



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL  
E SAÚDE PÚBLICA**

**BRUNA COELHO CARVALHO**

---

**Resistência primária aos antirretrovirais e diversidade  
genética do HIV-1 em pacientes do estado do Tocantins**

---

**Goiânia-GO 2011**

**Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás- UFG a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFG, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**     **Dissertação**           **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação**

Autor(a):		<b>BRUNA COELHO CARVALHO</b>	
CPF:	011657221-35	E-mail:	brunacarvalho85@gmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não			
Vínculo Empregatício do autor			
Agência de fomento:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Sigla:	CAPES
País:	Brasil	UF:	Goiás
		CNPJ:	00889834/0001-08
Título:	RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES DO ESTADO DO TOCANTINS		
Palavras-chave:	Genotipagem, resistência primária, diversidade genética, HIV-1		
Título em outra língua:	HIV-1 PRIMARY ANTIRETROVIRAL RESISTANCE AND GENETIC DIVERSITY IN PATIENTS OF TOCANTINS STATE, BRAZIL		
Palavras-chave em outra língua:	Genotyping, primary resistance, genetic diversity, HIV-1		
Área de concentração:	IMUNOLOGIA		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	21/02/2011		
Programa de Pós-Graduação:	MEDICINA TROPICAL		
Orientador(a):	DRA. MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI		
CPF:	260258841-53	E-mail:	mstefani@iptsp.ufg.br
Co-orientador(a):			
CPF:		E-mail:	

**3. Informações de acesso ao documento:**

Liberação para disponibilização?<sup>1</sup>     total           parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: \_\_\_\_\_

Outras restrições: \_\_\_\_\_

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

**Bruna Coelho Carvalho**  
Assinatura do(a) autor(a)

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

<sup>1</sup> Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

**BRUNA COELHO CARVALHO**

---

**Resistência primária aos antirretrovirais e diversidade genética do HIV-1 em pacientes do estado do Tocantins**

---

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

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

**Goiânia-GO 2011**

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

C331r Carvalho, Bruna Coelho.  
Resistência primária aos antirretrovirais e diversidade genética do HIV-1 em pacientes do estado do Tocantins [manuscrito] / Bruna Coelho Carvalho. - 2011.  
xi, 129 f. : il., color.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mariane Martins de Araújo Stefani.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de quadros, tabelas e figuras, abreviaturas, siglas e símbolos.

Anexos.

1. Genotipagem. 2. Resistência primária. 3. Diversidade genética. 4. HIV-1. I. Título.

CDU:578.828HIV(811.7)

*Aos meus pais, Gúbio Moreira de Carvalho  
e Leila Maria Bandeira Coelho, e à minha irmã, Marina.*

## AGRADECIMENTOS

---

*A cada vitória o reconhecimento devido ao meu Deus, pois só Ele é digno de toda honra, glória e louvor.*

*À minha família, pelo amor e apoio de sempre. Meus pais Gúbio e Leila e minha irmã Marina. Amo vocês.*

*Ao meu namorado Wilmar, a minha eterna gratidão.*

*A minha orientadora Profa. Dra. Mariane Stefani, agradeço pela oportunidade, pela confiança depositada, por me mostrar o caminho da ciência e por acreditar no meu potencial principalmente quando nem eu mais acreditava.*

*Aos amigos queridos, de perto e de longe, meu muito obrigada.*

*A todos os amigos do laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase e dos laboratórios vizinhos, pelo incentivo, apoio e amizade.*

*À Ludimila, pela generosidade desde o primeiro contato, pela amizade, disponibilidade, ajuda, aprendizado e incentivo.*

*À Sirlene, pela coleta e envio das amostras dos pacientes do estado do Tocantins.*

*Por fim, gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que me ajudaram a concluir mais uma etapa em minha vida.*

## SUMÁRIO

---

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. BREVE HISTÓRICO.....	1
1.2. ESTRUTURA E GENOMA DO HIV-1.....	2
1.3. CICLO REPLICATIVO DO HIV-1.....	5
1.4. IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1/AIDS.....	8
1.5. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HIV-1.....	9
1.6. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1.....	12
1.6.1. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 NO MUNDO.....	14
1.6.2. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 NO BRASIL.....	16
1.7. DROGAS ANTIRRETROVIRAIS.....	19
1.7.1. Inibidor Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR).....	20
1.7.2. Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (INNTR).....	20
1.7.3. Inibidor da Protease (IP).....	21
1.7.4. Inibidor de Entrada (IE).....	21
1.7.5. Inibidor da Integrase.....	21
1.8. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL.....	22
1.8.1. ESQUEMA TERAPÊUTICO INICIAL PARA O TRATAMENTO DA	

INFECÇÃO PELO HIV-1.....	23
1.8.2. FALHA NA ADESÃO AO TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL.....	25
1.8.3. TESTE DE GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA AOS ANTIR- RETROVIRAIS E TERAPIA DE RESGATE.....	25
1.9. RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS.....	27
1.9.1. RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS.....	28
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>32</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
3.1. OBJETIVO GERAL.....	34
3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	34
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. GRUPO DE ESTUDO.....	35
4.2. EXTRAÇÃO DO RNA GENÔMICO.....	36
4.3. SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR ATRAVÉS DA RETRO- TRANSCRIÇÃO DO RNA.....	36
4.4. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (NESTED – PCR).....	37
4.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	38
4.6. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO OBTIDO ATRAVÉS DA NESTED – PCR.....	39



4.7. SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO DO GENE <i>POL</i> .....	39
4.8. ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS.....	41
4.9. ANÁLISE GENÉTICA DO HIV-1.....	41
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
5.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	43
5.2. GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIR- RETROVIRAIS EM PACIENTES DO ESTADO DO TOCANTINS.....	44
5.3. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES DO ESTADO DO TOCANTINS.....	46
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>56</b>
<b>8. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>57</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXO 1.</b> Sistema de classificação da infecção pelo HIV do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 1993.....	79

