resistência primária entre 84 pacientes com a presença das mutações INTRs (M41L e K219E) (MEDEIROS, *et al.*, 2006). Um estudo realizado em São Paulo revelou 6,5% de resistência primária em 123 pacientes virgens de tratamento (GONSALEZ *et al.*, 2007). No Centro-Oeste, em um estudo conduzido em Goiânia com 103 pacientes virgens de tratamento apresentou uma freqüência de resistência primária de 10,3% e 8,2% de acordo com Stanford e IAS-USA, respectivamente (CARDOSO *et al.*, 2009). Estudos realizados em recém infectados pelo HIV-1 das cidades de Santos/SP e Salvador/BA revelaram altos índices de isolados com resistência primária (36% e 22%, respectivamente) (SUCUPIRA *et al.* 2007, PEDROSO *et al.* 2007).

Um estudo realizado em 2007 com 387 pacientes virgens de tratamento em 20 centros distribuídos em treze cidades Brasileiras (Ribeirão Preto, Santo André, Santos, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Curitiba, Florianópolis, Salvador, Brasília, 2 em Campinas, 2 em Porto Alegre e 6 na cidade de São Paulo) revelou uma freqüência de resistência primária de 5,7%, sendo: 1,3% para os INRTIs, 4,4% para os INNRTIs e 1,0% para os IPs. A prevalência de resistência primária em cada uma das regiões estudadas variou de 0% na cidade de Santos a 9.9% na cidade de São Paulo. A considerável diferença na prevalência da resistência primária em relação ao estudo realizado por Sucupira *et al.* (2007) na cidade de Santos reflete microdiferenças que podem ocorrer em uma mesma região

decorrentes da presença de pacientes HIV+ em diferentes estágios de infecção (SPRINZ *et al.*, 2009).

Em 2009 um estudo multicêntrico brasileiro realizado com 210 pacientes HIV+ virgens de tratamento em seis grandes centros urbanos, que concentram mais de 70% dos casos de aids no país (São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Brasília e Belém) revelou 8,1% de resistência primária sendo: taxa intermediária (entre 5% e 15%) em quatro cidades (São Paulo, Rio de Janeiro, Belém e Brasília) contrastando com outras cidades, tal como Porto Alegre e Salvador, onde a taxa de resistência primária foi considerada baixa (< 5%) (INOCÊNCIO *et al.*, 2009).

## 1.6 Falha Terapêutica

A terapia ARV leva ao aumento significativo das células TCD4<sup>+</sup> e queda da carga viral de pelo menos *um log* nos primeiros meses de tratamento. No entanto, mesmo sob tratamento regular, muitos pacientes voltam a ter aumento da carga viral (VIEIRA *et al.*, 2000). Ocorre falha terapêutica quando, na vigência de tratamento ARV, o paciente apresentar qualquer infecção oportunista (falha clínica); quando houver queda progressiva na contagem de células TCD4<sup>+</sup> (falha imunológica); quando houver aumento repetido da carga viral (geralmente aumento maior que 0,5 log ou contagem superior a três vezes ou mais) ou quando a carga viral permanecer constantemente detectável, ou seja, acima de 200 cópias/mL após 24 semanas (falha virológica) (TURNER *et al.*, 1994; GUIDELINES FOR THE USE OF ANTIRETROVIRAL AGENTS IN HIV-1-INFECTED ADULTS AND ADOLESCENTS, 2011). A manutenção dos ARVs na presença de carga viral detectável leva ao acúmulo de mutações de resistência. Em um estudo realizado nos Estados Unidos cerca de 60% dos pacientes submetidos à terapia ARV desenvolveram novas mutações de resistência após 18 meses, em um índice calculado como sendo de 1,61 nova mutação adquirida por ano (NAPRAVNIK, 2005). Após um ano de viremia persistente, há perda de uma opção de droga em cerca de 30% dos pacientes (HATANO *et al.*, 2006). Quanto mais elevada a carga viral na presença da medicação, maior a chance de seleção de novas mutações de resistência (NAPRAVNIK *et al.*, 2005).

A falta de adesão do paciente ao tratamento, intolerância à droga, administração do ARV em níveis inadequados, absorção inadequada do medicamento, interação entre as drogas utilizadas e seleção de resistência viral às drogas podem acarretar falha terapêutica (PIERSON *et al.*, 2000; GHOSN *et al.*, 2006). Estudos demonstram que um significativo número de pacientes apresenta falência às combinações de drogas, em virtude do desenvolvimento da resistência secundária do HIV-1. Em um estudo realizado na Região Nordeste, envolvendo os Estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, foram avaliados 516 pacientes que apresentavam falha à HAART que, ao serem submetidos a exames de genotipagem do HIV-1, evidenciaram que 91,1% apresentaram resistência relacionada aos INTRs, 58,7% apresentaram resistência relacionada aos INNTRs e 94,8% apresentaram resistência aos IPs (CAVALCANTI *et al.*, 2007).

O aumento na carga viral na vigência de tratamento é a melhor expressão de surgimento de cepa viral resistente. A resistência viral é demonstrada pela presença de mutações nos genes *pol*, *env* e *gag*. A caracterização destas mutações é feita pelo teste de genotipagem do HIV-1.

### **1.7 Teste de Genotipagem para Determinação de Resistência às Drogas Antirretrovirais**

O teste de genotipagem é um ensaio baseado na amplificação genética mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes *pol*, *env* e *gag* do HIV-1. A análise da sequência nucleotídica do genoma permite identificar a presença de mutações que se traduzem em uma diminuição da susceptibilidade a um ou mais ARVs. O teste de genotipagem pode otimizar a terapia de resgate, pois a sua realização logo após confirmação de falha virológica pode orientar a mudança precoce do esquema ARV, reduzindo a chance de acúmulo progressivo de mutações e de ampla resistência ARV. O alto custo e o tempo de execução do exame são compensados pela substituição direcionada do fármaco, reduzindo os custos, os efeitos adversos e principalmente o aparecimento de novas mutações com resistência aos ARVs (WALKER & GIBB, 2011). Entretanto a OMS preconiza que o teste genotípico pré-tratamento somente se justifica em regiões onde a

prevalência de resistência primária seja de intermediária (5% a 15%) a alta (maior que 15%) (WHO, 3003; MYATT & BENNETT, 2008).

A metodologia do teste de genotipagem envolve extração do RNA viral, transcrição reversa para obtenção de um cDNA, amplificação por PCR do genoma e seqüenciamento automático de DNA (GRANT *et al.*, 2003).

Em 2001 foi implantada no Brasil a RENAGENO, pelo Ministério da Saúde, que atualmente é composta de 23 laboratórios executores e um de resgate ([www.aids.gov.br](http://www.aids.gov.br)). Os dados gerados por essa rede permitem estimar, nas diferentes áreas geográficas, os subtipos genéticos do HIV-1 circulantes, a prevalência de mutações e sua associação com o estadiamento clínico, exposição prévia aos medicamentos e aos esquemas terapêuticos em uso no momento da coleta. Na prática clínica, o resgate da terapia ARV pode ter mais chance de sucesso se for feito o teste de genotipagem de resistência às drogas (SHAFER, 2002).

As mutações relacionadas à resistência aos ARVs podem ser avaliadas pelas ferramentas de bioinformática como a do programa da Universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database - <http://hivdb.stanford.edu>), do banco de dados do *International Aids Society* dos Estados Unidos da América de 2009 (IAS/USA) ou de outros algoritmos como o do Programa Nacional de DST/aids. O programa da Universidade de Stanford, disponível gratuitamente online, define as mutações a partir de diferenças com a sequência consenso do subtipo B do HIV-1 e fornece informação do perfil de resistência as drogas ARVs (suscetível, potencial de baixo nível, baixo nível, intermediário e alto nível de resistência). O banco de dados do IAS/USA não é um algoritmo para a avaliação de resistência e inclui mutações que não são necessariamente marcadores de resistência, embora possam contribuir para a resistência de pacientes em tratamento (GERETTI, 2007). As mutações que conferem susceptibilidade reduzida aos ARVs são permanentemente atualizadas na Web, no site oficial do Laboratório Nacional de Los Alamos, Estados Unidos (HIV sequence database, <http://lanl.gov>) ou da Universidade de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/hiv/>).

A limitação do teste de genotipagem consiste em não detectar as variantes resistentes minoritárias que representam menos que 20% - 30% da população viral total (VANDAMME *et al.*, 2004). Outro ensaio denominado PCR em tempo real, que

é um teste 10-60 vezes mais sensível que o teste de genotipagem convencional, tem sido testado para detecção de populações virais minoritárias. Um estudo realizado com um grupo de 205 pacientes revelou 17% de mutações pela PCR em tempo real apesar de não terem sido detectadas mutações pelo teste de genotipagem convencional (JOHNSON *et al.*, 2008).

### **1.8 Terapia de Resgate**

Atualmente, devido a diversos fatores, incluindo intolerância e/ ou má adesão ao tratamento, uso prévio de esquemas inadequados e, mais raramente, resistência primária, há uma parcela de pacientes que apresenta vírus resistentes e que necessita de novos esquemas de ARVs, denominados “terapia de resgate” (BRASIL, 2007). Distintamente do que ocorre em relação à terapia inicial, há escassez de recomendações consensuais específicas para escolha de esquemas de resgate. A melhor forma de orientar um novo tratamento, especialmente na primeira falha, é baseá-lo no teste de genotipagem (TURAL *et al.*, 2002).

Dois fármacos são recomendados como esquema de resgate: o T-20 e o DRV. Porém existem alguns critérios para a utilização destes fármacos como esquema de resgate. O T-20 é indicado exclusivamente para terapia de resgate fazendo parte de um esquema contendo, no mínimo, uma a duas outras drogas ativas. Por ter baixa barreira genética, a resistência desenvolve-se rapidamente se for usada sem outra droga ativa no esquema, ou seja, em monoterapia funcional. O DRV apresenta potência antiviral elevada, mesmo na presença de mutações de resistência aos IP de uso corrente (CLOTET *et al.*, 2007). Devido a sua comprovada eficácia como droga de resgate e ao seu alto custo, o DRV é reservado para casos de multirresistência. É essencial evitar a monoterapia funcional, isto é, seu uso sem acompanhamento de outra droga ativa. (BRASIL, 2007).

## 1.9 Mecanismos da Diversidade Genética do HIV-1

Uma das características mais marcantes do HIV-1 é sua alta diversidade genética que é resultante de uma somatória de fatores. Erros de leitura da enzima TR, que não possui a propriedade de correção das fitas recém originadas durante o processo de replicação viral, resultam em uma taxa de erro na incorporação de nucleotídeos de aproximadamente  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  por sítio, por ciclo de replicação, originando formas genéticas diversas e complexas mas intimamente relacionadas denominadas “quasiespécies” (DOMINGO *et al.*, 1997). Outros mecanismos que contribuem para a diversificação genética do HIV-1 são a recombinação viral e a elevada capacidade replicativa do HIV-1, que gera em torno de  $10^{10}$  partículas virais por dia em indivíduos não submetidos à terapia ARV (NÁJERA *et al.*, 2002). Quanto maior a capacidade replicativa, mais freqüentemente estes eventos de recombinação poderão ocorrer (NÁJERA *et al.* 2002). Além disso, a adaptabilidade viral e a pressão seletiva como a resposta imune e o uso de ARVs contribuem para a variabilidade viral (SPIRA *et al.*, 2003).

## 1.10 Tópicos de Epidemiologia Molecular do HIV-1

Dois tipos de HIV são reconhecidos atualmente: o HIV-1 e o HIV-2, que embora relacionados, apresentam diferenças importantes em sua estrutura genômica e patogênica (CLAVEL *et al.*, 1986). O HIV-1 é o principal responsável pela atual epidemia da aids no mundo, enquanto que os casos de infecção pelo HIV-2 encontram-se restritos a África Ocidental e algumas regiões da Europa (CLAVEL *et al.*, 1986, PIANIAZEK *et al.*, 1991).

O HIV-1 pode ser classificado em quatro grandes grupos: M, N, O e P (PLANTIER *et al.*, 2009). O HIV-1 dos grupos N e O são geneticamente distintos do grupo M e são restritos geograficamente ao continente Africano (UNAIDS 1997; ROBERTSON *et al.* 2000). 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 o continente Africano (SIMON *et al.*, 1998). O vírus do grupo P foi recentemente identificado em Camarões, está estreitamente relacionado ao SIVgor e não mostra evidências de recombinação com

outras linhagens do HIV-1 (PLANTIER *et al.*, 2009). 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). A análise genética de isolados do HIV-1 revelou a existência, dentro do grupo M, de dez subtipos distintos: A, B, C, D, F, G, H, I, J e K, além de quatro sub-subtipos (A1, A2, F1 e F2) e 49 formas recombinantes circulantes (LOS ALAMOS, 2010).

Estudos de epidemiologia molecular indicam que ao contrário da África Central, onde todos os grupos do HIV-1 e subtipos do grupo M já foram identificados, nas demais regiões existe um padrão específico para a distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 (HEMELAAR *et al.*, 2006). Este padrão pode ocorrer devido ao tipo de *vírus fundador* que iniciou a epidemia em cada uma dessas regiões, resultando na predominância de determinado subtipo naquela população. O subtipo A predomina em áreas Central e Leste da África (Quênia, Uganda, Tanzânia, e Ruanda) e União Soviética. O subtipo B é a forma genética predominante na Europa, nas Américas, na Austrália, em alguns países do sudeste da Ásia e no norte da África (KOUSIAPPA *et al.*, 2009, HESLOP *et al.*, 2009; , NADAI *et al.*, 2009). O subtipo C predomina na África do Sul e Índia, sendo responsável por mais de 80% das infecções pelo HIV-1 no mundo, devido à dispersão incontrolada no Botswana, Zimbábue, Malawi, Zâmbia, Namíbia, Lesoto, África do Sul, Índia, Nepal e China (BUONAGURO *et al.*, 2007; SPIRA *et al.*, 2003). O subtipo F foi documentado na África Central, América do Sul e leste Europeu. O subtipo G foi relatado no leste da África e na Europa central. O subtipo D está geralmente limitado às porções leste e central da África, com casos esporádicos observados no sul e oeste da África. Na América do Sul embora o subtipo B seja prevalente, os subtipos C e F são também epidemiologicamente importantes devido ao aumento da prevalência do subtipo C e das formas recombinantes no Brasil (FONTELLA *et al.*, 2008).

Os isolados do HIV-1 que circulam no Brasil são, principalmente, dos subtipos B, F1, C e das formas recombinantes, os quais são distribuídos em frequências variáveis entre as diversas regiões. O subtipo B é predominante no Brasil, exceto em algumas áreas na Região Sul do país, como no Rio Grande do Sul, onde o subtipo C predomina (BONGERTZ *et al.*, 2000; BRINDEIRO *et al.*, 2003; GADELHA *et al.*, 2003; CERQUEIRA *et al.*, 2004; BRIGIDO *et al.* 2005; BARRETO *et al.*, 2006; STEFANI *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2009; RABONI *et al.*,

2010; SILVA *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2010). Estudos brasileiros identificaram um subtipo B variante chamado “B” brasileiro, o qual difere do subtipo B clássico pela presença de um motivo GWGR na parte superior da alça V3 do envelope da gp120, ao invés da assinatura molecular GPGR (MORGADO *et al.*, 1996; STEFANI *et al.*, 2000; CABRAL *et al.*, 2006; VÉRAS *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2008).

Estudos da Região Sudeste do país, onde se concentra grande parte dos pacientes HIV+/aids indicam a prevalência de cepas do subtipo B, seguido dos recombinantes B/F1, e dos subtipos F1 e C (SÁ-FILHO *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2006). O primeiro relato de infecção por vírus recombinante B/F1 no Brasil é procedente desta região (SABINO *et al.*, 1994). Formas recombinantes B/D e alguns casos de infecção pelos subtipos A e D também foram descritos (TANURI *et al.*, 1999, GUIMARÃES *et al.*, 2002, COUTO-FERNANDEZ *et al.*, 2006). O subtipo D foi descrito no Brasil em um estudo realizado no Estado do Rio de Janeiro, em cinco amostras colhidas entre 1996 e 2005. O sequenciamento quase completo desses genomas indicou que o subtipo D no Brasil possui estreita relação com os subtipos D encontrados na África do Sul, mostrando a provável origem do subtipo D circulante no Brasil (COUTO-FERNANDEZ *et al.* 2006).

A análise do seqüenciamento das regiões *pol*, *gag* e *env* do HIV-1 de pacientes da cidade de Curitiba - PR e da cidade portuária de Rio Grande – RS confirmou a prevalência do subtipo B na região e mostrou um aumento das formas recombinantes em Curitiba e um aumento da prevalência do subtipo C no Rio Grande (BRINDEIRO *et al.*, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008).

Na região Nordeste, um estudo realizado na Bahia com 52 pacientes revelou o predomínio do subtipo B, seguida das formas recombinantes B/F1, do subtipo F1 e do subtipo C (SANTOS *et al.*, 2009).