<b>ANEXO 2. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 3. QUESTIONÁRIO PADRONIZADO.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXO 4. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 5. FINANCIAMENTO DO PROJETO DE PESQUISA.....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 6. MANUSCRITO.....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

---

<b>Quadro 1:</b> Antirretrovirais disponíveis no Brasil.....	20
<b>Quadro 2:</b> Reação de Nested-PCR.....	37
<b>Quadro 3:</b> Sequência dos primers 5'→3' empregados para amplificação e sequenciamento do gene <i>pol</i> do HIV-1.....	40
<b>Tabela 1:</b> Principais características dos pacientes HIV+ participantes do estudo.....	44
<b>Tabela 2:</b> Características dos pacientes com mutações associadas à resistência primária em <i>pol</i> (PR e TR) e nível de resistência aos ARVs.....	47
<b>Figura 1:</b> Esquema representativo da estrutura do HIV-1.....	2
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo da organização do genoma do HIV-1.....	4
<b>Figura 3:</b> Esquema do ciclo replicativo do HIV-1.....	7
<b>Figura 4:</b> Mapa representativo dos subtipos genéticos do HIV-1 no Brasil.....	19
<b>Figura 5:</b> Eletroforese em gel de agarose do produto de 1125pb obtido através da amplificação pela nested-PCR (2ª Etapa), analisado sob luz ultravioleta.....	38
<b>Figura 6:</b> Árvore filogenética das sequências do gene da PR e TR (subtipos puros) do HIV-1 de pacientes virgens de tratamento do estado do Tocantins.....	48
<b>Figura 7:</b> Análise por <i>Bootscreening</i> da sequência de nucleotídeos das regiões da PR e TR dos isolados <b>A)</b> BRTO03-43 (B <sup>PR</sup> /BF1 <sup>TR</sup> ) e <b>B)</b> BRTO05-43 (C <sup>PR</sup> /CF1 <sup>TR</sup> )..	49

**Figura 8:** Subtipos genéticos do HIV-1 nas regiões da PR e TR em pacientes do estado do Tocantins..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

3TC: lamivudina

ABC: abacavir

Aids: síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*)

APV: amprenavir

ARV: *AIDS-Associated Retrovirus*

ARV: antirretroviral

ATV: atazanavir

AZT: zidovudina

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças

cDNA: DNA complementar

CPR: Calibração da População com Resistência

cpx: complexa

CRF: forma recombinante circulante

CV: carga viral

d4T: estavudina

dATP: desoxiAdenina trifosfatada

dCTP: desoxiCitosina trifosfatada

ddI: didanosina

dGTP: desoxiGuanina trifosfatada

DLV: delavirdina

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTPs: desoxinucleotídeos trifosfatados

DRV: darunavir

DST: doenças sexualmente transmissíveis

DTT: agente redutor ditiotreitól

dTTP: desoxiTimina trifosfatada

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EFZ: efavirenz

ETR: etravirina

FPV: fosamprenavir

g: força centrífuga relativa à gravidade

gp: glicoproteína

H<sub>2</sub>O: água

HAART: terapia antirretroviral altamente eficaz (do inglês, *Highly Active Antiretroviral Therapy*)

HIV: vírus da imunodeficiência humana (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*)

HIV-1: vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2: vírus da imunodeficiência humana tipo 2

HIV-BresNet: Rede Brasileira para Vigilância de Resistência a Drogas para o HIV-1

HSH: homens que fazem sexo com homens

HTLV: vírus T-linfotrópicos humanos

HTLV-I: vírus T-linfotrópicos humanos tipo I

HTLV-II: vírus T-linfotrópicos humanos tipo II

HTLV-III: vírus T-linfotrópicos humanos tipo III

HXB2: vírus selvagem do subtipo B do HIV-1

IAS-USA: Sociedade Internacional da Aids dos Estados Unidos da América

IC: Intervalo de Confiança

ICTV : do inglês, *International Committee on Taxonomy Viruses*

IDV: indinavir

IE: inibidor de entrada

IN: integrase

IP: inibidor da protease

INTR: inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa

INNTR: inibidor não-nucleosídeo da transcriptase reversa

Kb: kilobases

kD: kilodaltons

L: litro

LACEN / TO: Laboratório Central do Tocantins

LAV: do inglês, *Lymphadenopathy-Associated virus*

LPV: lopinavir

LTRs: repetições terminais longas

M: metionina

M: molar

máx: máxima

min: mínima

μL: microlitro

μg: micrograma

mA: miliampére

mg: miligrama

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

mL: mililitro

mM: milimolar

mm<sup>3</sup>: milímetro cúbico

mRNA: RNA mensageiro

MS: Ministério da Saúde

NFV: nelfinavir

ng: nanograma

nested-PCR: reação em cadeia pela polimerase em duas etapas

nM: nanomolar

nm: nanômetros

NVP: nevirapina

OH: hidroxila

pmol: picomolar

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia pela polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

PICs: complexos de pré-integração

PR: protease

qsp: quantidade suficiente para

r: ritonavir

RDC: República Democrática do Congo

RENIC: Rede Nacional de Isolamento e Caracterização do HIV

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

RT-PCR: transcrição reversa por reação em cadeia pela polimerase

RTV: ritonavir

SIV: vírus da imunodeficiência símia

SIVcpz: vírus da imunodeficiência símia do chimpanzé

SIVgor: vírus da imunodeficiência símia do gorila

SPSS: do inglês, *Statistical Package for the Social Sciences*



SQV: saquinavir

SUS: Sistema Único de Saúde

T-20: enfuvirtida

TAE: tris-acetato-EDTA

TAM: mutações aos análogos de timidina

TARV: terapia antirretroviral

TBE: tris-borato-EDTA

TDF: tenofovir

TO: Tocantins

TR: transcriptase reversa

U: unidades

UDI: usuário de drogas injetáveis

URF: forma recombinante única

V: valina

V: volts

## RESUMO

---

Diferenças regionais na epidemiologia molecular do HIV-1 têm sido descritas no Brasil e publicações sobre a epidemia da região Norte do país são restritas. Apesar do grande número de drogas antirretrovirais (ARV) das classes inibidores nucleosídicos e não-nucleosídicos (INTR e INNTR) da transcriptase reversa e inibidores da protease (IP), mutações associadas à resistência podem comprometer a eficácia terapêutica. Mutações de resistência primária presentes antes do uso de ARV ocorrem principalmente por transmissão de vírus resistentes. Este estudo descreve a prevalência e o perfil de mutações de resistência primária aos ARVs e subtipos do HIV-1 identificados em pacientes virgens de tratamento do estado do Tocantins. A genotipagem do gene completo da protease (PR) e 750pb da transcriptase reversa (TR) do HIV-1 foi feita a partir de RNA plasmático e incluiu retrotranscrição, nested PCR (primers K1/K2 e F2/DP10) e sequenciamento (kit DYEnamic ET Dye Terminator, GE Healthcare; ABI Prism 3130). As sequências foram editadas pelo software *Staden Package*. A resistência primária foi analisada pela ferramenta de Calibração da População com Resistência (CPR), empregando a ferramenta do *Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM)*. O perfil de susceptibilidade dos isolados com mutação de resistência aos ARVs foi analisado pelo *Stanford HIV Drug Resistance Database* ([hivdb.stanford.edu](http://hivdb.stanford.edu)). Os subtipos genéticos do HIV-1 foram identificados pelos softwares REGA HIV-1, SIMPLOT e por inferência filogenética. Pacientes virgens de tratamento (n=52) foram recrutados no LACEN/Palmas/TO entre 2008-2010. A maioria dos pacientes estudados (59,6%) era do sexo masculino e 73,1% referiu exposição heterossexual. Mutações que conferem resistência primária aos ARVs foram identificadas em 11,5% (06/52) dos isolados: BRTO08-43: M41L, L210W, T215D (INTR); BRTO02-83: Y181C (INNTR); BRTO13-83: D67G, K219E (INTR); BRTO20-83: V108I, Y181C (INNTR); BRTO02-66: M46L (IP); e BRTO13-66: V90I, K103N (INNTR). Isolados com subtipos concordantes nas regiões PR/TR representaram 86,5% (45/52): subtipo B<sup>PR</sup>B<sup>TR</sup>=78,8% (41/52), subtipo C<sup>PR</sup>C<sup>TR</sup>=5,8% (03/52), subtipo F1<sup>PR</sup>F1<sup>TR</sup>=1,9%. Isolados com subtipos discordantes em PR e TR indicando recombinação intersubtipo representaram 13,5% (07/52): B<sup>PR</sup>F1<sup>TR</sup>=1,9% (01/52); B<sup>PR</sup>BF1<sup>TR</sup>=7,7% (04/52) e C<sup>PR</sup>CF1<sup>TR</sup>=3,9% (02/52). Nosso estudo em pacientes virgens de tratamento do estado do Tocantins identificou prevalência moderada de resistência primária aos ARVs, predomínio do subtipo B que co-circula

com o subtipo C e um percentual significativo de formas recombinantes intersubtipos B/F1 e C/F1. Estes dados indicam a transmissão do HIV-1 resistentes a ARVs em pequenos centros urbanos no interior do Brasil, onde a epidemia é mais recente. Neste contexto, o monitoramento da prevalência de resistência primária é importante para avaliar a necessidade e custo-benefício da implantação do teste de genotipagem pré-ARV para otimizar a escolha do esquema ARV em pacientes do estado do Tocantins.

## ABSTRACT

---

Regional differences in the molecular epidemiology of HIV-1 have been reported in Brazil, where there is scarce publication about the epidemic in north region. Despite the large number of antiretroviral drugs (ARV) belonging to nucleoside and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI and NNRTI) and protease inhibitors (PI) classes, the selection of resistance-associated mutations may compromise the therapeutic efficacy. Primary resistance mutations, present prior to ARV use, occur mainly due to the transmission of resistant virus. This study describes the prevalence and profile of primary resistance mutations to ARV and the molecular epidemiology of HIV-1 in ARV naive patients from Tocantins State. For HIV-1 genotyping of the entire protease gene (PR) and 750 bp of reverse transcriptase (RT) gene, plasma RNA was extracted, reverse transcribed into cDNA) and used as the target for nested polymerase chain reaction (K1/K2 and F2/DP10 primers) and fragments were sequenced (kit DYEnamic ET Dye Terminator, GE Healthcare; ABI Prism 3130). The sequences were edited by the *Staden Package* software. Primary drug resistance was analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool employing the Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM). The susceptibility profile of ARV mutations was analyzed by Stanford HIV Drug Resistance Database (hivdb.stanford.edu). HIV-1 genetic subtypes were identified by REGA HIV-1 and SIMPLOT softwares and by phylogenetic inference. Naïve patients (n=52) were recruited in LACEN/Palmas/TO between 2008-2010. The majority of investigated patients (59.6%) were males and 73.1% reported heterosexual exposure. Primary mutations that confer resistance to ARV were identified in 11.5% (06/52) of the isolates: BRTO08-43: M41L, L210W, T215D (NRTI); BRTO02-83: Y181C (NNRTI); BRTO13-83: D67G, K219E (NRTI); BRTO20-83: V108I, Y181C (NNRTI); BRTO02-66: M46L (PI); e BRTO13-66: V90I, K103N (NNRTI). Isolates with concordant subtypes in PR/RT regions represented 86.5% (45/52): subtype B<sup>PR</sup>B<sup>RT</sup>=78.8% (41/52), subtype C<sup>PR</sup>C<sup>RT</sup>=5.8% (3/52), subtype F1<sup>PR</sup>F1<sup>RT</sup>=1.9%. Isolates with discordant subtypes in PR and RT genes indicating intersubtype recombination represented 13.5% (07/52): B<sup>PR</sup>F1<sup>TR</sup>=1.9% (01/52); B<sup>PR</sup>B<sup>TR</sup>F1<sup>TR</sup>=7.7% (04/52) e C<sup>PR</sup>C<sup>TR</sup>F1<sup>TR</sup>=3.9% (02/52). Our study among naive patients from Tocantins State describes moderate prevalence of primary resistance to ARV, the predominance of subtype B that co-circulates with subtype C and a significant number of B/F1 and C/F1 recombinant forms. These results