Um estudo realizado na Região Norte, nas cidades de Belém e Macapá, a análise do seqüenciamento da região C2V3 do envelope em 89 pacientes indicou a circulação dos subtipos B, F, D e CRF02\_AG, confirmando a alta diversidade genética na Região Amazônica (MACHADO *et al.* 2009).

Na Região Centro-Oeste, alguns estudos que foram desenvolvidos no Estado de Goiás, apontaram um aumento considerável da diversidade de subtipos do HIV-1 nesta região. Estudo de triagem molecular por HMA nos genes *gag* e *env* em gestantes HIV+/aids, demonstrou a presença de vírus dos subtipos B, F e B/A

(STEFANI *et al.* 2000). Outro estudo usando HMA em 406 pacientes recrutados em Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso confirmou o subtipo B como o mais prevalente, seguida das formas recombinantes B/F, B/D, B/C e C/D, e dos subtipos C e F1, mostrando o aumento das formas recombinantes e da circulação do subtipo C nesta região (STEFANI *et al.* 2007). O estudo realizado com 97 pacientes virgens de tratamento ARV em Goiânia revelou predomínio do subtipo B, seguida das formas recombinantes F1/B e F1/C/B, do subtipo F1 e subtipo C (CARDOSO *et al.*, 2009). Em um estudo mais recente realizado com 77 gestantes (35 virgens de tratamento e 42 tratados com ARV) reafirmou o subtipo B como prevalente, seguida das formas recombinantes F1/B, do subtipo F1 e subtipo C (CARDOSO *et al.*, 2010).

### **1.11 Formas Recombinantes do HIV-1**

A circulação de vários subtipos em uma mesma área geográfica favorece infecções duplas por diferentes subtipos virais, que podem ser simultâneas ou seqüenciais. Quando uma infecção dupla ocorre em um único evento de transmissão por vírus geneticamente distintos denomina-se co-infecção. Por outro lado, a superinfecção refere-se às infecções seqüenciais envolvendo pelo menos dois eventos de transmissão (NÁJERA *et al.*, 2002).

A recombinação no HIV-1 é um processo que ocorre quando dois vírus infectam a mesma célula. Estes vírus podem ser do mesmo subtipo, de subtipos diferentes, e poderão ser produzidos vírions recombinantes. Durante o processo de transcrição, a enzima TR pode “saltar” de uma fita de RNA de um vírus para outra fita de outro vírus e o resultado da recombinação é a síntese de uma fita de DNA viral contendo segmentos dos dois RNA iniciais (HU & TEMIN, 1990).

Estes recombinantes são classificados em duas categorias: CRFs decorrentes de um mesmo evento de recombinação genética intersubtipos e identificadas em pelo menos três indivíduos sem vínculo epidemiológico; e URFs constituídas por vírus recombinantes que não constituem classe ou grupo filogenético definido, identificados em apenas um indivíduo ou em um grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico (NÁJERA *et al.* 2002; LOS ALAMOS, 2006). Eventos de recombinação em áreas onde as CRFs predominam podem resultar em uma segunda geração de recombinantes (SGRs), como no caso da CRF33\_01B

descrita na Malásia, que é resultante da recombinação do subtipo B com a CRF01\_AE (LOS ALAMOS, 2010).

As CRFs representam a forma predominante no norte da Tailândia (CRF01\_AE) e Senegal (CRF02\_AG) (KIJAK *et al.*, 2010; DIOP-NDIAYE *et al.*, 2010). A primeira CRF encontrada na América do Sul foi a CRF12\_BF identificada na Argentina. Estudos conduzidos nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil identificaram 6 novas CRFs: CRF28\_BF circulante na cidade de Santos; CRF29\_BF encontrada em pacientes das cidades de Santos, São Paulo e Rio de Janeiro; CRF31\_BC presente na Região Sul do Brasil; CRF39\_BF1 e CRF40\_BF1 no Estado do Rio de Janeiro; e CRF46\_BF no Estado de São Paulo. Estudos realizados nas Regiões Norte e Sudeste revelaram a introdução da CRF02\_AG. A identificação de várias formas recombinantes circulantes brasileiras claramente indica que a epidemia pelo HIV-1 no país é bem mais complexa do que se pensava (THOMSON *et al.*, 2000; COUTO-FERNANDES *et al.*, 2005; SÁ-FILHO *et al.*, 2006; SANABANI *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2006; EYER-SILVA *et al.*, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2009; SANABANI *et al.*, 2010).

Atualmente 49 CRFs e mais de 100 URFs já foram identificadas no mundo (LOS ALAMOS, 2010). Estes números estão aumentando como resultado de múltiplas recombinações entre subtipos e CRFs em epidemias locais. Por outro lado, o número de recombinantes detectadas também aumentou devido a uma melhora da tecnologia, que permite o seqüenciamento completo do genoma do vírus aliado à disponibilidade de softwares mais avançados para detecção de recombinações.

Para identificar novas CRFs é necessário que as seqüências completas ou quase completas dos genomas dos HIV-1 sejam comparadas filogeneticamente com subtipos distintos em diferentes regiões do genoma. Além disto, seqüências idênticas de nucleotídeos do HIV-1 recombinantes devem ser identificadas, em pelo menos, três indivíduos sem vínculo epidemiológico (BLACKARD *et al.*, 2002; LOS ALAMOS, 2006).

## 2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

---

De acordo com o Boletim Epidemiológico do Programa Nacional de DST/AIDS/MS de 2010, do início de 1980 até junho de 2010, o Ministério da Saúde contabilizou 592.914 casos de aids no Brasil, sendo 7.615 no Estado de Mato Grosso. Apesar de diversos estudos de caracterização de subtipos do HIV-1 e de resistência primária terem sido realizados em amostras da população brasileira, há poucos dados relativos ao Estado de Mato Grosso. A maioria dos estudos foi realizada em pacientes das Regiões Sul e Sudeste, onde se concentram mais da metade dos pacientes com HIV+/Aids do País. Os testes de genotipagem, no Estado de Mato Grosso, são realizados apenas em um número reduzido de pacientes que preenchem os critérios de falha terapêutica pela RENAGENO.

O resultado deste estudo visa contribuir para o conhecimento da prevalência de mutações associadas à resistência primária aos ARVs e, conseqüentemente para o acompanhamento da disseminação de vírus resistentes. Além disso, a caracterização dos subtipos de HIV-1 em diferentes áreas geográficas é importante para o monitoramento da introdução e disseminação dos subtipos do HIV-1 nas diversas regiões brasileiras.

## 3 OBJETIVOS

---

### 3.1 Objetivo Geral

Detectar mutações associadas à resistência primária aos ARVs e subtipos do HIV-1 no gene *pol* de isolados de pacientes HIV+/Aids atendidos no Laboratório Central e de Saúde Pública de Mato Grosso (LACEN-MT).

### 3.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a prevalência de mutações associadas à resistência primária aos ARVs em pacientes do Estado de Mato Grosso;
2. Verificar o perfil de resistência primária aos ARVs;
3. Identificar os subtipos genéticos do HIV-1 nas sequências dos genes da PR e fragmento da TR;
4. Caracterizar isolados do HIV-1 recombinantes no gene *pol*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1 Ética em Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás (Protocolo CEPMHA/UFG nº 073/05 (Anexo 1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller, da Universidade Federal de Mato Grosso (Protocolo nº 435/CEP/HUJM/07 (Anexo 2); e financiado pelo Programa Nacional DST/AIDS do Ministério da Saúde / UNESCO (Grant # 310-06).

### 4.2 Grupo de Estudo

O estudo foi realizado com 105 pacientes com HIV+/AIDS que compareceram ao LACEN-MT, na cidade de Cuiabá, para a realização dos exames de Quantificação da Carga Viral e Contagem de células TCD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> entre outubro de 2008 e setembro de 2009. Para o cálculo de tamanho da amostra foi utilizado um Intervalo de Confiança de 95%, erro amostral de 2% e prevalência de 5% baseada em estudos anteriores de resistência primária realizados em diversas regiões do País (BRINDEIRO *et al.*, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2006; BARRETO *et al.*, 2006; GONSALEZ *et al.*, 2007).

Os critérios de inclusão foram pacientes virgens de tratamento ARV com carga viral detectável (acima de 200 cópias/ml).

Após explicação detalhada sobre o estudo, todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Anexo 3). Para pacientes com idade inferior a 18 anos o TCLE foi assinado pelos pais ou representante legal. Em seguida os participantes foram submetidos à entrevista utilizando-se um questionário padronizado (Anexo 5) para obtenção de dados epidemiológicos e demográficos. Após a entrevista foram coletados 5ml de sangue venoso periférico em tubo vacutainer-EDTA (Becton e Dickinson, San Jose – CA, USA). No LACEN as amostras de sangue total foram centrifugadas e divididas em duas alíquotas (1mL) de plasma e estocadas a -70°C. Após a realização dos exames de

quantificação da carga viral e de contagem de células TCD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, as amostras de pacientes com viremia acima de 200 cópias/ml foram enviadas sob refrigeração para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública na Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG), para realização da Genotipagem do HIV-1, para determinação do subtipo do HIV-1 e de resistência associada aos ARVs.

### **4.3 Quantificação da Carga Viral do HIV-1**

Determinou-se a carga viral do HIV-1 por meio de conjuntos de reagentes comerciais HIV-1 RNA 3.0, (*Siemens Medical Solutions Diagnostics, Tarrytown, NY - USA*), em sistema semiautomatizado *System Versant 340 Assay* utilizando a tecnologia bDNA (do inglês, *branched deoxyribonucleic acid*), seguindo-se as especificações e procedimentos do fabricante.

Os exames de Quantificação da Carga Viral do HIV-1 e Contagem de células TCD4<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> foram realizados na rotina do LACEN-MT.

### **4.4 Contagem de Células TCD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>**

A contagem absoluta de células TCD3<sup>+</sup>/TCD4<sup>+</sup> e TCD3<sup>+</sup>/TCD8<sup>+</sup> foi realizada pelo sistema automatizado FACSCount (*Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, Califórnia-USA*), com conjuntos de ensaios comerciais, de acordo com os procedimentos e instruções do fabricante.

### **4.5 Caracterização Genotípica do HIV-1**

#### **4.5.1 Extração do RNA Genômico**

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o kit de extração QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme protocolos do fabricante: a partir de 140 µl de amostra de plasma, 5,6 µl da enzima carrier-RNA e 560 µl do tampão de lise, seguido por 10 minutos (min) de incubação a temperatura ambiente (15-25 °C), as partículas virais circulantes foram lisadas e o RNA foi precipitado com 560 µl de etanol absoluto (Merck). Durante uma rápida centrifugação (8000 rpm por

1 min), o RNA foi adsorvido a uma membrana de sílica. Seguiram-se duas etapas rápidas de centrifugações com um volume de 500 µl de tampão de lavagem em cada etapa, para que as proteínas e outros contaminantes fossem retirados garantindo a pureza do RNA. A eluição do RNA da coluna de sílica foi realizada com uma rápida centrifugação com 60 µL de tampão de eluição. As amostras de RNA foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

#### 4.5.2 Síntese do DNA Complementar Através da Retrotranscrição do RNA

A transcrição reversa do RNA para obtenção do cDNA foi realizada com o kit de transcrição reversa do RNA (Invitrogen) conforme protocolos do fabricante: a partir de 10 µl de RNA extraído ( $\leq 1$  µg), 1 µl de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (mistura de dNTPs constituída por dATP desoxiAdenina trifosfatada; dCTP desoxiCitosina trifosfatada; dTTP desoxiTimina trifosfatada e dGTP desoxiGuanina trifosfatada) (10 mM) e 1 µl primer randômico (150 ng/µl) seguiu-se uma incubação de 5 min a 65 °C e após, choque térmico em gelo por 1 min. Em seguida foi adicionado 1 µl da enzima Super Script III RT (200 U/µl), 4 µl de tampão 5x, 1 µl do agente redutor ditioneitol (DTT a 0,1 M), 1 µl da enzima RNase out (40 U/ml) e 1 µl de água ultra pura (Gibco). A reação de retrotranscrição foi realizada com o período de ciclagem de 25 °C por 5 min, 50 °C por 60 min seguida de finalização da reação a 70 °C por 15 min. As amostras de cDNA foram armazenadas à temperatura de -80 °C.

#### 4.5.3 Amplificação do Gene *pol* do HIV-1 Através da Reação de “nested”-PCR

Duas regiões diferentes do gene *pol* foram alvos de amplificação por “nested”-PCR: o gene completo da PR (HXB2, 2253-2549) e fragmento de aproximadamente 750 pb do gene da TR (HXB2, 2550-3299).

Na primeira etapa da “nested”-PCR foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> a 50 mM (Invitrogen), dNTP a 25 mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5 U/µl (Invitrogen), *primers* externos para a região *pol*, Kozal-1 e Kozal-2 (Gibco), 5 µl do cDNA obtido por RT-PCR e água ultra pura (Gibco) qsp 50 µl.

H <sub>2</sub> O Ultra Pura.....	33,45 µl
Tampão de PCR 10x.....	5 µl
MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....	3,5 µl
Mistura de dNTP 25 mM.....	0,8 µl
<i>Primer</i> K1 10 pmoles/µL.....	1 µl
<i>Primer</i> K2 10 pmoles/µL.....	1 µl
Taq 5 U/µL.....	0,25 µl
Amostra de cDNA.....	5 µl
Volume total.....	50 µL

Na segunda etapa da “nested-PCR” foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> a 50 mM (Invitrogen), dNTP a 25 mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5 U/µl (Invitrogen), *primers* internos para a região *pol*, DP10 e Frenkel-2 (Gibco), 5 µl do produto da primeira etapa da “nested-PCR” e água ultra pura (Gibco) qsp 100 µl.

H <sub>2</sub> O Ultra Pura.....	71,9 µL
Tampão de PCR 10x.....	10 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM .....	7 µL
Mistura de dNTP 25 mM.....	1,6 µL
<i>Primer</i> DP-10 10 pmoles/µL.....	2 µL
<i>Primer</i> F2 10 pmoles/µL.....	2 µL
Taq 5 U/µL.....	0,5 µL
Produto da 1ª etapa.....	5 µl
Volume total.....	100 µL

As duas etapas da “nested”-PCR para a região *pol* do HIV-1 foram realizadas utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 seg, 55 °C por 45 seg e 72 °C por 2 min, extensão final de 72 °C por 10 min e 4 °C por tempo indeterminado.

As informações sobre as sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados para o gene *pol* do HIV-1 na “nested”-PCR encontram-se listados a seguir:

**Tabela 1 - Sequência dos Primers de 5' → 3' para o Gene *pol* do HIV-1.**

Primers	Sequência 5' → 3'	Localização HXB2*	Comprimento
K1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	2147-2166	20 pb
K2	TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGAC	3309-3338	30 pb
DP10	CAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG	2198-2223	26 pb
DP16	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC	2253-2274	22 pb
DP17	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT	2529-2549	21 pb
DP11	CCATTCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	2572-2598	27 pb
RT9	GTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC	2469-2598	29 pb
RT1	CCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA	2604-2632	29 pb
F2	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	3301-3321	21 pb
F3	TATCAGGATGGAGTTCATAAC	3241-3261	21 pb

\* Localização dos primers relativo a sequência de referência do HIV-1 (HXB2, K03455).

#### 4.5.4 Eletroforese em Gel de Agarose 1%

Os fragmentos de amplificação obtidos por “nested”-PCR do gene *pol* do HIV-1 foram submetidos a eletroforese aplicando-se uma mistura de 4 µl de produto de amplicon e 1 µl de azul de bromofenol puro (Gibco) ao gel e paralelamente 4 µl de uma mistura de padrão de peso molecular (100 bp Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e 1 µl de azul de bromofenol puro (Gibco). Este marcador de peso molecular consiste em uma mistura de fragmentos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pb contendo 200, 120, 80, 40, 20, e 10 ng de DNA, respectivamente.

A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (Horizon 11-14 e 25-25 Gel Electrophoresis Apparatus, Gibco-Life Technologies, USA) durante 1 h a 100 V, 400 mA em tampão TAE 1x. O gel foi analisado sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda para visualização de bandas fluorescentes.

#### 4.5.5 Purificação dos Produtos Amplificados dos Genes *pol* do HIV-1 Obtidos Através da “nested”-PCR

Os produtos amplificados da segunda etapa da “nested”-PCR do gene *pol* foram purificados empregando-se o kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme protocolos do fabricante: 96 µl do produto amplificado da segunda etapa da “nested”-PCR foram adicionados a 480 µl de tampão com alta concentração de sais caotrópicos que modifica a estrutura da água e permite um pH ótimo para ligação eficiente de produtos de PCR de dupla fita e, ainda remove primers, sais, enzimas e nucleotídeos não incorporados. Mediante uma etapa rápida de centrifugação (13000 rpm por 1 min), o produto de PCR foi adsorvido a uma membrana de sílica. Seguiu-se uma etapa rápida de centrifugação com um volume de 750 µl de tampão de lavagem, para que as proteínas e outros contaminantes fossem retirados garantindo a pureza do produto de PCR. Uma etapa rápida de centrifugação adicional foi requerida para eliminação total de resíduos dos tampões. A eluição do produto puro de PCR da membrana de sílica foi realizada com 50 µl de tampão de eluição que provoca a redução do pH e da concentração de sais, seguida por uma incubação de 1 min a temperatura ambiente e uma etapa rápida de centrifugação. As amostras de produto de PCR purificadas foram armazenadas à temperatura de -20 °C.