indicate the transmission of ARV resistant HIV-1 isolates among patients from a small inland city in north Brazil, where the epidemic is more recent. In this context, it is important to monitor the prevalence of primary drug resistance in order to assess the need and the cost-benefit of the implementation of pre-treatment genotypic tests aiming to optimize the choice of the ARV regimen among naive patients from Tocantins State.

# 1. INTRODUÇÃO

---

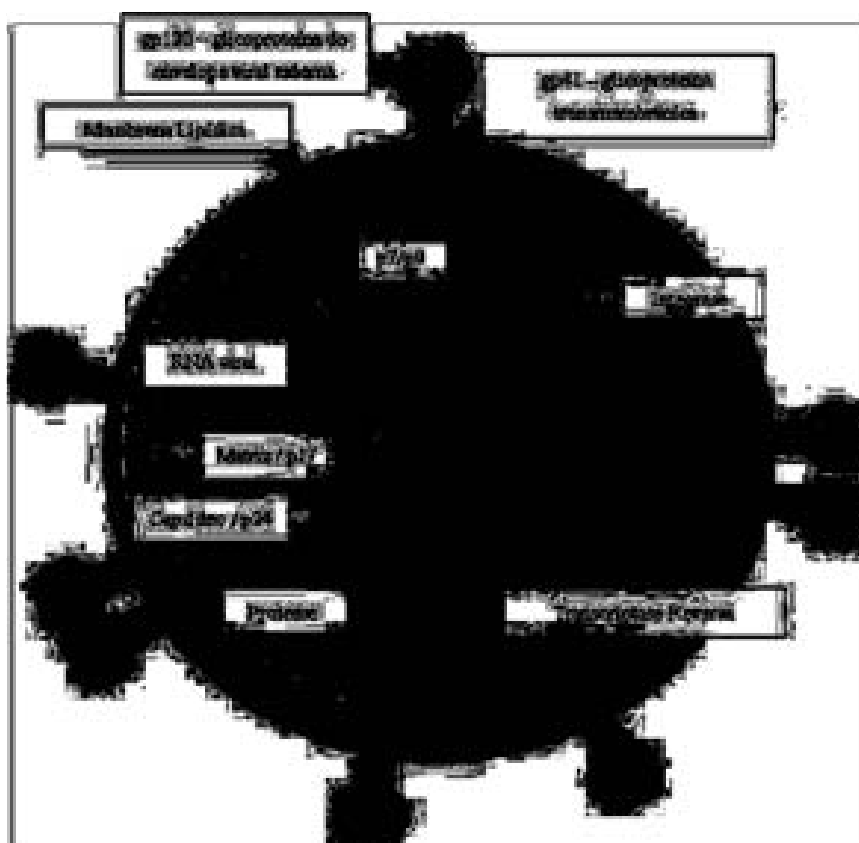
## 1.1. BREVE HISTÓRICO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids), foi reconhecida em meados de 1981 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (CDC 1981). Os primeiros pacientes diagnosticados eram jovens homossexuais do sexo masculino que apresentavam um grupo de doenças raras como Sarcoma de Kaposi, infecções oportunistas como a pneumonia causada por *Pneumocystis jiroveci* e linfadenopatias (Gotlieb et al. 1981). Em maio de 1983, foi isolado um novo retrovírus a partir do linfonodo de um paciente homossexual com múltiplas linfadenopatias. Tratava-se de um vírus do tipo HTLV (vírus T-linfotrópicos humanos) que apresentava diferenças significativas quando comparado com os vírus já descritos HTLV-I (vírus T-linfotrópicos humanos tipo I) e HTLV-II (vírus T-linfotrópicos humanos tipo II), sendo por isso denominado HTLV-III (vírus T-linfotrópicos humanos tipo III) (Gallo et al. 1984). Neste mesmo ano, foi isolado no Instituto Pasteur um novo vírus do grupo dos retrovírus, citopático para linfócitos, que ficou conhecido como LAV (*Lymphadenopathy-Associated virus*) (Barre-Sinoussi et al. 1983). Em 1984, foi isolado um retrovírus a partir de pacientes aidéticos de diferentes grupos de risco, que recebeu a denominação de ARV (*AIDS-Associated Retrovirus*) (Levy et al. 1984).

Os vírus HTLV-III, LAV e ARV foram isolados de diversos pacientes aidéticos. Em 1985, análises das sequências de nucleotídeos destes três vírus associados à aids, demonstraram que os mesmos eram muito semelhantes e pertenciam à mesma família de retrovírus. Em 1986, o *International Committee on Taxonomy Viruses* (ICTV) renomeou estes agentes como *human immunodeficiency virus* (HIV) (Coffin et al. 1986). De acordo com as normas internacionais, baseadas principalmente nas propriedades estruturais dos vírus, estabelecidas em 1998 pelo ICTV, os vírus conhecidos como HIV pertencem à família *Retroviridae*, ao gênero *Lentivirus* e, representam o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

## 1.2. ESTRUTURA E GENOMA DO HIV-1

A partícula viral infecciosa do HIV-1, ou vírion, é esférica, possui aproximadamente 100-120 nm de diâmetro, apresentando em sua camada mais externa um envelope viral constituído por bicamada lipídica derivada da membrana da célula do hospedeiro. O envelope viral apresenta duas glicoproteínas (gp) associadas de forma não covalente: gp 120 (proteína de envelope viral externa) e gp 41 (proteína de envelope viral transmembrânica). Na parte interna do envelope encontram-se a proteína da matriz p17 associada ao ácido mirístico (M) constituindo a matriz e a proteína do capsídeo viral p24. Internamente ao capsídeo encontra-se o nucleocapsídeo composto pelas proteínas p7/p9 e o genoma diplóide, com 9,2 kilobases (Kb). Este é constituído por duas fitas simples de ácido ribonucleico (RNA) idênticas que codificam três enzimas virais: protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN) (Figura 1) (Barre-Sinoussi 1996, Sierra et al. 2005).



**Figura 1:** Esquema representativo da estrutura do HIV-1. Adaptada de web-books, data de acesso 10/09/2010, disponível em: <http://www.web-books.com/eLibrary/ON/B0/B22/05MHIV.html>

O genoma do HIV-1 é constituído por (Figura 2):

- Genes estruturais: *env*, *gag* e *pol*;
- Genes reguladores: *tat* e *rev*;
- Genes acessórios: *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*;
- Repetições terminais longas (LTRs).

O produto primário do gene *env* é a gp160 que sofre clivagem dentro do retículo endoplasmático originando a glicoproteína de superfície gp120 e a glicoproteína transmembrana gp41 (Connor et al. 1992).

O gene *pol* codifica uma poliproteína de 160 kD (kilodaltons) que após clivagem proteolítica origina as enzimas virais TR, PR e IN. A TR é constituída por dois monômeros: p51 e p66, sendo fundamental ao ciclo replicativo do HIV, uma vez que é responsável pela síntese de DNA (ácido desoxirribonucléico) a partir do RNA viral (Mulky et al. 2004). Em razão da ausência de atividades de reparo, a TR não é capaz de corrigir erros que ocorrerem durante a retrotranscrição, o que conseqüentemente leva a uma alta taxa de mutações. A PR viral está envolvida no processamento pós-traducional das poliproteínas *gag* (para produzir as proteínas estruturais p24, p17 e p7 do core viral) e *gag-pol* (para produzir enzimas essenciais como TR e IN) gerando várias proteínas e enzimas virais, sendo necessária para o ciclo replicativo do vírus e importante alvo de terapia antirretroviral (TARV) (Gavin & Yogen 2002). A IN é essencial para incorporação do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro. O genoma viral integrado é denominado “provírus” e servirá de molde para a geração de RNA genômicos e mensageiros quando a célula infectada for ativada e começar a transcrever seus próprios genes (Connor et al. 1992). A IN também é responsável por outras funções no ciclo replicativo que incluem cooperação na transcrição reversa, importação nuclear dos complexos pré-integração (PICs) e produção de partículas do vírus (Mulder et al. 2002).

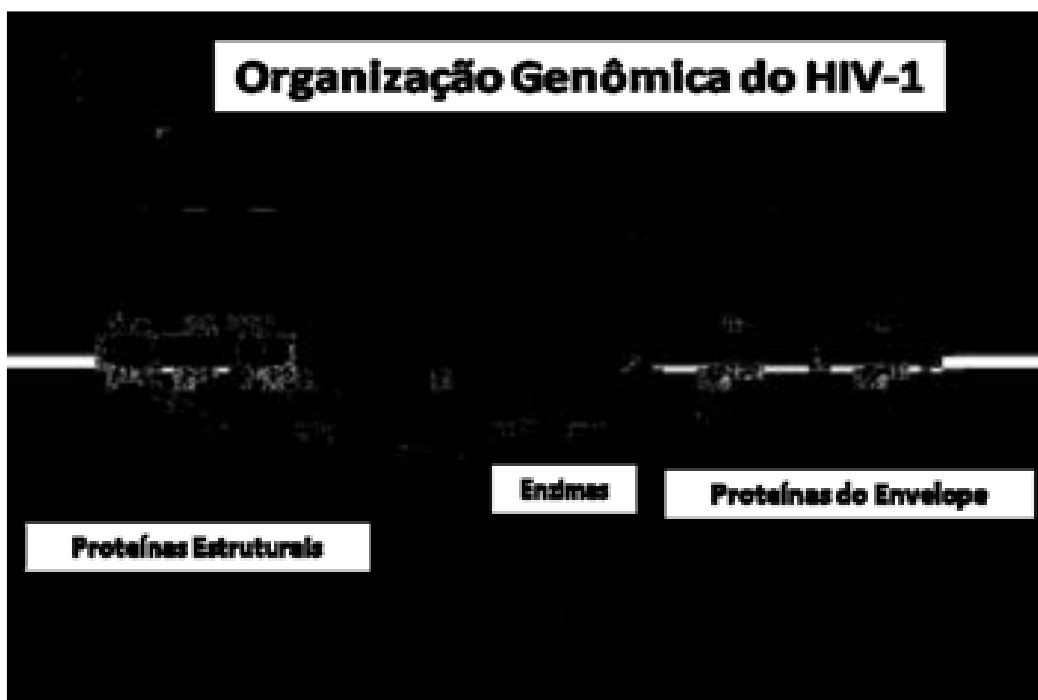
O gene *gag* codifica uma proteína de 55kD, a qual, após clivagem, origina várias proteínas virais da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p7/p9) (Connor et al. 1992).

Entre os três genes estruturais, o gene *env* é o que revela maior variabilidade genética. Variações nas sequências dos genes *gag* e *pol* podem levar à formação de vírus inviáveis, mas as sequências *env* aceitam um grande número de mutações, muitas das quais auxiliam no escape a resposta imune do hospedeiro (Connor et al. 1992).