#### 4.5.6 Sequenciamento Automatizado dos Genes *pol* do HIV-1

Os produtos do gene *pol* do HIV-1 obtidos por PCR e purificados foram submetidos ao sequenciamento automatizado utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, USA). Em placas de 96 poços (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) foram adicionados 2 µl de produto de PCR purificado, 3 µl de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA), 4 µl de cada um dos 8 *primers* separadamente a 1,5 pmol/µl para o gene *pol* (Gibco) (Tabela - DP10, DP11, DP16, RT9, RT1, RT4, F2 e F3), 1 µl de DyeNamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) e 5 µl de água ultra pura (Gibco). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático com o seguinte programa de ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 seg, 50 °C por 15 seg e 60 °C por 60 seg.

Os produtos sequenciados foram submetidos à precipitação com isopropanol e etanol para purificação do material. Foram adicionados à placa contendo amostra sequenciada, 60 µl de isopropanol 65% (Merck), homogeneizadas em vórtex por 30 seg, seguida de incubação por 20 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Seguiu-se uma centrifugação de 45 min a 2000 *g* (força centrífuga relativa a gravidade). Após esse período, os sobrenadantes foram descartados por inversão das placas em papel absorvente por 2 min. Foram adicionados 250 µl de etanol 60% (Merck) seguido por centrifugação por 10 min a 2000 *g*. Novamente os sobrenadantes foram descartados e adicionados 100 µl de etanol 60% (Merck) seguido por centrifugação por 10 min a 2000 *g*. Os sobrenadantes foram descartados e a placa invertida foi centrifugada por 1 min a 500 rpm para sua completa secagem. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) para desnaturação da fita dupla de DNA, seguida por um período de incubação de 2 min a 95°C e choque térmico em gelo por 2 min. A leitura dos eletroferogramas foi realizada em sequenciador automático (ABI PRISM<sup>®</sup> 3100 ou 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

#### 4.5.7 Análise dos Cromatogramas

Após a obtenção dos cromatogramas, as sequências foram submetidas ao programa Phred (EWING *et al.*, 1998) para serem avaliadas quanto à qualidade. As sequências foram editadas manualmente por comparação de complementaridade dos contigs e alinhadas com a sequência de referência HXB2 mediante o programa *Staden Package* 1.6 para Windows (<http://staden.sourceforge.net/>). Este programa consiste em uma série de ferramentas para preparação das sequências (pregap4), montagem e edição (gap4) e análise de sequências de DNA e proteínas (spin) e foi obtido gratuitamente através do site <http://staden.sourceforge.net/>.

Todas as sequências geradas por edição manual no programa *Staden Package* foram submetidas a análises de controle de qualidade para garantir ausência de possíveis contaminações entre as amostras (LEARN *et al.*, 1996). Esta análise foi realizada utilizando-se o programa de bioinformática *HIV Quality Analysis Pipeline* (<http://www.sanbi.ac.za>), que testa as sequências quanto a possível existência de contaminação fazendo BLAST (comparação) com um banco de dados

público do GenBank de aproximadamente 200.000 sequências publicadas e um BLAST com o banco de dados interno do laboratório.

#### **4.6 Análise Genética**

A presença de mutações relacionadas à resistência aos ARVs foi avaliada com a ferramenta de bioinformática do programa da Universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database - <http://hivdb.stanford.edu>) que, define as mutações a partir de diferenças da sequência consenso do subtipo B do HIV-1. Por análise de similaridade genética, as mutações virais encontradas pela técnica de sequenciamento foram interpretadas e forneceram informação do perfil de resistência as drogas ARVs (suscetível, potencial de baixo nível, baixo nível, intermediário e alto nível de resistência). Além disso, a análise de resistência aos ARVs também foi avaliada por comparação com o banco de dados da Sociedade internacional de Aids dos Estados Unidos da América de 2009 (IAS/USA). Como o banco de dados de resistência é dinâmico, no mês de dezembro de 2010 todas as sequências foram reanalisadas, a fim de que os resultados refletissem as análises de um mesmo banco de dados. A ferramenta de calibração da população com resistência (CPR), da Universidade de Stanford, também foi utilizada para estimar a prevalência de resistência primária na população de pacientes virgens de tratamento ARV.

A definição dos subtipos genéticos dos isolados do HIV-1 estudados foi realizada empregando diversas ferramentas de subtipagem como: programa REGA HIV-1 versão 2.0 disponível no site <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html>; programa Jumping Profile Hidden Markov Model (jpHMM-HIV) disponível no site <http://jphmm.gobics.de> (ZHANG *et al.*, 2006); e também por inferência filogenética. Os isolados com subtipos discordantes na região da PR e na TR foram analisados pelo Simplot 3.5.1 para caracterizar recombinação intersubtipo.

A construção da árvore filogenética foi realizada pelo alinhamento das sequências de estudo com sequências de referência mais representativas dos diversos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1 obtidas do banco de dados Los Alamos HIV Database ([http://hiv\\_web.lanl.gov](http://hiv_web.lanl.gov)). O alinhamento foi realizado com o programa Clustal X versão 2.0 (THOMPSON *et al.*, 1994) disponível

no site <http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>. O alinhamento foi editado manualmente pelo programa BioEdit versão 5.0.9 (HALL, 1999) disponível no site <http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>. A árvore filogenética foi construída empregando-se o método neighbor-joining e o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (KIMURA,1980) com valor de suporte (*bootstrap*) de 1000 replicatas, usando o programa MEGA versão 4.0 (TAMURA *et al.*, 2007), disponível no site [http://www.megasoftware.net/fixed\\_bugs.html](http://www.megasoftware.net/fixed_bugs.html). A sequência do SIVcpz foi utilizada como grupo externo.

#### **4.7 Análise Estatística**

O banco de dados contendo todas as informações de cada paciente deste estudo foi construído com o programa SPSS para Windows versão 13.0 (Chicago, IL, USA), que também foi utilizado para a análise descritiva das principais variáveis. Valores de carga viral acima ou abaixo do limite de detecção da técnica foram assumidos como os valores máximo ou mínimo, respectivamente, para fins de cálculos da mediana.

## 5 RESULTADOS

---

### 5.1 Características Sócio – Demográficas e Epidemiológicas

Dos 105 pacientes recrutados, 92 tiveram o HIV-1 sequenciado na região *pol*-PR e TR. As principais características sócio-demográficas e epidemiológicas destes pacientes (Tabela 2) indicam predomínio do sexo masculino (58,7%, 54/92). A mediana de idade foi de 36 anos. O contato sexual representou a via predominante de exposição. A mediana das contagens de TCD4+ foi de 305 células/ $\mu$ l e a mediana da viremia plasmática dos pacientes foi de 16.210 cópias/ml.

Com relação ao nível de escolaridade dos pacientes HIV-1/aids, 49,0% (45/92) haviam concluído o ensino fundamental e 10,8% (10/92) haviam cursado Ensino Superior. A maioria dos pacientes (55,4% - 51/92) era procedente da Baixada Cuiabana, que engloba as cidades de Cuiabá, Campo Verde, Chapada dos Guimarães, Jangada, Nobres, Poconé, Santo Antonio do Leverger e Várzea Grande.

Do total de pacientes, 45,7% (42/92) apresentaram diagnóstico recente, entre os anos de 2008 e 2009.

Tabela 02 - Características sócio-demográficas e epidemiológicas c  
pacientes recrutados em Mato Grosso

<b>Características</b>	<b>n (%)</b>
<b>Idade (anos)</b>	
mediana (variação)	36 (12-65)
12-19	3 (3,3)
20-40	54 (58,7)
> 40	35 (38,0)
<b>Sexo</b>	
Masculino	54 (58,7)
Feminino	38 (41,3)
<b>Categoria de Exposição</b>	
heterossexual	80 (87,0)
homossexual	7 (7,5)
Vertical	1 (1,1)
Ignorada	4 (4,4)
<b>Escolaridade</b>	
Analfabeto	5 (5,4)
Ensino Fundamental	45 (49,0)
Ensino Médio	32 (34,8)
Ensino Superior	10 (10,8)
<b>Ano do Diagnóstico</b>	
1995-2000	6 (6,5)
2001-2007	44 (47,8)
≥2008	42 (45,7)
<b>TCD4 (células/μl)</b>	
mediana (variação)	305 (8-1469)
<b>Carga Viral (cópias/ml)</b>	
mediana (variação□)	16210 (210-500000)
<10.000	35 (38,0)
10.000-100.000	37 (40,2)
>100.000	20 (21,□)

## 5.2 Resistência Primária nos genes da PR e fragmento da TR

Dos 105 pacientes virgens de tratamento, 92 tiveram o gene *pol* do HIV-1 amplificado por PCR e sequenciado. Dos 13 pacientes em que não foi possível a amplificação da amostra, a mediana da carga viral foi de 546 cópias/ml e a mediana da contagem de TCD4<sup>+</sup> foi de 624 células/ $\mu$ l.

As mutações que conferem resistência viral aos INTRs, INNTRs ou aos IPs foram observadas em 5,4% dos pacientes (IC 95%: 1,8%-12,2%). Todos os pacientes com mutação de resistência primária eram do sexo feminino, referiam exposição heterossexual e foram diagnosticados entre 2003 e 2008. Entre essas pacientes, quatro foram infectadas com o HIV-1 do subtipo B e apenas uma apresentou vírus recombinante C/B (tabela 3).

. Tabela 3 – Mutações no gene da PR e TR do HIV-1 relacionadas à resistência primária aos ARVs em 5 pacientes de Mato Grosso

Sequência	Ano do Diagnóstico	Idade/ Subtipo	Classe de drogas			Perfil de Resistência		
			INTR	INNTR	IP	Baixo	Intermediário	Alto
BRMT2718	2006	31/B <sup>PR</sup> B <sup>TR</sup>	K219E	-	-	AZT d4T	-	-
BRMT485	2006	49/B <sup>PR</sup> B <sup>TR</sup>	-	K103N	-	-	-	DLV EFV NVP
BRMT824	2008	57/B <sup>PR</sup> B <sup>TR</sup>	M41L	-	-	ABC ddI TDF	AZT, d4T	-
BRMT848	2003	41/C <sup>PR</sup> B <sup>TR</sup>	D67N	-	-	AZT, d4T	-	-
BRMT2358	2008	39/B <sup>PR</sup> B <sup>TR</sup>		-	L90M	ATV/r, FPV/r	IDV/r, SQV/r	NFV

DLV: delavirdina; EFV: efavirenz; NVP: nevirapina; ABC: abacavir; ddl: didanosina; TDF: tenofovir; ATV: atazanavir; FPV: fosamprenavir; IDV: indinavir; SQV: saquinavir; NFV: nelfinavir; AZT: zidovudina; d4T: estavudina

### 5.2.1 Resistência viral aos INTRs

Entre os 5 pacientes com resistência, 3 apresentaram mutações que conferem resistência aos INTRs. As mutações encontradas foram: K219E (n=1) e D67N (n=1) que apresentam potencial de resistência de baixo nível para o AZT e d4T. Também foi encontrada a mutação M41L (n=1), que sozinha não tem efeito sobre a susceptibilidade aos INTRs, porém quando associada a mutação T215Y/F diminui a susceptibilidade ao ABC, ddI e TDF. Neste estudo a mutação M41L estava associada a mutação de reversão T215C. Mutações acessórias relacionadas aos INTRs foram relatadas em 11 pacientes, sendo: L210F/M (3/11), V118I (3/11), E138A (1/11), E44D (1/11), T215C (1/11), T69S (1/11) e V90I (1/11) (Gráfico 1).

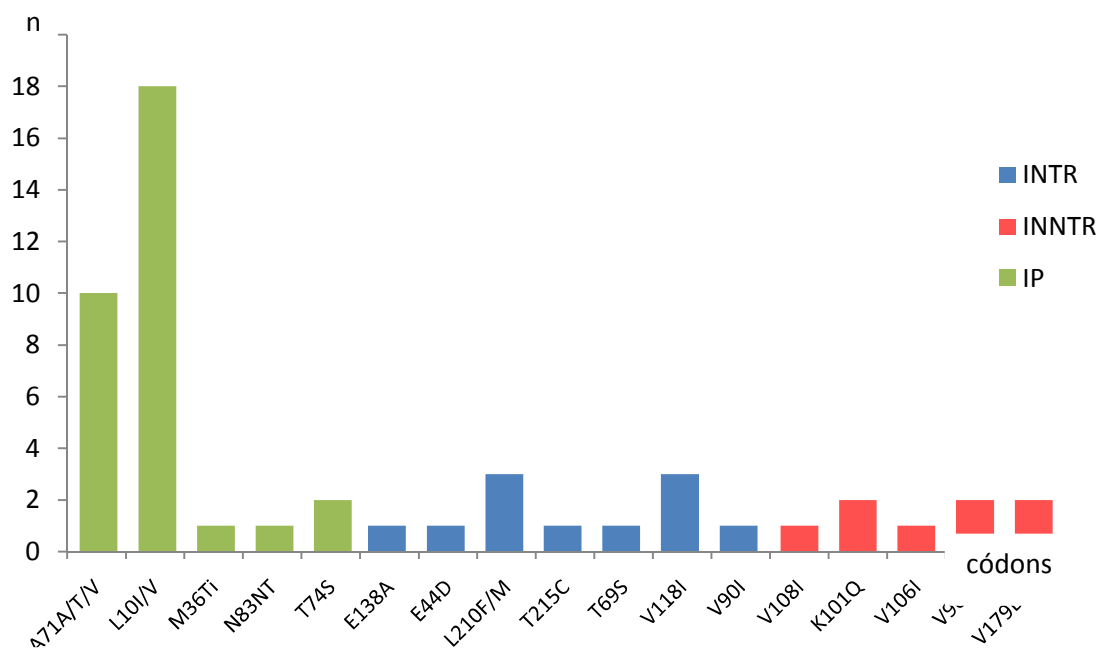
### 5.2.2 Resistência viral aos INNTRs

A mutação de resistência viral K103N foi relatada em um paciente e confere potencial de resistência de nível alto à DLV, EFV, NVP e ETR. Mutações acessórias relacionadas aos INNTRs foram identificadas em 8 pacientes, sendo: K101Q (2/8), V90IV (2/8), V179D/E (2/8), V108I (1/8) e V106I (1/8) (Gráfico 1).

### 5.2.3 Resistência viral aos IPs

A mutação L90M, que confere resistência viral aos IPs, foi relatada em um paciente com potencial de resistência de baixo nível ao ATV e FPV; potencial de resistência de nível intermediário ao IDV e SQV; e potencial de resistência de nível alto ao NFV. As mutações acessórias no gene da PR foram identificadas em 32 pacientes, sendo: L10I/V (18/32), A71A/T/V (10/32), T74S (2/32), M36Ti (1/32) e N83NT (1/32). Os dois pacientes que possuíam a mutação acessória T74S apresentaram o subtipo C do HIV-1 (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Mutações Acessórias no Gene da PR e TR relacionadas aos INTRs, INNTRs e IPs em pacientes recrutados no Estado de Mato Grosso (n=92).



### 5.3 Diversidade Genotípica do HIV-1 nos genes da PR e TR

A análise da diversidade genética do HIV-1 nos genes da PR e TR de isolados de pacientes virgens de tratamento recrutados em Cuiabá indicou predomínio do subtipo B, que representou 71,7% (66/92) dos isolados. Os subtipos C e F1 representaram 5,4% (5/92) e 3,3% (3/92), respectivamente (Figura 11).

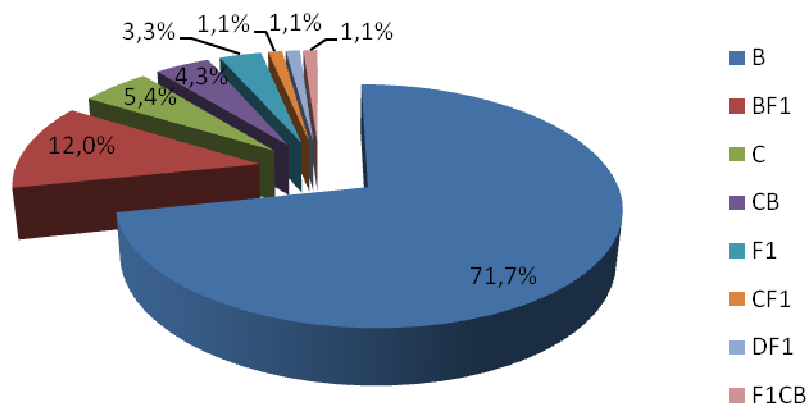


Figura 11 – Subtipos encontrados nos genes da PR e TR.

Em 19,7% dos isolados foram identificados subtipos discordantes na PR e TR, refletindo uma alta prevalência e uma extensa variedade de formas recombinantes do HIV-1 em Mato Grosso. A presença de recombinação intersubtipo nos genes da PR e TR foi confirmada por bootscanning: B/F1 (11/18), C/B (4/18), C/F1 (1/18), F1/CB (1/18), D/F1 (1/18) (Figura 12).