As repetições terminais longas (LTRs) são sequências idênticas que se localizam em cada extremidade do genoma (5' e 3') e regulam a integração do genoma viral ao



genoma da célula do hospedeiro, a expressão de genes virais, bem como sua replicação (Peng et al. 1989). O gene *tat* regula a transcrição destas LTRs pela ligação aos RNAs recém-transcritos. O gene *rev* promove o transporte do RNA mensageiro (mRNA) do núcleo para o citoplasma para tradução de novas proteínas de *env*, *gag* e *pol*. O gene *nef* está envolvido na replicação do HIV-1 *in vivo*. O gene *vif* possui um papel importante na fase de maturação viral através do desenvolvimento da estrutura cônica do capsídeo, que está envolvida na infectividade dos vírions em células não infectadas e também, pode interromper a atividade antiviral da enzima humana APOBEC (enzima citidina desaminase que muda ácidos nucleicos virais) por degradação proteossômica, inibindo sua entrada nos vírions. O gene *vpr* atua na liberação de vírions de células infectadas mediante o brotamento das partículas virais recém produzidas. O gene *vpr* se liga aos PICs facilitando o transporte do material genético até o núcleo e atua na replicação viral em células que não estão em divisão (Barre-Sinoussi 1996, Miller et al. 2007, Los Alamos 2010).



**Figura 2:** Esquema representativo da organização do genoma do HIV-1. Adaptada de: Genomic organization of HIV-1, data de acesso 20/09/2010, disponível em: <http://www.liquidarea.com/2009/08/aids-decifrado-genoma-virus/>

### 1.3. CICLO REPLICATIVO DO HIV-1

A entrada do vírus nas células hospedeiras humanas é iniciada mediante interações entre a gp120 e o receptor celular CD4 encontrado na superfície de células T auxiliares, macrófagos e células dendríticas. O sítio de ligação ao CD4 é representado pelos domínios variáveis da gp120, as chamadas alças V1, V2 e V3. Essa interação (gp120-CD4) provoca uma mudança conformacional na molécula gp120, o que acarreta a exposição de sítios de ligação a co-receptores de quimiocinas (Figura 3) (Levy 1996, Wang et al. 2000).

Entre vários co-receptores descritos, dois co-receptores de quimiocinas desempenham um papel importante e determinam o tropismo celular, CCR5 e CXCR4. Dependendo do co-receptor utilizado, as variantes do HIV-1 são classificadas em R5 quando usam o co-receptor CCR5 (presente em macrófagos e células dendríticas) ou X4 quando utilizam CXCR4 (presente em células T CD4<sup>+</sup>). Há, ainda, linhagens virais mistas ou com duplo tropismo (X4R5) que utilizam simultaneamente os dois co-receptores (Connor et al. 1997). As variantes X4 do HIV-1 estão associadas preferencialmente à redução de células CD4<sup>+</sup> naive, levando a um aumento da deterioração imunológica. As variantes R5 têm como alvo, principalmente, as células CD4<sup>+</sup> de memória, com menor impacto na fisiologia do sistema imune. Neste sentido, na infecção recente prevalecem variantes virais com capacidade de infectar células que expressam receptores CCR5, predominantes durante a fase de latência clínica. Em uma fase mais avançada da infecção, a prevalência de variantes do HIV-1 com tropismo por receptor CXCR4 aumenta e geralmente o tempo de progressão para aids costuma ser de aproximadamente três a quatro anos (Mayers 1992). Ademais, vários estudos confirmaram que a mudança no tropismo celular do co-receptor R5 para X4 ou X4R5 é frequentemente associada com a diminuição acelerada da contagem de células CD4<sup>+</sup> e progressão da doença (Connor et al. 1997, Daar et al. 2007).

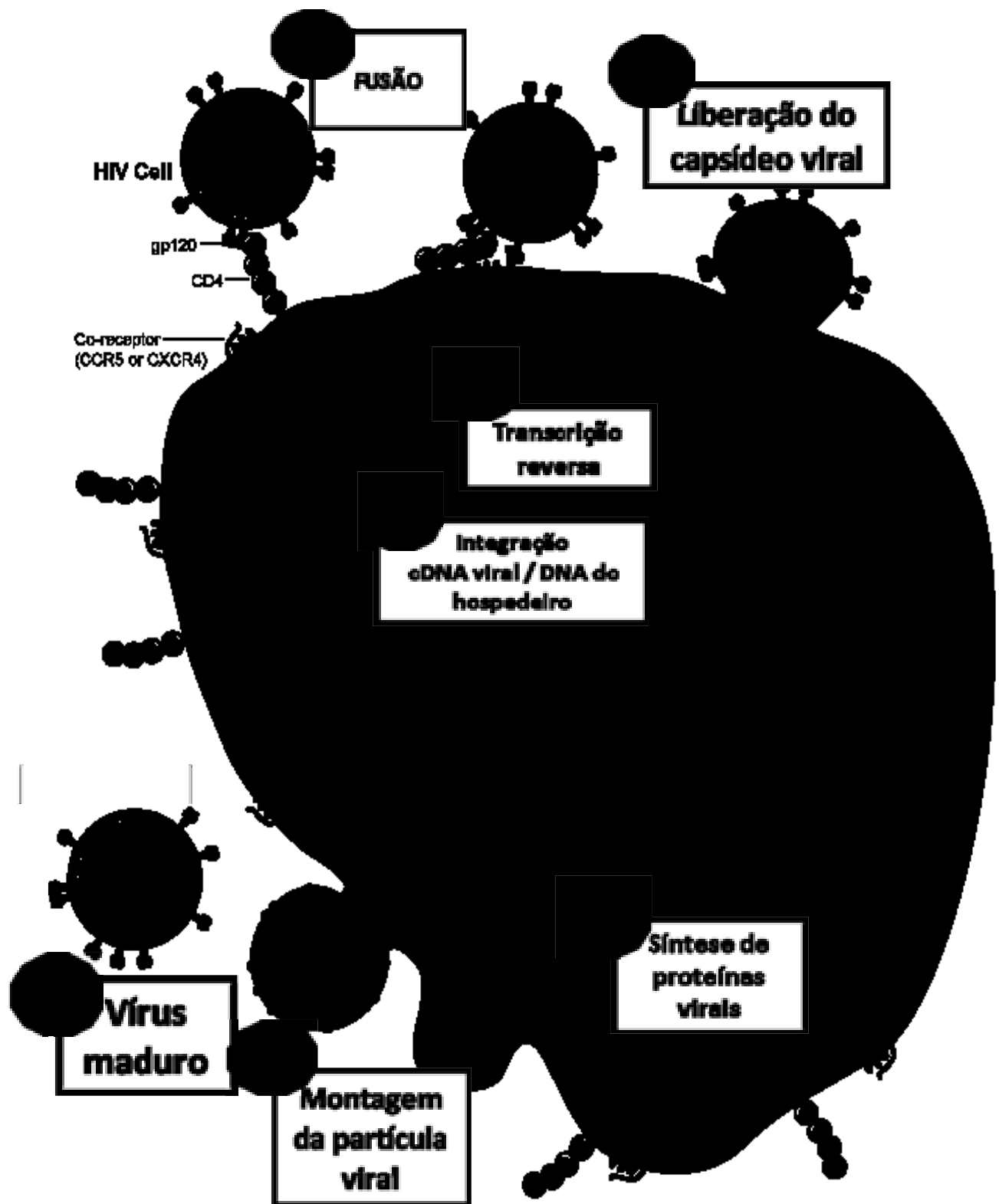
A ligação da gp120 aos co-receptores de quimiocina induz a ativação da gp41, que se insere na bicamada lipídica da célula-alvo, ativa peptídeos fusogênicos que promovem a fusão do envelope viral com a membrana celular e subsequente liberação do capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (Connor et al. 1997).

No citoplasma, a enzima viral TR faz a transcrição do RNA viral em DNA complementar (cDNA). Uma vez sintetizado, o cDNA é duplicado e a fita dupla é transportada para o núcleo por PICs constituídos por uma matriz, pela enzima IN e pela

proteína *vpr*. No núcleo, a enzima IN catalisa uma clivagem endonucleolítica chamada processamento da extremidade 3', onde dois nucleotídeos são removidos da extremidade 3' de cada uma das duas fitas de cDNA viral. A IN então catalisa um processo conhecido como transferência de cadeia de DNA (*DNA strand transfer*). A IN cliva a cadeia de DNA da célula hospedeira e une a extremidade 3' do cDNA viral à extremidade 5' do DNA celular. Finalmente, a integração do cDNA viral ao genoma da célula hospedeira resulta na formação do provírus que servirá de molde para a geração de RNA genômicos e mensageiros quando a célula infectada for ativada e começar a transcrever seus próprios genes (Barre-Sinoussi 1996). A partir deste momento, o vírus pode permanecer latente e o DNA viral não ser transcrito em RNAm viral. Quando a célula com provirus for ativada ocorrerá a transcrição do DNA viral e a formação de novos vírions (Connor 1992).

A transcrição do DNA viral em RNA é feita pela enzima RNA polimerase da célula infectada, e depende do estado de ativação da célula. Assim, a proteína viral *tat* liga-se ao RNAm e aumenta a capacidade de transcrição da enzima RNA polimerase, permitindo a formação de um RNAm viral funcional, estes são transportados para fora do núcleo para serem traduzidos. Durante a tradução, primeiramente são sintetizados os genes reguladores e acessórios e depois os genes estruturais (Turner & Summers 1999, Swanson et al. 2004).

A montagem das partículas virais infecciosas ocorre mediante o empacotamento do genoma viral, proteínas codificadas pelo gene *gag* (p17, p24 e p7/p9) e as enzimas codificadas pelo gene *pol* (TR, PR e IN). O complexo nucleoproteína é inserido em um envelope contendo as glicoproteínas virais gp120 e gp41. A liberação dos vírions ocorre por brotamento da membrana plasmática da célula infectada e as novas partículas virais liberadas são capazes de infectar outras células após o processo de maturação que ocorre no meio extracelular, dando continuidade ao ciclo infeccioso (Turner & Summers 1999, Freed 2001).



**Figura 3:** Esquema do ciclo replicativo do HIV-1. Adaptada de web-books, data de acesso 10/09/2010, disponível em:

<http://www.web-books.com/eLibrary/ON/B0/B22/05MHIV.html>

#### 1.4. IMUNOPATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1/AIDS

O HIV-1 é transmitido pelas vias sexual, parental e vertical. Após a entrada e a infecção de células-alvo, os vírus migram em dois dias, através de canalículos linfáticos, para os linfonodos regionais, onde a replicação viral tem início e os vírus são liberados na corrente sanguínea após cinco dias, disseminando-se para vários órgãos e outros linfonodos (Bartlett 1999).

O risco de transmissão do HIV-1 depende do valor da carga viral (CV). Quando este valor está abaixo de 1.700 cópias/mL, as chances de transmissão são baixas. Desta forma, a fase aguda assume um importante papel na transmissão, uma vez que a CV neste período é sempre elevada (Wawer et al. 2005). No entanto, como não é raro que indivíduos infectados ainda mantenham cargas virais altas mesmo na fase crônica da doença, eventos de transmissão também são possíveis. Doenças sexualmente transmissíveis (DST) podem aumentar os níveis da CV na região genital sem que ocorra aumento da viremia. Desta forma, indivíduos infectados por outras DSTs têm maiores chances de transmitir o vírus, mesmo durante a fase crônica da infecção (Serwadda et al. 2003).