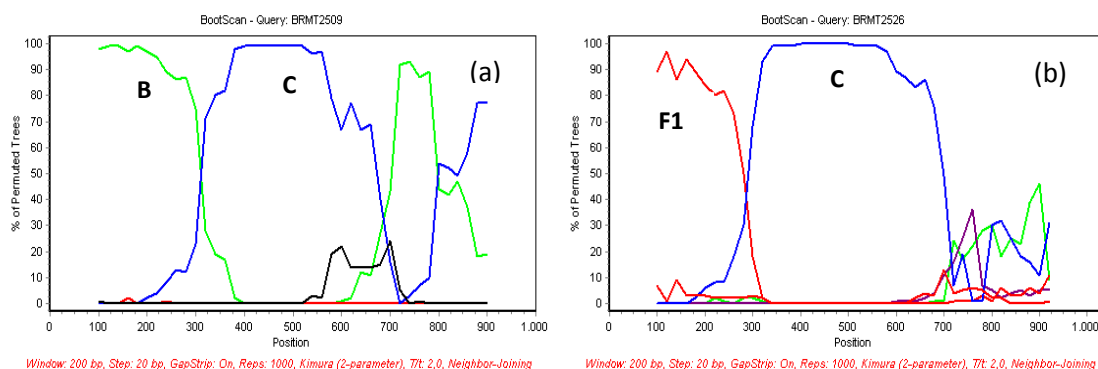


Figura 12 – Análise de recombinação da amostra pelo programa Simplot 3.5.1 de acordo com a comparação com os subtipos de referência na região da polimerase do HIV-1 utilizando Bootscan de 1000 replicatas com método de distância Neighbor-Joining e Kimura- 2 parâmetros. Cada linha representa um subtipo específico de acordo com a sequência de referência, resultando nos subtipos discordantes B<sup>PR</sup>C<sup>TR</sup> (a) e F1<sup>PR</sup>C<sup>TR</sup> (b).

Com base na análise filogenética quatro pares de amostras encontravam-se estreitamente relacionadas, sendo: BRMT2566/BRMT2567 mãe/filho; e as amostras BRMT1338/BRMT1340, BRMT1194/BRMT1195 e BRMT2708/BRMT2709 eram provenientes de casais heterossexuais (Figura 13). Esta relação filogenética foi confirmada pelo bootstrap alto.

No presente estudo a análise de pontos de recombinação feita por bootscanning usando o software Simplot evidenciou duas amostras com pontos de recombinação idênticos à da CRF31\_BC e uma amostra com ponto de recombinação idêntico à da CRF29\_BF, que foram denominadas respectivamente CRF31\_like e CRF29\_like por ter sido feito apenas o seqüenciamento parcial do genoma do HIV-1.

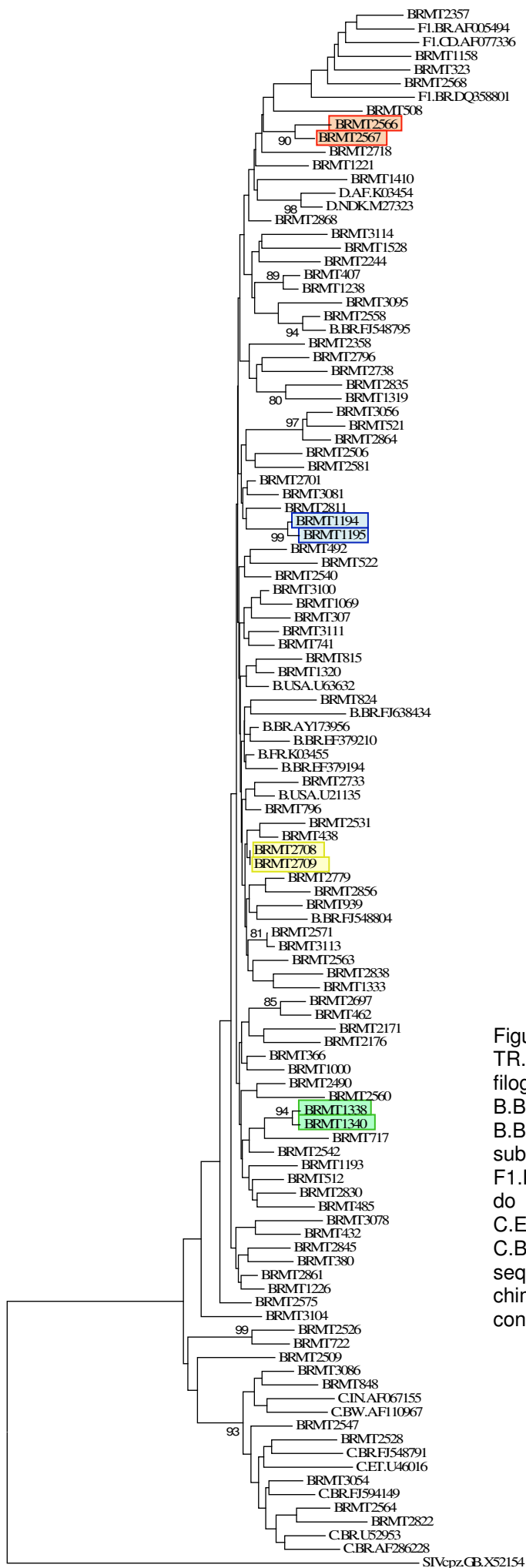


Figura 13 – Classificação filogenética nos genes da PR e TR. Os números de acesso do GenBank usados na análise filogenética são: B.USA.U21135, B.BR.FJ638434, B.BR.AY173956, B.FR.K03455, B.BR.EF379194, B.BR.EF379210, B.BR.FJ548804 e B.USA.U63632 do subtipo B; D.AF.K03454 e D.NDK.M27323 do subtipo D; F1.BR.DQ358801, F1.CD.AF077336 e F1.BR.AF005494 do subtipo F1; C.IN.AF067155, C.BW.AF110967, C.ET.U46016, C.BR.FJ548791, C.BR.FJ594149, C.BR.AF286228 e C.BR.U52953 do subtipo C; e a sequencia do Virus da imunodeficiência símia do chimpanzé (SIVcpz) X52154. As amostras em destaque constituem amostras estreitamente relacionadas.

Entre os homens, o subtipo B foi encontrado em 38 das amostras. Dentre os 80 pacientes que relataram categoria de exposição heterossexual, 60 apresentaram o subtipo B e 14 apresentaram vírus recombinantes B/F1, C/F1, F1/CB e C/B. Dos 7 pacientes que relataram a categoria de exposição homossexual, 5 tiveram suas amostras caracterizadas como subtipo B. O único paciente infectado por transmissão vertical no presente estudo apresentou HIV-1 recombinante B/F1. As três pacientes gestantes que participaram do estudo possuíam formas recombinantes entre os subtipos B e C. Em pacientes diagnosticados antes de 2001, foi detectada a presença de um paciente proveniente de Brasília/DF com vírus recombinante B/F1.

## 6 DISCUSSÃO

---

O presente estudo revelou uma prevalência de baixa a intermediária (5,4% - IC 95%: 1,8%-12,2%) de resistência primária em indivíduos infectados pelo HIV-1 recrutados entre 2007-2009 na região da Grande Cuiabá. Este resultado é concordante com estudos realizados em diversas regiões do Brasil (BRINDEIRO *et al.*, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006; GONSALEZ *et al.*, 2007; SPRINZ *et al.*, 2009; INOCENCIO *et al.*, 2009). No Centro-Oeste, um estudo conduzido em Goiânia com 103 pacientes apresentou uma frequência de resistência primária entre 10,3% e 8,2% de acordo com Stanford e IAS-USA, respectivamente (CARDOSO *et al.*, 2009). Embora a maioria dos estudos brasileiros indique uma resistência aos ARVs entre baixa a intermediária, dois estudos realizados em recém infectados pelo HIV-1 das cidades de Santos/SP e Salvador/BA revelaram altos índices de isolados com resistência primária (36,8% e 27,8% respectivamente) (SUCUPIRA *et al.* 2007, PEDROSO *et al.* 2007). Essa alta frequência de resistência primária reflete a utilização dos ARVs no Brasil, e conseqüentemente a transmissão de vírus resistentes.

O perfil de mutações observado neste estudo, com mutações de resistência mais freqüentes para a classe dos ITRs, é similar ao observado em outros estudos nacionais (INOCÊNCIO *et al.*, 2009; SPRINZ *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009), que apresentaram uma considerável persistência de mutações associadas aos ITRs, porém com perfis quantitativo e qualitativo diferentes. Isto se deve ao fato do uso preferencial de ITRs no início da terapia e também da maior persistência de mutações associadas aos ITRs, mesmo na ausência da pressão seletiva aos ARVs.

Neste estudo foi detectada a mutação T215C, que é uma mutação de reversão, na qual a forma mutante T215Y/F, que ocasiona resistência aos INTRs, se converte em T215C com o objetivo de melhorar o seu *fitness* viral. As mutações de reversão não reduzem a susceptibilidade aos INTRs, mas sugerem que a mutação T215Y/F pode estar presente de forma minoritária no genoma viral causando resistência aos ARVs (GARCIA-LERMA *et al.*, 2001). Um outro estudo realizado na Região Centro-Oeste também identificou a presença das mutações de reversão T215D/S em quatro pacientes virgens de tratamento (CARDOSO *et al.*, 2009).

Com relação aos dados apresentados, alguns aspectos devem ser levados em consideração. Uma das limitações deste estudo consiste na utilização da técnica de genotipagem convencional, que detecta apenas populações majoritárias do vírus que representem mais de 20% da população viral total (JOHNSON *et al.*, 2008). Mutações de resistência em indivíduos virgens de tratamento tendem a se tornar minoritárias com o tempo devido a ausência da pressão seletiva exercida pelos ARVs, não sendo portanto detectadas nas técnicas de genotipagem usuais (VANDAMME *et al.*, 2004). Desta forma, os dados apresentados podem subestimar a prevalência real de mutações de resistência. Além disso, no presente estudo foi relatada apenas a data do diagnóstico, não sendo possível saber se a infecção pelo HIV-1 é recente ou crônica.

Atualmente o teste de genotipagem do HIV-1 está implantado no seguimento de pacientes com falha virológica a fim de obter melhores resultados na estratégia de tratamento, pois mostra as principais mutações relacionadas aos ARVs em uso. A OMS recomenda que seja feito o teste de genotipagem pré-tratamento somente quando a população infectada apresentar resistência primária de intermediária à alta (WHO, 2003). Desta forma os resultados da maioria dos estudos brasileiros sobre a prevalência de resistência primária, incluindo este com pacientes do Estado de Mato Grosso, reforçam a não recomendação da genotipagem pré-terapia uma vez que a prevalência de resistência encontrada foi considerada de baixa a intermediária (BRINDEIRO, *et al.*, 2003; MEDEIROS, *et al.*, 2006; GONSALEZ *et al.*, 2007).

A análise dos dados coletados através de inquérito epidemiológico mostrou que os pacientes do Estado de Mato Grosso possuem as características epidemiológicas semelhantes às observadas na maioria das regiões do país (MEDEIROS *et al.*, 2006; GONSALEZ *et al.*, 2007; INOCENCIO *et al.*, 2009). No estudo destacaram-se a categoria de exposição heterossexual, com o nível de escolaridade baixo, com número de mulheres infectadas inferior ao dos homens.

A mesma diversidade genética do HIV-1 que causa mutações de resistência aos ARVs também é responsável pelo surgimento de diversos grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1 no mundo. Apesar do subtipo B ter uma maior prevalência em países da América do Sul, Estados Unidos e países Europeus, em escala global representa apenas 12% das infecções; sendo o subtipo C a forma predominante na pandemia mundial causada pelo HIV-1 (TAKEBE, 2004).

O Brasil é um país com grande extensão territorial e diferenças na distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 têm sido relatadas em vários estudos. A epidemia brasileira apresenta três padrões que podem ser separados em função das regiões onde ocorrem: nas Regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste a epidemia é caracterizada por uma maior presença do subtipo B e de formas recombinantes F1/B (SÁ-FILHO *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009); na Região Sul encontra-se um percentual quase igual de isolados dos subtipos B (Paraná) e C (Rio Grande do Sul), além de formas recombinantes contendo ambos os subtipos (RODRIGUES *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2007; SIMON *et al.*, 2010; TOLEDO *et al.*, 2010); e na Região Norte observa-se predominância dos subtipos B e F com ausência do subtipo C (MACHADO *et al.*, 2009).

Neste estudo houve predominância do subtipo B, o que indica um “vírus fundador”, sugerindo assim que o subtipo B provavelmente foi o primeiro a ser introduzido no país e a partir daí foi amplamente disseminado pelas vias sexual, perinatal e parenteral à todas as regiões (MORGADO *et al.* 1994, GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1996, MORGADO *et al.*, 1998). Neste Estado considera-se que a epidemia é mais recente do que a dos Estados portuários como São Paulo e Rio de Janeiro, o que indica um processo de interiorização do HIV-1 do subtipo B de modo semelhante ao observado em outros estudos da Região Centro-Oeste (STEFANI *et al.*, 2007; VERAS *et al.*, 2007; CARDOSO *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2010).

Em Mato Grosso existe uma grande diversidade populacional devido ao forte componente migratório no interior do Estado, principalmente de indivíduos provenientes da Região Sul, o que contribui para a formação de populações heterogêneas (IBGE, 2010). Este fato pode colaborar para a diversidade genética do HIV-1 nestas populações, devido à aglutinação de indivíduos infectados de diferentes locais de origem e que podem apresentar diferentes subtipos do HIV-1. Neste estudo foi observado que os isolados de HIV-1 com formas recombinantes representaram aproximadamente 20% das amostras analisadas, sendo portanto a segunda forma genética mais prevalente no Estado. Este resultado corrobora com estudos conduzidos no Quênia Ocidental, República Democrática do Congo e Tanzânia, onde a recombinação intersubtipo é um importante componente da epidemia da aids (OYARO *et al.*, 2010; DJOKO *et al.*, 2010; MOSHA *et al.*, 2010).

Dentre as formas recombinantes encontradas neste estudo predomina o recombinante B/F1 (12%), semelhantemente ao que tem sido descrito em isolados de pacientes das Regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste (SÁ-FILHO *et al.*, 2005; CABRAL *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2009; CARDOSO *et al.*, 2009). O recombinante B/C, que representou 5,4% das amostras analisadas, já havia sido identificado principalmente em estudos realizados no Rio Grande do Sul (RODRIGUES *et al.*, 2005; SOARES *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; MONTEIRO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2007). O recombinante classificado como subtipo D/F1 foi observado em apenas um paciente. Outro estudo realizado em 2007 na Região Centro-Oeste do Brasil não observou isolado que apresentasse o subtipo D nas regiões *env* e *gag* (STEFANI *et al.*, 2007). O subtipo D tem sido observado no Sudeste do país, de modo particular no estado do Rio de Janeiro e esse subtipo D identificado apresentou uma estreita relação filogenética com o subtipo D circulante na África do Sul (COUTO -FERNANDEZ *et al.*, 2006). Em Mato Grosso, a forma recombinante C/F1, formada entre dois subtipos minoritários (C e F1), foi detectada em um paciente com categoria de exposição heterossexual e proveniente do Estado do Paraná. Esta forma já havia sido descrita em dois estudos realizados na Região Sul do Brasil (BRÍGIDO *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

O subtipo C representou aproximadamente 5% das amostras do estudo (5/92). Estudos realizados nas cidades de Porto Alegre e Rio Grande, no Estado do Rio Grande do Sul, apontam o aumento do subtipo C e a diminuição da prevalência de infecções pelo subtipo B (SOARES *et al.*, 2003a). Salemi *et al.* (2005) desenvolveram estudos estatísticos e comparativos que demonstram que a infecção pelo subtipo C vem se disseminando mais rapidamente em relação ao subtipo B. Segundo essas análises, se o subtipo C continuar a disseminar-se nessa rapidez, este poderá tornar-se o subtipo mais prevalente no Brasil, semelhantemente ao que se observa no Estado do Rio Grande do Sul. Na região Centro-Oeste, especificamente em Goiás, o subtipo C foi identificado primeiramente em 2000, em uma gestante proveniente da Região Sul do Brasil. Entretanto o subtipo C permanece um subtipo pouco representativo em pacientes do Estado de Goiás. Os resultados no Estado do Mato Grosso confirmam a introdução e disseminação do subtipo C do HIV-1 no Estado de Mato Grosso no Centro-Oeste brasileiro. Entretanto chama a atenção o fato de que apesar do grande componente migratório

do sul para o Estado de Mato Grosso, a detecção do subtipo C é considerada esporádica neste Estado.

O presente estudo relatou um percentual reduzido de amostras com subtipo F1 (3,3%). Estudos prévios realizados no Sul e Sudeste brasileiro indicavam o subtipo F1 como o segundo subtipo do HIV-1 mais prevalente no país (MORGADO *et al.*, 1994; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1996; MORGADO *et al.*, 1998; BRIGIDO *et al.*, 2005). Esses estudos foram baseados na análise de uma ou duas regiões do genoma do HIV-1 (*env*, *gag* ou *pol*). Atualmente, com análise de um número maior de regiões genômicas ou análise do genoma completo do HIV-1, observou-se que muitos isolados inicialmente considerados como subtipo F1 eram na verdade formas recombinantes F1/B. Estudos realizados com amostras de HIV-1 de pacientes do Estado de São Paulo, analisadas por sequenciamento completo ou quase completo do genoma, indicavam um alto percentual de formas recombinantes F1/B em amostras anteriormente consideradas B ou F1 (SÁ-FILHO *et al.*, 2006; SANABANI *et al.*, 2006; SANABANI *et al.*, 2009). É concebível que após a introdução inicial das cepas do subtipo F1 no Brasil, sucessivos eventos de recombinação estejam ocorrendo e sejam responsáveis pela redução dessa minoria de subtipo F1 em relação à extensa epidemia do subtipo B. Nossos dados confirmam evidências anteriores de que o subtipo F1 “puro” está se tornando uma forma genética pouco freqüente no Brasil.

Estudos conduzidos nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil identificaram 6 novas CRFs: CRF28\_BF circulante na cidade de Santos; CRF29\_BF encontrada em pacientes das cidades de Santos, São Paulo e Rio de Janeiro; CRF31\_BC presente na Região Sul do Brasil; CRF39\_BF1, CRF40\_BF1 no Estado do Rio de Janeiro e CRF46\_BF em São Paulo. O presente estudo evidenciou uma amostra com ponto de recombinação idêntico à da CRF31\_BC e duas amostras com pontos de recombinação idêntico à da CRF29\_BF, que foram denominadas respectivamente CRF31\_like e CRF29\_like por ter sido feito apenas o seqüenciamento parcial do genoma do HIV-1. Destes, apenas o paciente que apresentou a CRF31\_BC era proveniente do Estado do Paraná, os demais eram provenientes das diversas cidades do Mato Grosso. A presença significativa de formas recombinantes do HIV-1, circulantes no Estado de Mato Grosso indicam ampla circulação territorial de formas híbridas do HIV-1 na Região Centro-Oeste.

## 7 CONCLUSÕES / RECOMENDAÇÕES

---

1. Este estudo revelou uma prevalência de resistência primária de baixa a intermediária em pacientes do Estado de Mato Grosso (5,4%). Levando-se em conta a relação custo-benefício do teste de genotipagem pré-tratamento, estes resultados reforçam a não recomendação deste teste para orientar o início da terapia ARV inicial neste Estado.

2. A presença de resistência primária em Mato Grosso indica a ocorrência da transmissão de cepas resistentes aos ARVs nesta região, por isso é necessário o monitoramento contínuo em indivíduos recém infectados para determinar se cepas resistentes estão sendo transmitidas, e com isso orientar o tratamento ARV.

3. As principais mutações encontradas estão relacionadas aos ITRs, principalmente INTR, refletindo o amplo uso de ITRs no início da terapia ARV.

4. Há extensa diversidade genética do HIV-1 nos pacientes do MT onde co-circulam principalmente o subtipo B; e os subtipos C e F1 em proporções minoritárias.

5. Uma alta prevalência (em torno de 20% dos isolados) e grande diversidade de formas recombinantes B/F1, C/F1, C/B, F1/CB e D/F1 foi observada. Conclui-se então que diversos padrões de HIV-1 recombinantes estão circulando amplamente no país, não só em pacientes das Regiões Sul e Sudeste, mas também na região Centro-Oeste do Brasil. Estes resultados sugerem o monitoramento da resistência primária e diversidade genética do HIV-1 em centros urbanos no interior do país, distantes do epicentro da epidemia na Região Sudeste.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ANTINORI, A. et al. Cross-resistance among nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors limits recycling efavirenz after nevirapine failure. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.18, n. 12, p. 835-8, 2002.

ARRUDA, E. et al. Intermediate Prevalence of HIV Type 1 Primary Antiretroviral Resistance in Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 27, n. 2, p. 153-6, Fev. 2011.

ARTS, E. J. et al. Mature reverse transcriptase (p66/p51) is responsible for low levels of viral DNA found in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Leukemia**, v. 8, s. 1, p. S175-8, 1994.

BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, p. 31-5, 1996.

BARRETO, C. C. et al. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1-infected blood donors in São Paulo, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 41, n. 3, p.338-41, Mar. 2006.

BELLO, G., GUIMARÃES, M. L., MORGADO, M. G. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **AIDS**, v. 20, n. 5, p. 763-8, 2006.

BISWAS, P.; TAMBUSI, G.; LAZZARIN, A. Access denied? The status of co-receptor inhibition to counter HIV entry. **Expert Opin Pharmacother**, v.8, n. 7, p. 923-33, Mai. 2007.

BLACKARD, J. T.; COHEN, D. E.; MAYER, K. H. Human B virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. **Clin Infect Dis**, v. 34, n.8, p. 1108-14, 2002.

BODEN, D. et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. **JAMA**, v. 282, p.1135-41, 1999. DOI: 10.1001/jama.282.12.1135.

BONGERTZ, V. et al. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, n. 2, p. 184-93, 2000.

BOYER, P. L. et al. Analysis of nonnucleoside drug-resistant variants of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **J Virol**, v. 67, n. 4, p. 2412-20, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV**. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV – Suplemento II**. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Boletim Epidemiológico – AIDS e DST**, Ano IV – n. 1 – 1ª a 26ª semanas epidemiológicas janeiro a junho de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Boletim Epidemiológico – AIDS e DST**, Ano VII – n. 1 – 26ª a 52ª semanas epidemiológicas julho a dezembro de 2009 / 1ª a 26ª semanas epidemiológicas janeiro a junho de 2010.

BRÍGIDO, L. F. M. et al. HIV Type 1 Subtype C and CR Pol Recombinants Preval at the Cities with the Highest AIDS Prevalence Rate in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1579–86, 2007.

BRÍGIDO, L. F. M. et al. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in São Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, n. 7, p. 673–82, 2005.

BRINDEIRO, R. M. et. al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, v. 17, n. 7, p. 1063-9, 2003.

BRIONES, C. et al. Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 26, p.145–150, 2001. DOI: 10.1097/00042560-200102010-00006.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 34, n. 2, p. 207-17, Mar-Abr. 2001.

BRODINE, S. K. et al. Drug resistance patterns, genetic subtypes, clinical features, and risk factors in military personnel with HIV-1 seroconversion. **Ann Intern Med**, v. 131, p. 502–506, 1999.

BROWN, P. O. Integration of retroviral DNA. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.157, p.19-48,1990.

BUONAGURO, L.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M. Human Immunodeficiency Virus Type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. **J Virol**, v. 81, n.19, p. 10209-19, oct. 2007.

CABRAL, V. P. et al. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p.881-5, 2006.

CARDOSO, L. P. V. ; QUEIROZ, B. B.; STEFANI, M. M. A. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. **J Clin Virol**, v. 46, n. 2, p. 134-9, 2009.

CARDOSO, L. P. V. HIV-1 Primary and Secondary Antiretroviral Drug Resistance and Genetic Diversity Among Pregnant Women From Central Brazil. **J Med Virol**, v. 82, n. 3, p. 351-7, 2010.

CARR, J. K. et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. **AIDS**, v. 15, n. 15, F. 41-47, out. 2001.

CASSEB J. et al. Decreasing Mortality and Morbidity in Adult AIDS Patients from 1995 to 1997 in São Paulo, Brazil. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 13, n. 4, p. 213-4. DOI:10.1089/apc.1999.13.213.

CAVALCANTI, A. M. S. et al. 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**, Rio de Janeiro, v. 102, n. 7, Nov. 2007. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762007000700002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762007000700002&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 14 Feb. 2011. Epub Oct 30, 2007. doi: 10.1590/S0074-02762007005000109.

CERQUEIRA, D. M. et al. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 877-82, Dez. 2004.

CHAIX, M. L. et al. Ac11 Resistance Group Cohort, Primo and Primoferon Study Groups Prevalence of genotypic drug resistance among French patients infected during the year 1999. **Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections Chicago**, p. 2-4, 2001

CHEN, Z. et al. Crystal structure at 1.9-Å resolution of human immunodeficiency virus (HIV) II protease complexed with L-735,524, an orally bioavailable inhibitor of the HIV proteases. **J Biol Chem**, v. 269, p. 26344-8, 1994.

CLAPHAM, P. R.; WEISS, R. A. Immunodeficiency viruses: Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**, n. 388, p. 230-1, 1997.

CLAVEL, F. et al. Isolation of a New Human Retrovirus From West Africa Patients With AIDS. **Science**, v. 233, n. 4761, p.343-6, 1986. DOI: 10.1126/science.2425430.

CLAVEL, F.; HANCE, A. J. HIV drug resistance. **N Engl J Med**, v. 350, p.1023-35, 2004.

CLOTET, B. et al. Efficacy and safety of darunavir-ritonavir at week 48 in treatment-experienced patients with HIV-1 infection in POWER 1 and POWER 2: a pooled subgroup analysis from two randomised trials. **Lancet**, v. 369, n. 9568, p. 1169-78, 2007.

CONDRA, J. H. et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. **Nature**, v. 374, n. 6522, p. 569-71, 1995.

COUTO-FERNANDEZ J. C. et al. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 2, p. 207-11, Fev. 2006.

COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 22, n. 3, p. 288-93, 1999.

COZZI-LEPRI, A. et al. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. **Antivir Ther**, v. 10, n.7, p. 791-802, 2005.

CRESPO-FIERRO, M. Compliance/adherence and care management in HIV disease. **J Assoc Nurses AIDS Care**, v. 8, n. 4, p. 43-54,1997.

DEEKS, S.G. et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. **N Engl J Med**, v. 344, n. 7, p. 472-80, 2001.

DELWART, E. L. et al. Genetic relationships determined by a DNA Heteroduplex Mobility Assay: analysis of HIV-1 *env* genes. **Science**, v. 262, n. 5137, p. 1257-61,1993.

DENG, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, v. 381, n. 6584, p. 661-6,1996.

DIOP-NDIAYE, H. et al. Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naive patients from Senegal. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 10, p. 1133-8, 2010.

DJOKO, C. F. et al. High HIV Type 1 Group M pol Diversity and Low Rate of Antiretroviral Resistance Mutations Among the Uniformed Services in Kinshasa, DRC. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 00, Out. 2010. DOI: 10.1089/aid.2010.0201

DOMINGO, E.; MENÉNDEZ-ARIAS, L.; HOLLAND, J. J. RNA Virus Fitness. **Rev Med Virol**, v. 7, n. 2, p. 87-96, 1997.

DOOLITTLE, R. F. et al. Retrovirus Phylogeny and Evolution. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 157, p. 1-18,1990.

DORSEY, B. D.; VACCA, J. P. **Protease Inhibitors in AIDS Therapy**. Ogden, R. C.; Flexner, C. W., eds.; Marcel Dekker, cap. 4. Inc.:New York, 2001.

DUWE, S. et al. Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients from the German seroconverter study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 26, p. 266–273, 2001. DOI: 10.1097/00042560-200103010-00010.

ERICE, A. et al. Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. **N Engl J Med**, v. 328, n. 16, p. 1163-5, 1993.

ERICKSON, J. W.; GULNIK, S. V.; MARKOWITZ, M. Protease inhibitors: resistance, cross-resistance, fitness and the choice of initial and salvage therapies. **AIDS**, v. 13 s. A, p. S189-204, 1999.

ESPARZA, J.; BHAMARAPRAVATI, N. Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: Why, when, where and how? **The Lancet**, v. 355, n. 9220, p. 2061-6, 2000.

EYER-SILVA, W. A. et al. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Inner Rio De Janeiro State, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 2, 2007.

FERREIRA, F. G. et al. Prevalence of primary drug resistance-associated mutations among HIV type 1 vertically infected children in Belo Horizonte, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 2, p. 229-32, 2010.

FERREIRA, J. L. P. et al. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 8, p. 800-8, 2008.

FOGACCIA, R.; VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. 3 ed. rev. e atual. São Paulo. Atheneu, p.111-3 e 238-9, 2007.

FONTELLA, R.; SOARES, M. A.; SCHRAGO, C. G. On the origin of HIV-1 subtype C in South America. **AIDS**, v. 22, n. 15, p 2001-11, 2008.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. T. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p.1-25, 1998. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.1

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somat Cell Mol Genet**, v. 26, n. 1-6, p.13-33, 2001.

GADELHA, S. R. et al. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 461-4, 2003.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. 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**, v. 91, n. 3, p. 335-8, 1996.

GARCIA-LERMA, J. G. et al. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naive persons. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 24, p. 13907-12, 2001.

GARCIA-LERMA, J. G. et al. Transmitted human immunodeficiency virus type 1 carrying the D67N or K219Q/E mutation evolves rapidly to zidovudine resistance in vitro and shows a high replicative fitness in the presence of zidovudine. **J Virol**, v. 78, n. 14, p. 7545-52, 2004.

GERETTI, A. M. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug naive persons. **Curr. Opin. Infect. Dis**, v. 20, n. 1, p. 22-32, 2007.

GHOSN, J. et al. HIV-1 resistant strains acquired at the time of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. **AIDS**, v. 20, n.2, p. 159-70, 2006.

GOMEZ-CANO, M. et al. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral-naive and antiretroviral-experienced HIV-infected patients in Spain. **AIDS**, v. 12, p.1015-20, 1998. DOI: 10.1097/00002030-199809000-00007.

GOMEZ-CARRILLO, M. et al. Analysis of HIV Type 1 Diversity in Pregnant Women from Four Latin American and Caribbean Countries. **Aids Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 11, p. 1186-91, 2006.

GONSALEZ, C. R et al. Drug resistance among chronic HIV-1-infected patients naive for use of anti-retroviral therapy in Sao Paulo city. **Virus Res**, v. 129, n. 2, p. 87–90, Ago. 2007.

GRANT, R.M. et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. **JAMA**, vol. 288, n. 2, p.181-8, Jul. 2002.

GRANT, R.M. et al. Accuracy of the TRUGENE *HIV-1* Genotyping Kit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1586-1593, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.4.1586-1593.2003.

GUIDELINES FOR THE USE OF ANTIRETROVIRAL AGENTS IN HIV-1-INFECTED ADULTS AND ADOLESCENTS, 2011. Disponível no site: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/AdultandAdolescentGL.pdf>

GUIMARÃES, M. L. et al. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.18, n. 17, p. 1261-9, 2002.

GUIMARÃES, M. L. et al. Identification of two new CRF BF in Rio de Janeiro State, Brazil. **AIDS**, v. 22, n.3, p. 433-5, 2008. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3282f47ad0.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser**, v. 41, p. 95-8,1999.

HAMMER, S. M. et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. **N Engl J Med**, v. 337, n. 1, p.725-33, 1997.

HAMMER, S. M. et al. Treatment for Adult HIV Infection. Recommendations of the International AIDS Society–USA Panel. **JAMA**, v. 296, n.7, p.827-43, 2006.

HATANO, H. et al. Rate of Viral Evolution and Risk of Losing Future Drug Options in Heavily Pretreated, HIV-Infected Patients Who Continue to Receive a Stable, Partially Suppressive Treatment Regimen. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 10, p.1329-36, 2006.

HEMELAAR, J. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. W13–23, 2006.

HESLOP, O. D. High genetic diversity in human immunodeficiency virus-type 1 in Jamaica. **West Indian Med J**, v. 58, n3, p.195-200, 2009.

HEYNDRICKX, L. et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by *gag/env* Heteroduplex Mobility Assay. **J Virol**, v. 74, n. 1, p. 363-70, 2000.

HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society – USA Panel. **JAMA**, v. 279, n. 24, p.1984-91, 1998.

HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. **Clin Infect Dis**, v.47, n.2, p.266-85, 2008.

HSIOU, Y. et al. Structure of unliganded HIV-1 reverse transcriptase at 2.7 Å resolution: implications of conformational changes for polymerization and inhibition mechanisms. **Structure**, v. 4, n. 7, 853-60,1996.

HU, W. S.; TEMIN, H. M. Retroviral Recombination and Reverse Transcription. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1227-33, 1990.

IBGE. CENSO 2009. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2009/tabelas\\_pdf/sintese\\_ind\\_2\\_5.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2009/tabelas_pdf/sintese_ind_2_5.pdf). Acesso em: 17 de Janeiro de 2011.

INOCENCIO, L. A. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J Int AIDS Soc**, v. 12, n. 20, 2009. doi: 10.1186/1758-2652-12-20.

JOHNSON, J. A. et al. Emergence of drug resistant HIV-1 after intrapartum administration of single-dose nevirapine is substantially underestimated. **J Infect Dis**, v. 192, n. 1, p. 16-23, 2005.

JOHNSON, J. A. et al. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. **PLoS Med**, v. 5, n. 7, p. e158, 2008.

JOHNSON, V. A. et al. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2009. **Top HIV Med**, v.17, n. 5, p. 138-45, 2009.

KAHN, J. O.; WALKER, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. **N Engl J Med**, v. 339, p. 33-39,1998.

KANTOR, R. et al. Evolution of resistance to drugs in HIV-1-infected patients failing antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 18, n. 11, p. 1503-11, 2004.

KAPLAN, A. H.; MANCHESTER, M.; SWANSTROM, R. The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency. **J Virol**, v. 68, n. 10, p. 6782-6, out. 1994.

KIJAK , G.H. et al. Resistance profiles to antiretroviral drugs in HIV-1 drug-naive patients in Argentina. **Antiviral Ther**, v. 6, p. 71-7, 2001.

KIJAK , G.H. et al. Socio-demographic and drug use factors associated with HIV-1 recombinants and dual infections in Northern Thai drug users: Associations of risk with genetic complexity. **Drug Alcohol Depend.**, 2010. DOI:10.1016/j.drugalcdep.2010.11.013

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-20, 1980.

KLIMAS, N.; KONERU, A. O.; FLETCHER, M. A. Overview of HIV. **Psychosomatic Medicine**, v. 70, p. 523-30, 2008.

KOHLSTAEDT, L. A. et al. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1783-90, 1992.

KORBER, B. et al. Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG. **Human Retroviruses and AIDS**, p. III-102-111, 1998. Disponível no site: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/>

KOUSHIAPPA, I.; VAN DE VIJVER, D. A.; KOSTRIKIS, L.G. Near full-length genetic analysis of HIV sequences derived from Cyprus: evidence of a highly polyphyletic and evolving infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 25, n.8, p.727-40, 2009.

KURITZKES, D. R. et al. Preexisting resistance to non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naive HIV-1-infected subjects. **J Infect Dis**, v. 197, n. 6, p. 867-70, 2008.

LANIER, E. R. et al. Effect of baseline 215D/C/S 'revertant' mutations on virological response to lamivudine/zidovudine-containing regimens and emergence of 215Y upon virological failure. **[Abstract 146.] Antivir Ther**, v. 7, s.120, 2002.

LARDER, B. A.; STAMMERS, D. K. Closing in on HIV drug resistance. **Nat Struct Biol**, v. 6, p.103-6,1999.

LEARN, G. H. et al. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. **J Virol**, v. 70, n. 8, p. 5720-30,1996.

LECOSSIER, D. et al. Detection of Minority Populations of HIV-1 Expressing the K103N Resistance Mutation in Patients Failing Nevirapine. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.38, n. 1, p. 37-42, 2005.

LITTLE, S. J. et al. Antiretroviral drug susceptibility and response to initial therapy among recently HIV-infected subjects in North America. **Antiviral Ther**, 2001;**6**:21.

LITTLE, S. J. Is transmitted drug resistance in HIV on the rise? **BMJ**, v. 322, p. 1074-5, 2001.

LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY. **HIV Sequence Database**. Disponível em <http://www.hiv.lanl.gov>

MACHADO, L. F. et al. 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**, v. 25, n. 10, p. 961-6, Out. 2009.

MARGOLICK, J. B. et al. Decline in Total T Cell Count Is Associated with Onset of AIDS, Independent of CD4<sup>+</sup>Lymphocyte Count: Implications for AIDS Pathogenesis. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 3, p. 256-263,1998.

MARTINEZ, A. M. B. et al. Determinants of HIV-1 Mother-to-Child Transmission in Southern Brazil. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 78, n. 1, p.113-21, 2006.

MCCUTCHAN, F. E. et al. Subtype G and multiple forms of A/G intersubtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria. **Virology**, v. 254, n. 2, p. 226-34, Fev. 1999.

MCCUTCHAN, F. E. Global epidemiology of HIV. **J Med Virol**, v. 78, s. 1, p. S7-S12, 2006.

MEDEIROS, L. B. et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** , v. 101, n. 8, p. 845-9, 2006.

MENDOZA, C. et al. Evidence for a different transmission efficiency of viruses with distinct drug-resistant genotypes Antiviral Therapy. **Clin Infect Diseases**, v.8, S144, 2003.

MENÉNDEZ-ARIAS , L. Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 8, p. 381-8, 2002.

MEYER, P. R. et al. Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n.12, p.3465-72, 2000.

MEYER, P. R. et al. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. **PNAS**, v. 95, n. 23, p. 13471-6,1998.

MILLER, V. Structured treatment interruptions in antiretroviral management of HIV-1. **Curr. Opin. Infect. Dis**, v. 14, n. 1, p. 29-37, 2001

MONTAGNIER, L. **AIDS: Seus Mecanismos e Tratamentos**. Rio de Janeiro, Jorge Zahar Editora, 1995.

MONTAVON, C. et al. CRF06-cpx: a new circulating recombinant form of HIV-1 in West Africa involving subtypes A, G, K, and J. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 5, p.522-30, 2002.

MONTEIRO, J. P. et al. Genetic and biologic characterization of HIV type 1 subtype C isolates from south Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 1, p.135-43, 2007.

MORGADO, M. G. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV- 1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 18, n. 5, p. 488-94,1998.

MORGADO, M. G. et al. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.91, n.3, p. 339-42, Jun.1996.

MORGADO, M. G. et al. V3 region polymorphism in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569-75, 1994.

MOSHA, F. et al. Prevalence of Genotypic Resistance to Antiretroviral Drugs in Treatment-Naive Youths Infected with Diverse HIV Type 1 Subtypes and Recombinant Forms in Dar es Salaam, Tanzania. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 00, Out. 2010. DOI:10.1089/aid.2010.0113.

MOTOMURA, K. et al. Emergence of new forms of human immunodeficiency virus type 1 intersubtype recombinants in central Myanmar. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, n. 17, p. 1831-43, 2000.

MYATT, M.; BENNETT, D. E. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. **Antiviral Therapy**, v. 13, s. 2, p.37-48, 2008.

NADAI, Y. et al. HIV-1 Epidemic in the Caribbean Is Dominated by Subtype B. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. e4814, 2009. DOI:10.1371/journal.pone.0004814.

NAEGER, L. K.; MARGOT, N. A.; MILLER, M. D. Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. **Antivir Ther**, v. 6, n. 2, p. 115-26, 2001.

NAIR, V.; CHI, G. HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS. **Rev Med Virol**, v. 17, n. 4, p. 277-95, 2007.

NÁJERA, R. et al. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. **AIDS**, v.16, s. 4, p. S3-S16, 2002.

NAPRAVNIK, S. et al. HIV-1 Drug Resistance Evolution Among Patients on Potent Combination Antiretroviral Therapy With Detectable Viremia. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 40, n. 1, p. 34-40, 2005.

OSMANOV, S. et al. Estimated Global Distribution and Regional Spread of HIV-1 Genetic Subtypes in the Year 2000. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 2, p. 184-90, 2002.

OYARO, M. Molecular Characterization of HIV Type 1 among HIV-Infected Respondents in a Cohort Being Prepared for HIV Phase III Vaccine Clinical Trials, Western Kenya. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 00, Out. 2010. DOI: 10.1089/aid.2010.0061.

PEÇANHA, E. P.; ANTUNES, O. A. C. Estratégias Farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, v.25, n. 6b, p. 1108-16, Nov/Dez. 2002.

PEDROSO, C. et al. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, n 2, p. 251-3, 2007.

PIANIAZEK, D. et al. Identification of Mixed HIV-1/HIV-2 Infections in Brazil by Polymerase Chain Reaction. **AIDS**, v. 5, n. 11, p. 1293-9,1991.

PIERSON, T. et al. Characterization of Chemokine Receptor Utilization of Viruses in the Latent Reservoir for Human Immunodeficiency Virus Type 1. **J Virol**, v. 74, n. 17, p. 7824–33, 2000.

PINTO, M. E. A molecular study on the evolution of a subtype B variant frequently found in Brazil. **Genet Mol Res**, v. 7, n. 4, p. 1031-44, 2008.

PIYASIRISILP, S. et al. A recent outbreak of human immunodeficiency virus type 1 infection in southern China was initiated by two highly homogeneous, geographically separated strains, circulating recombinant form AE and a novel BC recombinant. **J Virol**, v. 74, n. 23, p. 11286-95, 2000.

PLANTIER, J. C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med**, v.15, n. 8, p. 871–2, 2009.

POPE, M.; HAASE, A. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. **Nature Medicine**, v. 9, p. 847 – 852, 2003. DOI:10.1038/nm0703-847

PUGACH, P. et al. Neutralizing antibody and anti-retroviral drug sensitivities of HIV-1 isolates resistant to small molecule CCR5 inhibitors. **Virology**, v. 377, n. 2, p. 401-7, 2008.

PUIG, T. et al. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain. **AIDS**, v. 14, p. 727-32, 2000. DOI: 10.1097/00002030-200004140-00012.

RABONI, S. M. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p.1044-9, 2010.

RHEE, S. Y. et al. HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. **AIDS**, v. 20, n. 5, p. 643-51, 2006.

RICHMAN, D. D. et al. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. **PNAS**, v.100, n. 7, p. 4144-9, 2003.

RICHMAN, D. D. Principles of HIV resistance testing and overview of assay performance characteristics. **Antivir Ther**, v. 5, n. 1, p. 27-31, 2000.

ROBERTSON, D.L. et al. **HIV-1 nomenclature proposal**: A reference guide to HIV-1 classification. Disponível no site: <http://hivweb.lanl.gov/immunology/articles/nomencla>

RODRIGUES, R. et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. **Virus Res**, v. 116, n. 1-2, p. 201-7, 2006.

SABINO, Ester C. et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. **J Virol**, v. 68, n. 10, p. 6340-6, 1994.

SÁ-FILHO, D. J. et al. Analysis of Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome Reveals a Variable Spectrum of Subtypes B and F Recombinants in São Paulo, Brazil. **Aids Research and Human Retrovirus**, v. 21, n. 2, p. 145-51, 2005.

SÁ-FILHO, D. J. et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 1, p. 1-13, Jan. 2006.

SAKAI, H. et al. Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. **J Virol**, v. 67, n. 3, p. 1169-74, 1993.

SALEMI, M. et al. Different Epidemic Potentials of the HIV-1 B and C Subtypes. **J Mol Evol**, v. 60, n. 5, p. 598–605, 2005. DOI: 10.1007/s00239-004-0206-5

SANABANI, S. S. et al. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 368-77, 2006.

SANABANI, S. S. et al. Near full-length genome analysis of low prevalent human immunodeficiency virus type 1 subclade F1 in São Paulo, Brazil. **Virol J**, v. 6, n. 78, 2009. DOI:10.1186/1743-422X-6-78.

SANABANI, S.S. et al. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. **Virol J**, v. 7, n. 74, 2010. DOI: 10.1186/1743-422X-7-74.

SANTOS, A. F. et al. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31\_BC-related strains in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, n.3, p. 328-33, 2007.

SANTOS, E. S. et al . Diversidade genética do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em mulheres infectadas de uma cidade do nordeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n. 12, p. 609-14, 2009.

SCHAPIRO, J. M. et al. Clinical cross-resistance between the HIV-1 protease inhibitors saquinavir and indinavir and correlations with genotypic mutations. **AIDS**, v.13, n. 3, p.359-65, 1999.

SCHERRER, A. U. et al. Prevalence of etravirine mutations and impact on response to treatment in routine clinical care: Swiss HIV Cohort Study (SHCS). **HIV Med**, v. 10, n. 10, p. 647-56, 2009.

SCHÜPBACH, J. Manual of Clinical Microbiology. **Human Immunodeficiency Viruses**. Ed. Asm Press, 8 ed., p. 1253-1281, 2003.

SHAFER, R. W. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v.15, n. 2, p. 247- 77, 2002.

SHAFER, R. W. O desafio da resistência à medicação antirretroviral em crianças infectadas pelo HIV-1. **J. Pediatr**, v. 85, n. 2, p. 91-4, 2009.

SHAFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M. HIV-1 drug resistance mutations: An updated framework for the second decade of HAART. **AIDS Rev**, v. 10, n. 2, p. 67-84, 2008.

SHEN, L. et al. Steered Molecular Dynamics Simulation on the Binding of NNRTI to HIV-1 RT. **Biophys J**, v. 84, n. 6, p. 3547-63, 2003.

SHET, A. et al. Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 41, n. 4, p. 439-46, 2006.

SILVA, M. M. G. et al . HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 495-501, 2010.

SIMON, D. et al. Prevalência de subtipos do HIV-1 em amostra de pacientes de um centro urbano no sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 2010, v. 44, n. 6, p. 1094-1101, 2010. DOI: 10.1590/S0034-89102010005000039.

SIMON, F. et al. Identification of a New Human Immunodeficiency Virus Type 1 Distinct From Group M and Group O. **Nat Med**, v. 4, n. 9, p. 1032-7, 1998.

SIMON, V.; HO, D. D; QUARRAISHA, A. K. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. **Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 489–504, 2006. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69157-5.

SOARES, E. A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 520-6, 2003.

SOARES, M. A. et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. **AIDS**, v. 17, n.1, p.11-21, 2003.

SOUZA, M. V. N.; ALMEIDA, M. V. Drogas Anti-VHI: Passado, Presente e perspectivas futuras. **Quim. Nova**, Rio de Janeiro, v.26, n.3, p.366-372, 2003.

SPIRA, S. et al. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 2, p. 229-40, 2003.

SPRINZ, E. et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 9, p. 861-7, 2009.

STARCICH, B. R. et al. Identification and Characterization of Conserved and Variable Regions in the Envelope Gene of HTLV-III/LAV, the Retrovirus of AIDS. **Cell**, v. 45, n.5, p. 637-48, 1986.

STEFANI, M. M. A. et al. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, n. 2, p. 205-7, 2000.

STEFANI, M. M. A. et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. **J Clin Virol**, v. 39, n. 3, p. 205-9, jul. 2007.

SUCUPIRA, M. C. A. et al. Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in São Paulo, Brazil. **Antivir Ther**, v. 6, n. 4, p. 263-4, 2001.

SUCUPIRA, M. C. A. et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. **AIDS Patient Care STDS**, v. 21, n. 2, p. 116-28, 2007.

TAKEBE, Y.; KUSAGAWA, S.; MOTOMURA, K. Molecular epidemiology of HIV: Tracking AIDS pandemic. **Pediatr Int**, v. 46, n. 2, p. 236-44, 2004.

TAMALET, C. et al. Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV-1 infection. **J Med Virol**, v. 61, p. 181–186, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9071(200006)61:2<181::AID-JMV2>3.0.CO;2-T.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n.8, 1596–9, 2007.

TANURI, A. et al. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtypes B and F isolates in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p.253-8, 1999.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-80, 1994.

THOMSON, M. M. et al. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1- infected individuals in Buenos Aires, Argentina. **AIDS**, v. 14, n. 7, p. 897-9, 2000.

THOMSON, M. M; PÉREZ-ÁLVAREZ, L.; NÁJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 8, 2002. DOI:10.1016/S1473-3099(02)00343-2.

TOLEDO, P. V. M. et al . Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 230-6, 2010.

TURAL, C. et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. **Aids**. v. 16, n. 2, p. 209-18, 2002.

TURNER, B. G.; SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v.285, n. 1, p. 1-32,1999.

UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance. Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. **Br Med J**, v. 322, p.1087-8, 200. DOI: 10.1136/bmj.322.7294.1087.

UNAIDS. **AIDS epidemic update** : December 2007. Geneva, 2007. Disponível em [http://data.unaids.org/pub/epislides/2007/2007\\_epiupdate\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/epislides/2007/2007_epiupdate_en.pdf).

UNAIDS. **AIDS epidemic update** : November 2009. Geneva, 2009. Disponível em [http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700\\_Epi\\_Update\\_2009\\_en.pdf](http://data.unaids.org/pub/Report/2009/JC1700_Epi_Update_2009_en.pdf)

UNAIDS. **Global Report - Unaid Report on the Global AIDS Epidemic**, 2010. Disponível em: [http://www.unaids.org/documents/20101123\\_GlobalReport\\_em.pdf](http://www.unaids.org/documents/20101123_GlobalReport_em.pdf).

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F . The Biochemistry of Aids. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 577-630, 1991. DOI: 10.1146/annurev.bi.60.070191.003045

VAISHNAV, Y. N.; WONG-STAAAL, F. 3'-Azidothymidine (Zidovudine) Inhibits Glycosylation and Dramatically Alters Glycosphingolipid Synthesis in Whole Cells at Clinically Relevant Concentrations. **JBC On line**, v. 270, n. 39, p. 22836-41, 1991.

VANDAMME, A. M. et al. Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. **Antivir Ther**, v. 9, n. 6, p. 829-48, 2004.

VÉRAS, N. M. C. et al. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1481-90, 2007.

VERGNE, L. et al. Genetic Diversity of Protease and Reverse Transcriptase Sequences in Non-Subtype-B Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains: Evidence of Many Minor Drug Resistance Mutations in Treatment-Naive Patients. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 3919-25, 2000.

VICENTE, A. C. et al. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 23, n. 4, p. 327-31, 2000.

VIEIRA, N. F. R. et al. **In: Anais Fórum 2000**. (1): 602, Rio de Janeiro, 2000.

VINGERHOETS, J. et al. An update of the list of NNRTI mutations associated with decreased virological response to etravirine: multivariate analyses on the pooled DUET-1 and DUET-2 clinical trial data. **[Abstract 24.] Antivir Ther**, v. 13, s. 3, p. A26, 2008.

WALKER, A.S.; GIBB, D. M. Monitoring of highly active antiretroviral therapy in HIV infection. **Curr. Opin. Infect. Dis**, v. 24, n. 1, p. 27–33, 2011. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3283423e0e.

WHITCOMB, J. M. et al. Broad nucleoside reversetranscriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. **J Infect Dis**, v. 188, n. 7, p.992-1000, 2003.

WHO. **Guidelines for Surveillance of HIV Drug Resistance**, 2003. Disponível em: [http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/cd/who-afro/resisguide12\\_12.pdf](http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/cd/who-afro/resisguide12_12.pdf)

WHO. Disponível em <http://www.who.int/hiv/topics/treatment/en/index.html>. Acesso em: 24 set. 2010.

WILSON, J. W.; BEAN, P. A Physician's Primer to Antiretroviral Drug Resistance Testing. **The AIDS Reader**, v. 10, n. 8, p. 469-78, 2000.

WYATT, R. et al. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 705-11,1998.

ZHANG, M. et al. jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1. **Nucleic Acids Res**, v. 34, s. 2, p. W463-465, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkl255.

## ANEXOS

---

### ANEXO 1 - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás

---

TÍTULO: "Estudo de resistência genética a antiretrovirais e mapeamento genético molecular do HIV-1 no centro oeste e norte do Brasil."


Área Temática: Grupo III

Local de Realização: Inst. Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal, após a análise das respostas adequadas às solicitações deste CEPMHA/HC/UFG, aprovou sem restrições o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

→ Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

  
Prof. Joffre Rezende Filho  
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

---

1ª AVENIDA, S/Nº, SETOR LESTE UNIVERSITÁRIO - CEP: 74.605-050 - FONE: 269 83 38 - FAX: 269 84 26  
GOIÂNIA - GOIÁS

ANEXO 2 - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital  
Universitário Júlio Muller - Universidade Federal de Mato Grosso.

Ministério da Educação  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER

**Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Müller**  
Registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em 25/08/97

TERMO DE APROVAÇÃO ÉTICA  
DE PROJETO DE PESQUISA

REFERÊNCIA: Projeto de protocolo Nº 435/CEP-HUJM/07

"COM PENDÊNCIAS"

APROVADO "ad referendum"

APROVAÇÃO FINAL

NÃO APROVADO

O projeto de pesquisa intitulado: "Estudo de resistência genética a antiretrovirais e mapeamento genético molecular do HIV-1 no Centro Oeste e Norte do Brasil," encaminhado pelo (a) pesquisador (a), **Aparecida Duarte Hg Mussi** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM, em reunião realizada dia 12/12/07 que concluiu pela aprovação final, tendo em vista que atende a Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos.

Cuiabá, 12 de Dezembro de 2007.

*Maria Aparecida Munhoz Gaiva*  
Profa. Dra. Maria Aparecida Munhoz Gaiva  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HUJM

Hospital Universitário Júlio Müller  
Rua L, SN, Jardim Alvorada, CEP 78048-790 Cuiabá -MT, Brasil  
Fone: 65-3615-7254 e-mail: cep@ujm.ufmt.br  
[http://www.ufmt.br/cep\\_hujm](http://www.ufmt.br/cep_hujm)

## ANEXO 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA**  
**RUA 235 s/n Setor Universitário CEP 74605050 Goiânia - Goiás**  
**Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase – Laboratórios n 326, 327 e 335.**  
**Telefones: (62) 3209-6111 / 3521-1839 ou**  
**Rua Thogo da Silva Pereiran° 63 Centro**  
**CEP 78020-500 Cuiabá -MT**  
**Laboratório Central**  
**Telefone: (65) 3624-6095**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado para participar como voluntário em um estudo sobre infecção pelo vírus HIV/AIDS. Você estará sendo informado sobre todo o estudo. Caso não queira participar, você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo no seu tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento.

### **INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA**

Título do Projeto: **AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA A ANTIRETROVIRAIS E MAPEAMENTO GENÉTICO MOLECULAR DO HIV-1 NO ESTADO DO MATO GROSSO.** Responsável: Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás; Aparecida Mussi e Adriana Santarém Ferreira / Laboratório Central Cuiabá -MT

### **DESCRIÇÃO DA PESQUISA**

O vírus que causa a aids é chamado de HIV-1. Vários estudos realizados em diferentes países e no Brasil indicam que este vírus é muito variável e apresenta várias formas diferentes. Além disto o HIV pode mudar e ficar resistente a drogas que são normalmente utilizadas no tratamento da infecção pelo HIV. O objetivo deste estudo é identificar o tipo de HIV-1 responsável pela sua infecção e analisar se este vírus apresenta modificações que fazem com que o vírus não seja destruído pelas drogas utilizadas.

### **PROCEDIMENTO DA PESQUISA**

Se você concordar em participar desse estudo, nós iremos fazer perguntas sobre fatores que podem levar a maior risco para a infecção pelo HIV e coletar uma única amostra de sangue, o que não lhe causará nenhum mal. Tudo o que soubermos sobre você através do estudo (resultados, exames e entrevistas) será confidencial. A sua identidade jamais será mostrada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado. Tudo que soubermos sobre o tipo de HIV-1 que causou a sua infecção e se este vírus sofreu modificação e pode não responder ao tratamento será enviado ao laboratório onde você faz seus exames de carga viral e contagem de CD4 ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento. Se você tem alguma dúvida relacionada ao estudo neste momento ou durante o estudo, você poderá ligar para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase, Profa. Dra. Mariane Martins de Araújo Stefani, telefone 0XX62 3209 6111 ou Laboratório Central – MT, Adriana Santarém Ferreira, telefone 0XX65 3624-6095 que estaremos disponíveis para esclarecer as suas dúvidas.

## PARTICIPAÇÃO

A sua participação é voluntária, você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem nenhum prejuízo na realização dos exames de rotina de acompanhamento ou no tratamento da infecção pelo HIV.

A sua participação voluntária não irá além da coleta de sangue e entrevista, não havendo, portanto, nenhum tipo de risco à sua saúde e danos físicos, não cabendo, pois, qualquer tipo de indenização por danos, pois estes não existem.

**CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:** Pacientes HIV positivos / aids, virgens de tratamento, que fazem acompanhamento clínico e laboratorial no Serviço de Assistência Especializada de Cuiabá.

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:** Pacientes HIV que tenham o resultado de Carga Viral abaixo de 200 células /  $\mu\text{L}$ , pois nestes casos as chances de achar o vírus nas amostras de sangue são pequenas.

## CONFIDENCIABILIDADE

Todos os dados da pesquisa serão confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos. Nenhum nome ou resultado individual será divulgado, permanecendo em segredo. O paciente terá acesso aos resultados a qualquer tempo.

## CONSENTIMENTO

Eu, \_\_\_\_\_  
RG/CPF \_\_\_\_\_ concordo em participar deste estudo. Certifico que fui informado sobre o estudo, estou informado que a minha participação é voluntária, que responderei a um questionário e que será coletada uma única amostra de sangue. Sei que posso desistir de participar deste estudo em qualquer momento sem ter nenhum tipo de prejuízo no meu tratamento / assistência ou acompanhamento. Concordo, inclusive, com a possível publicação dos resultados dessa pesquisa em forma de resumos e / ou artigos científicos em revistas, pois sei que os pacientes serão identificados por códigos (números). Informo que aceito participar ou que o menor de 18 anos sob a minha responsabilidade participe desse estudo.

\_\_\_\_\_  
Local

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente ou Responsável pelo menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Entrevistador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

ANEXO 4 - Questionário Sobre Fatores de Risco para Infecção pelo HIV-1.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
**Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase n° 326/327/335**  
R. 235, esquina com a 1ª Avenida, s/n. Setor Universitário. Goiânia/ Goiás. 74605-050  
Fone: (62) 3209-6111 Fax: (62) 3521-1839



QUESTIONÁRIO SOBRE FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HIV

Unidade:..... Data:...../...../.....

Nome do Médico:.....

Nome do paciente: .....RG .....

Data de nascimento: ...../...../..... Idade: .....anos Sexo: ( ) F ( ) M

End: .....

Bairro: ..... Cidade: .....UF: .....

Telefone: .....Outro contato: .....

Escolaridade: ..... Profissão: .....

Local de residência nos últimos dez anos .....

.....

Tipo de exposição: ( ) parceiro heterossexual HIV+ ( ) parceiro homossexual HIV+  
( ) usuário de drogas injetáveis ( ) transfusão sanguínea  
( ) transmissão vertical (mãe/filho) ( ) outros.....

Ano e local de diagnóstico da infecção pelo HIV :.....

FAZ TRATAMENTO PARA AIDS? ( ) Não ( ) Sim

Observações:.....

.....

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA  
**Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase n° 326/327/335**

R. 235, esquina com a 1ª Avenida, s/n. Setor Universitário. Goiânia/ Goiás. 74605-050

Fone: (62) 3209-6111

Fax: (62) 3521-1839



SÓ PARA MULHERES:

Tem filhos? ( ) Não ( ) Sim Quantos? ..... Qual tipo de parto? .....

Teve aborto? ( ) Não ( ) Sim Quantos? ..... ( ) antes ou ( ) após 3 meses de gestação

Tem algum filho com HIV/aids? ( ) Não ( ) Sim Quantos? ..... Qual idade? .....

Aleitamento materno: ( ) Não ( ) Sim Tempo: .....

Observações:

.....

.....

SÓ PARA CRIANÇAS:

Tipo de exposição: ( ) transmissão vertical (mãe/filho) ( ) pai com aids

( ) hemofilia ( ) transfusão sanguínea

( ) outros.....

Observações: .....

ACOMPANHAMENTO DA CARGA VIRAL E CD4/CD8:

Último resultado da carga viral: ..... Data:...../...../.....

Último resultado da contagem de CD4: ..... Data:...../...../.....

Último resultado da contagem de CD8: ..... Data:...../...../.....

Observações: .....

\_\_\_\_\_ Data:...../...../.....

Assinatura do responsável pelo questionário

## LOW PREVALENCE OF PRIMARY ANTIRETROVIRAL RESISTANCE AND HIGH HIV-1 GENETIC DIVERSITY IN PATIENTS FROM MATO GROSSO STATE, CENTRAL WEST BRAZIL

Adriana Santarém Ferreira<sup>1</sup>, Ludimila Paula Vaz Cardoso<sup>2</sup>, Mariane Martins de Araújo Stefani<sup>2</sup>

### ABSTRACT

Brazil is an enormous country and few reports have described the molecular characteristics of AIDS epidemic in the interior of the country. To help fulfill this gap, the prevalence of primary resistance to antiretroviral drugs and HIV-1 diversity in central west Brazil are reported. Drug naïve patients (n=105) were recruited in a reference center in Cuiabá/Mato Grosso State, across the border of Bolivia and considered the southern gate of the Amazon forest. HIV-1 isolates (n=92) had the protease (PR) and partial reverse transcriptase (RT) genes amplified by nested-PCR and sequenced. Drug resistance mutations were analyzed by the Calibrated Population Resistance tool and International AIDS Society-USA database. HIV-1 subtypes were determined by REGA and phylogenetic analyses. Recombinant viruses were analyzed by SIMPLOT software. Drug resistance mutations were observed in 5.43% (5/92). M41L (n=1), D67N (n=1) and T219 (n=1) mutations associated with nucleoside-RT inhibitors, K103N (n=1) nonnucleoside-RT inhibitor mutation and L90M (n=1) PR inhibitor mutation were observed. Around 20% of the isolates were recombinant viruses: F1B<sup>PR</sup>BF1B<sup>RT</sup> (n=4), F1B<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> (n=2), B<sup>PR</sup>BF1B<sup>RT</sup> (n=2), B<sup>PR</sup>CBC<sup>RT</sup> (n=1), B<sup>PR</sup>BCB<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> (n=1), F1B<sup>PR</sup>BF1<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>F1B<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>C<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>F1CB<sup>RT</sup> (n=1), C<sup>PR</sup>CB<sup>RT</sup> (n=2), D<sup>PR</sup>DF1<sup>RT</sup> (n=1). Subtype B<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> represented 71.7% (66/92), 5.4% (5/92) were subtype C<sup>PR</sup>C<sup>RT</sup> and 3.3% were subtype F1<sup>PR</sup>F1<sup>RT</sup>. A complex AIDS epidemic pattern is reported in Mato Grosso/central west Brazil, far away from the epicenter. Despite the low prevalence of primary resistance, very high HIV-1 diversity characterized by the co-circulation of subtypes B, F1, C and diverse recombinant forms were observed. These results highlight the importance of monitoring primary drug resistance and HIV-1 genetic diversity in interior Brazil.

**Key Words:** HIV-1 primary drug resistance; subtypes; Brazil.

### INTRODUCTION

Currently in Brazil over 200,000 individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) benefit from highly active antiretroviral therapy (HAART) provided free of charge by the Ministry of Health. HAART usually comprises 2 or 3 classes of drugs: nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI/NNRTI) and protease inhibitors (PI) [Nunn et al., 2007]. Although HAART has brought a new perspective in controlling infection with increased survival and reduction of opportunistic infections, the emergence of mutations that cause resistance to antiretroviral drugs (ARV) may undermine this achievement [Galvão, 2002]. Successful treatment is characterized by reductions in viral loads to undetectable levels (below 50 copies/ml), which diminishes the chances of virus transmission. However in infected individuals it is still difficult to obtain and maintain complete viral suppression for long periods due to multiple factors including poor adherence, drug intolerance/interactions or drug administration in inadequate levels [Bangsberg et al., 2001]. Primary drug resistance observed in patients before treatment is mainly due to the transmission of resistant virus. Poor adherence to HAART is considered the main cause of secondary drug resistance during ARV therapy. Recent multicentric and regional studies in Brazil have shown low to moderate levels of primary drug resistance but there is still scarce information about primary resistance in small interior cities [Cardoso et al., 2009; Inocencio et al., 2009; Sprinz et al., 2009].

Brazil is a country of continental dimensions where HIV-1 subtypes B, F1 and C have been described mainly in big metropolitan areas. The identification and surveillance of subtypes in different geographical areas help compose the molecular epidemiology map of HIV-1 in Brazil.

This study describes HIV-1 drug resistance mutations and subtypes circulating among ARV naïve patients recruited in Cuiabá city, Mato Grosso State (MT) in central west Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Area and Subjects

Inclusion criteria for this study were patients with recent or chronic diagnosis of HIV-1 infection, from both sexes, of any age range, never treated with any ARV drug. One hundred and five patients who attended the Public Health Central Laboratory in Cuiabá/MT (LACEN-MT) to perform CD4<sup>+</sup> T cell counts and plasma viral load (PVL) tests were recruited from October 2008 to September 2009. This sample size represents 28.45% of the 369 patients ARV naive patients that attended this reference center in that period. Until December 2009, 7449 AIDS cases were notified in Mato Grosso State. The recruitment setting Cuiabá city (around 550,000 inhabitants) is in the transition zone among three of the most characteristic Brazilian ecosystems: Amazon forest, savanna and “Pantanal” which is composed of extensive savanna formations crossed by gallery forests and stream valleys. Mato Grosso State borders Bolivia and represents the southern gate to the Amazon forest. Its population is divided in several small soybeans/rice agriculture centered cities. Around one third of the patients recruited lived in Cuiabá city, 12 were from Várzea Grande city and rest came from 24 small interior villages located throughout the State. This study was approved by the regional Institutional Review Board (Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal da Universidade Federal de Goiás, protocol # 073/05 and Comitê de Ética de Pesquisa do Hospital Universitário Júlio Muller da Universidade Federal do Mato Grosso, protocol # 435/07) and patients were enrolled after giving informed consent. For participants younger than 18 years, consent was signed by one of the parents or the legal guardian.

### Genetic Analysis

RNA was extracted from plasma (QIAamp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) (Invitrogen) and used as the target for a nested polymerase chain reaction (nested-PCR). The entire PR gene (corresponding to positions 2253-2549 relative to HXB2 genome, GenBank accession n<sup>o</sup> K03455) and a 750 bp fragment of the RT gene (corresponding to positions 2550-3299 relative to HXB2 genome) were amplified. After amplicon purification (QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen GmbH, Hilden, Germany), genomic sequencing was performed (DYEnamic ET Dye Terminator kit, GE Healthcare, Salt Lake, USA; ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster, USA). All generated sequences were subjected to quality control analysis by the HIV-1 Quality Analysis Pipeline Tool (<http://www.sanbi.ac.za>) and screened by visual inspection of the alignment by Bioedit software to exclude sample mix-ups and contamination [Hall, 1999].

### Phylogenetic Analysis

Isolates were subtyped by the REGA automated genotyping tool version 2.0 and by phylogenetic inference [Oliveira et al., 2005]. All sequences were aligned using Clustal X software. Trees were generated by the Neighbour-Joining (NJ) method under Kimura's two-parameter correction using MEGA4 software [Kimura, 1980, Tamura et al., 2007] *Bootstrap* values (1000 replicates) above 70% were considered significant. Isolates with discordant PR/RT subtypes were analysed by SIMPLOT 3.5.1 [Lole et al., 1999]. The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic and SIMPLOT analysis are subtype A, AB253429; subtype B, U21135, FJ638434, AY173956, K03455, EF379194, EF379210, FJ548804 and U63632; subtype C, AF067155, AF110967, U46016, FJ548791, FJ594149, AF286228 and U52953; subtype D, K03454 and M27323; subtype F, DQ358801, AF077336 and AF005494 and the simian immunodeficiency virus sequences from chimpanzee (SIVcpz), X52154.

## Resistance Analysis

Primary drug resistance was analysed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool employing the Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) and the International AIDS Society-USA (IAS-USA) major mutation list [Gifford et al., 2009; Johnson et al., 2009]. An ARV mutation susceptibility profile was analysed by the Stanford HIV Drug Resistance Database (hivdb.stanford.edu). Possible low-level resistance was not included due to its unknown clinical relevance (Accessed: December 2010).

## Statistical Analysis

Frequencies, medians of main variables and 95% confidence interval (CI) were obtained using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, 13.0) for Windows (Chicago, IL, USA).

## RESULTS

### Patient's Characteristics

Ninety-two out of 105 drug-naïve patients recruited had HIV-1 *pol* genes sequenced. Most patients were males (58.7%, 54/92), 3/38 HIV-1 infected women were pregnant. Median age of participants was 36 years (12-65 years range) and 45.7% (42/92) were diagnosed in 2008-2009. Around 50% of the patients had less than 8 years of education. The major risk factor identified was heterosexual unprotected sex (87%) followed by 7.5% men who have sex with men (MSM). One vertical transmission case was also included. For 4.4% of the patients the route of transmission was unknown. The median of CD4<sup>+</sup> cell counts was 305 cells/ $\mu$ l (8-1469 cells/ $\mu$ l range). PVL of 38% (35/92) of the patients were below 10,000 copies/ml, between 10,000 and 100,000 copies/ml for 40.2% (37/92) and over 100,000 copies/ml for 21.8% (20/92) of the participants.

### Primary ARV Resistance in PR and RT Genes

Mutations that cause viral resistance to NRTI, NNRTI and PI were observed in 5 patients (5.43% CI 95%, 1.8-12.22%) (Table 1). Three patients (3.3%) presented NRTI resistance mutations (M41L, D67N and T219), one patient presented the NNRTI resistance mutation K103N and in another one the L90M PI resistance mutation was detected. Dual or triple class resistance was not identified. Contrasting to the low prevalence of primary drug resistance mutations, many accessory mutations were found in the *pol* gene (Figure 1). T215C revertant mutation was identified in one patient although it does not reduce susceptibility to NRTI, it suggests that the mutation T215Y/F was previously present in the genome.

### HIV-1 Genetic Diversity in PR and RT Genes

A high prevalence of HIV-1 subtype B in PR/RT genes (71.7%, 66/92) was observed. HIV-1 subtype C and F1 represented 5.4% (5/92) and 3.3%, (3/92) respectively (Figure 2). The HIV-1 recombinant forms were detected in 19.6% (18/92) of the isolates: F1B<sup>PR</sup>BF1B<sup>RT</sup> (n=4), F1B<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> (n=2), B<sup>PR</sup>BF1B<sup>RT</sup> (n=2), B<sup>PR</sup>CBC<sup>RT</sup> (n=1), B<sup>PR</sup>BCB<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> (n=1), F1B<sup>PR</sup>BF1<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>F1B<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>C<sup>RT</sup> (n=1), F1<sup>PR</sup>F1CB<sup>RT</sup> (n=1), C<sup>PR</sup>CB<sup>RT</sup> (n=2), D<sup>PR</sup>DF1<sup>RT</sup> (n=1). Intersubtype recombination in PR/RT genes was confirmed by bootscanning (Figure 3). Recombinant breakpoints in 3 isolates coincided with CRF29\_BF and CRF31\_BC breakpoints and therefore these isolates were referred as CRF29\_BF-like and CRF31\_BC-like, respectively, because only partial sequencing of the HIV-1 genome was available. Among 18 recombinant viruses, 5 were detected in patients living in Cuiabá the capital, 4 were detected in patients from Várzea Grande interior city and the other 9 recombinants were observed in patients from 9 different small interior cities scattered throughout the State.

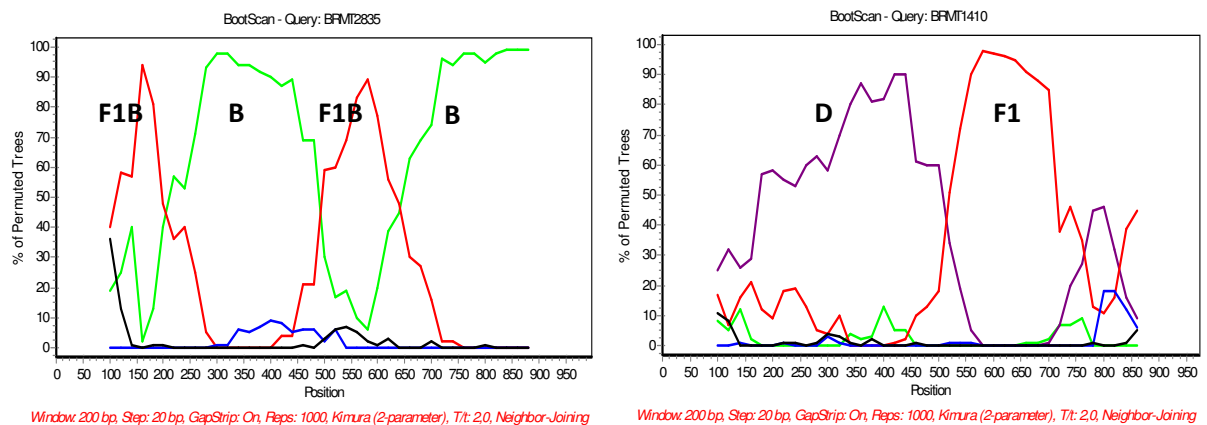


Fig. 3. Bootscanning analysis in HIV-1 PR and RT of 2/18 HIV-1 recombinant isolates among drug naïve patients from Mato Grosso State, central west Brazil. The GenBank accession numbers used in the analysis are subtype A: AB253429; subtype B: K03455, U63632 and AY173956; subtype C: U46016, AF110967 and AF286228; subtype D, AFK03454 and M27323 and subtype F1: AF077336, AF005494 and DQ358801.

In the phylogenetic analyses the three closely related pairs of isolates with high support values (>70%) coded as BRMT1338-BRMT1340, BRMT1194-BRMT1195 and BRMT2708-BRMT2709 belong to 3 heterosexual couples. The fourth pair of F1B<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> recombinant isolates BRMT2566-BRMT2567 with high support value belong to mother and child vertical transmission pair. Among the 38 women recruited three were pregnant and were infected with B<sup>PR</sup>/C<sup>RT</sup> recombinant viruses. Among five naïve patients with resistance mutations four presented HIV-1 subtype B<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup> and the other had C<sup>PR</sup>C<sup>RT</sup> recombinant virus. All patients with primary resistance mutations were women reporting heterosexual exposure and were diagnosed between 2003 to 2008.

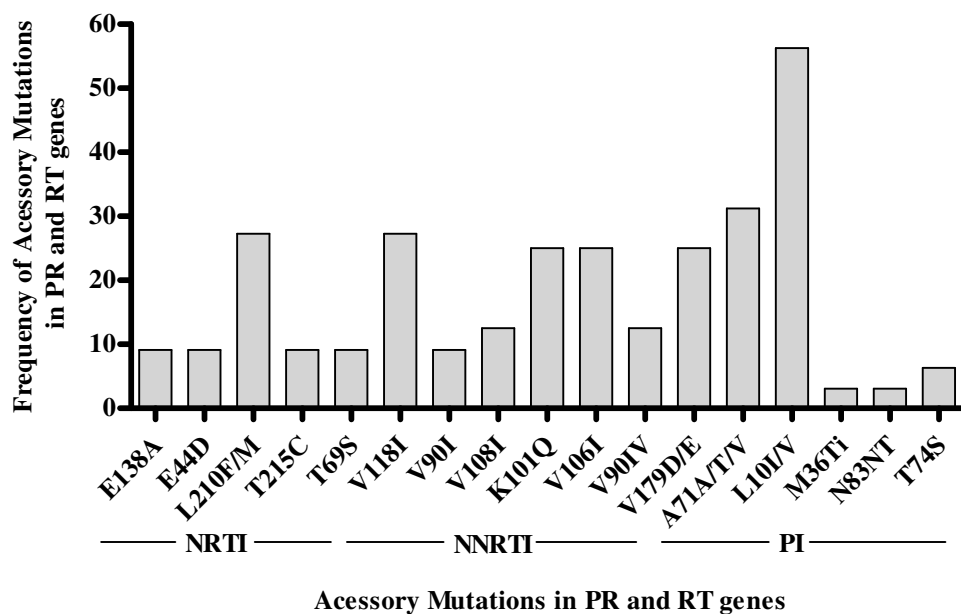


Fig. 1. Frequency of accessory mutations in PR and RT genes associated with NRTI, NNRTI and PI mutations of HIV-1 isolates among drug naïve patients from Mato Grosso State, central west Brazil.

## DISCUSSION

Brazil is an enormous country and this study represented an opportunity to deepen our understanding about the molecular characteristics of AIDS epidemic in the interior of the country. The results from this study among ARV naïve patients recruited in Cuiabá city, Mato Grosso/State in central west Brazil indicate that a complex AIDS epidemic pattern has developed far away from the epicenter of the epidemic. Despite the low prevalence of primary resistance to antiretroviral drugs, very high HIV-1

diversity characterized by the co-circulation of “pure” subtypes B, F1, C and diverse recombinant forms including subtypes B, F1,C and D were observed.

Regarding primary resistance the data herein presented are in accordance with two recent multicentric Brazilian studies including naïve patients from mainly medium to large urban cities from the south and southeast regions that showed low to moderate levels (5-15%) of primary drug resistance [Sprinz et al., 2009]. Another study from central west Brazil showed rates of primary drug resistance ranging from 8-10% [Cardoso et al., 2009]. Our results are also similar to studies performed in the northeast and south regions [Medeiros et al., 2006; Rodrigues et al., 2006]. Overall the low prevalence of primary drug resistance detected corroborate the lack of recommendations of pre-treatment genotypic tests for naïve patients adopted by the Ministry of Health.

Four out of five drug mutations detected were associated with NRTI and NNRTI and the predominance of mutations to these 2 classes of ARV reflects their extensive use in the first line ARV regimen. These findings are also due to the greater persistence of these mutations in the absence of selective pressure to ARV. Naïve patients carrying the reversion mutation detected in codon 215 have been also described in another study conducted in central west Brazil [Cardoso et al., 2009].

In the phylogenetic analysis the predominance of HIV-1 subtype B which formed a monophyletic cluster indicates its “founder effect” in Mato Grosso State. HIV-1 subtype B that was probably the first to be introduced in southeast Brazil was widely disseminated throughout the country by sexual, perinatal and parenteral routes and was also the first subtype to reach other geographical areas as the central west [Morgado et al., 1994; Galvão-Castro et al., 1996, Cardoso et al, 2009]. In Mato Grosso State, similarly to most Brazilian studies subtype B predominated. However extensive genetic diversity much higher than observed in Goiás, central west Brazil was detected.

This study showed that complex recombinant HIV-1 viruses represent an important component in the AIDS epidemic in this State where around 20% of the isolates were intersubtype B, F1,C and D mosaics. This high diversity has probably been influenced by the high migration rate of patients from the most populated and industrialized southeast region mainly to the capital Cuiabá, where its population grew from 50,000 in the year of 1980 to over 550,000 in 2010. Previous studies conducted in central west and other regions had already shown the wide participation of recombinant forms in the Brazilian epidemic, only surpassed by subtype B [Sá-Filho et al., 2005; Stefani et al., 2007; Cardoso et al., 2009; Cardoso et al., 2010]. The current study identified two isolates with the same recombination points as the CRF31\_BC and one patient who presented CRF31\_BC-like isolate came from southern Brazil where this CRF was originally described [Santos et al., 2007]. Another recombinant had the same breakpoint as CRF29\_BF described in São Paulo, southeast. Only full-length or near-full length analyses can indicate if these CRF31\_BC-like and CRF29\_BF-like recombinants are indeed the same CRFs as previously described or second generation CRFs or either if these are unique recombinant forms.

This is the first study to describe the circulation of HIV-1 subtype D in central west which represents a minor subtype identified in southeast, northeast and north Brazil. The male patient harboring a recombinant virus containing subtype D lived for the last 10 years in “Chapada dos Guimarães” a well known touristic city that attracts visitors from all over the world. In 1999, HIV-1 subtype D was identified as a recombinant virus with subtypes B and F in a patient from Rio de Janeiro [Ramos et al., 1999]. Later subtype D strains identified in Brazil were shown to possibly have South African origin [Couto-Fernandez et al., 2006]. It is reasonable to suppose that the isolate classified as subtype D in the current study was probably imported from patients in the southeast where most cases of subtype D infections were reported.

This study also confirms the introduction and spread of HIV-1 subtype C in central west Brazil, still as a minority variant. HIV-1 subtype C has been sporadically identified among patients from central west Brazil [Stefani et al., 2007, Cardoso et al., 2009]. It is important to note that Mato Grosso State is considered a new agricultural frontier in the country attracting large number of individuals from the south region where HIV-1 subtype C prevails. Despite this important internal migration route, HIV-1 subtype C prevalence as a “pure” virus is still low in this State while one third of the recombinants included subtype C. This study reported also a small percentage of HIV-1 subtype F1 isolates,

contrasting with the high percentage of recombinant forms that included HIV-1 subtypes B and F1. It is possible that after the initial introduction of subtype F1 in Brazil, multiple successive recombination events with subtype B have promoted the reduction of subtype F1 and increase of B/F1 recombinants throughout the country.

The diverse and complex pattern of intersubtype HIV-1 recombinants observed in this study indicate the generation and the widely circulation of recombinants throughout the country, not only in south and southeast regions. These results indicate the importance of the surveillance of primary resistance and subtypes in different geographical areas within the country, away from the epicenter of the epidemic to help compose the molecular epidemiology map of HIV-1 in Brazil.

## Acknowledgments

This study was supported by UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health (Grant #310-06). We are thankful to the technical staff of LACEN/MT for support during recruitment.

## References

Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED, Clark RA, Roberston M, Zolopa AR, Moss A. 2001. Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *AIDS*. 15:1181-1183.

Brígido LF, Franco HM, Custódio RM, Oliveira CA, P Ferreira JL, Eira M, Bergel F, Araújo F, Carneiro JR, Rodrigues R. 2005. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 21: 673-682.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brígido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A, Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 17: 1063-1069.

Cardoso LPV, Queiroz BB, Stefani MMA. 2009. HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol*. 46:134-139.

Cardoso LPV, 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*. 82:351-357.

Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimarães ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG. 2006. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 22:207-211.

Frenkel LM, Wagner LE, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S. 1995. Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 *pol* mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. *J Clin Microbiol*. 33: 342-347.

Galvão J. 2002. Access to antiretroviral drugs in Brazil. *Lancet*. 360:1862-1865.

Galvão-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*. 91:335-338.

Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. 2008. Identification of two new CRF<sub>BF</sub> in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS*. 22: 433-438.

Inocência LA, Pereira AA, Sucupira MCA, Couto-Fernandez JC, Jorge CP, Souza DFC, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simão MBG, Tanuri A. 2009. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc.* 12: 1-6.

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.* 17:138-145.

Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbell E, Chee M, Gingeras TR. 1996. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med.* 2: 753-759.

Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AMS, Albuquerque MFPM. 2006. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101:845-849.

Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, Castilho EA, Galvão-Castro B, Mullins JI, Hendry RM. 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.* 10:569-576.

Nunn AS, Fonseca EM, Bastos FI, Gruskin S, Salomon JA. 2007. Evolution of Antiretroviral Drug Costs in Brazil in the Context of Free and Universal Access to AIDS Treatment. *PLoS Med.* 4: 1804-1817.

Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C, Snoeck J, van Rensburg EJ, Wensing AM, van de Vijver DA, Boucher CA, Camacho R, Vandamme AM. 2005. An Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics* 21:3797-3800.

Ramos A, Tanuri A, Schechter M, Rayfield MA, Hu DJ, Cabral MC, Bandea CI, Baggs J, Pieniazek D. 1999. Dual and Recombinant Infections: An Integral Part of the HIV-1 Epidemic in Brazil. *Emerg Infect Dis.* 5: 65-74.

Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhacker RD, Ferreira JL, Castro SM, Stella IM, Brigido LF. 2006. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res.* 116: 201-207.

Sá-Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM. 2005. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 21: 145-151.

Sá-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.

Sprinz E, Netto EM, Lima MPJS, Furtado JJD, Eira M, Zajdenverg R, Madruga JV, Lewi DS, Pedro RJ, Soares MA. 2009. Primary Antiretroviral Drug Resistance among HIV Type Infected Individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25: 861-867.

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: 205-209.