A infecção primária ou fase aguda da infecção pelo HIV-1 é geralmente assintomática e corresponde ao período de alta viremia. Geralmente as manifestações surgem de duas a quatro semanas após a contaminação e podem apresentar características clínicas inespecíficas como febre, linfadenopatia, cefaléia, mialgia, artralgia, anorexia, náusea, vômito, diarreia e exantema maculopapular eritematoso. Mas o curso da fase aguda é autolimitante e rápido, cessando em até 30 dias. A infecção primária de curso mais severo tem sido relacionada a uma rápida progressão da doença. Nesta fase, os exames laboratoriais demonstram uma diminuição na contagem de células T CD4+, que geralmente é transitória (Bartlett 1999).

A soroconversão do paciente em geral ocorre após duas a seis semanas do contágio e antes desse período, os testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-HIV são negativos em decorrência da pequena quantidade de anticorpos produzida. Este período é conhecido como “janela imunológica” e nesta etapa, a resposta imune adaptativa é capaz de controlar parcialmente a infecção e a replicação viral (Staprans & Feinberg 2004).

Com a resolução do quadro de infecção primária e a soroconversão, o paciente entra na fase crônica da infecção assintomática sendo conhecida como fase de latência

clínica do HIV. Esta fase pode durar de vários meses a alguns anos. A replicação viral é mantida nos órgãos linfóides, porém, identifica-se um processo de equilíbrio dinâmico no qual a destruição das células  $CD4^+$  é parcialmente contrabalanceada pela sua produção. Portanto, ocorre uma destruição lenta e gradativa de células T  $CD4^+$ , macrófagos e células dendríticas (Bartlett 1999, Geskus et al. 2007).

Ao final do período de latência, com o declínio constante de células T  $CD4^+$ , o sistema imune começa a evidenciar a sua fragilidade frente ao HIV-1: a contagem absoluta de células T  $CD4^+$  pode cair abaixo de  $200\text{cél}/\text{mm}^3$  e algumas doenças oportunistas começam a aparecer, caracterizando o início da infecção sintomática pelo HIV (Bartlett 1999, Staprans & Feinberg 2004). Quando a contagem de células T  $CD4^+$  chega a nível inferior a  $200\text{cél}/\text{mm}^3$ , ou quando apresenta alguma doença listada na categoria C do sistema de classificação da infecção pelo HIV-1 do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC 1993) (Anexo 1), o paciente desenvolve a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. O período compreendido entre a infecção inicial pelo HIV e o diagnóstico de aids é em média de 10 anos (Karon et al. 1992).

## **1.5. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO HIV-1**

Estima-se que no final de 2008 existiam cerca de 33,4 milhões (31,1 a 35,8 milhões) de pessoas vivendo com HIV em todo o mundo. A região mais atingida é a África Sub-Saariana, que possui uma estimativa de 22,4 milhões de pessoas vivendo com HIV em 2008, o que corresponde a 67% do total do mundo (UNAIDS 2009b).

Na América Latina a epidemia de HIV se mantém estável com uma prevalência de 0,6% (0,5 - 0,6%) e o número de pessoas vivendo com HIV é estimado em cerca de 2 milhões (1,8 a 2,2 milhões) em 2008 (UNAIDS 2009b). A América Latina é a região que lidera atividades de prevenção do HIV pelo sistema de saúde pública. Em particular, o Brasil é conhecido pelo seu programa de prevenção e controle do HIV pelo Ministério da Saúde (MS), o que contribuiu para atenuar a gravidade da epidemia no país (Okie 2006).

O primeiro caso de aids no Brasil foi diagnosticado em 1980, em um jovem bissexual do sexo masculino de São Paulo (Meira 2002). Inicialmente, a epidemia avançou lentamente nas regiões mais populosas do país: o Sudeste, Nordeste e Sul. Em 1983, dos 39 casos diagnosticados, dois eram provenientes do Nordeste, três do Centro-

Oeste, e os 34 casos restantes do Sudeste, dos quais 24 eram residentes do estado de São Paulo. Nesse mesmo ano, três casos foram diagnosticados no Sul do país pela primeira vez, todos no estado do Rio Grande do Sul. De 1980 a 1985, novos casos foram diagnosticados quase exclusivamente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, principalmente nas capitais. Em 1985, o estado do Pará, região Norte, registrou seu primeiro caso de aids. Desde então, casos de aids têm sido notificados em todas as regiões, e desde 1988 em todos os 27 estados do Brasil (Brasil 2000a, Brasil 2001).

Segundo Boletim Epidemiológico ano VII nº 01 (Versão Preliminar) do Programa Nacional de DST e AIDS – Ministério da Saúde, no Brasil foram notificados, desde o início da epidemia (1980) até junho de 2010, 592.914 casos de aids. Durante este período, 229.222 mortes ocorreram em decorrência da doença. Em média, por ano, são notificados cerca de 35 mil novos casos. Em relação ao HIV, a estimativa é de que existam 630 mil pessoas infectadas no país. A prevalência do HIV na população geral de 15 a 49 anos é de 0.61%, entretanto, considerando grupos de risco, tais como usuário de drogas injetáveis (UDI), homens que fazem sexo com homens (HSH) e profissionais do sexo, a prevalência de HIV é superior a 5%. A taxa de incidência de aids no país vem apresentando tendência à estabilização em patamares elevados nos últimos anos e, em 2008, atingiu 18,2 por 100.000 habitantes. Entretanto, existem grandes diferenças regionais na forma como a aids se distribui, configurando, no país, diversos perfis da epidemia (Brasil 2010b, MS 2010b).

Nas regiões Sudeste e Centro-Oeste há um declínio da taxa de incidência, e aumento nas demais regiões no período entre 2000 a 2008. A região Sudeste ainda concentra o maior percentual de casos notificados no país (58%), com 344.150 registros da doença, a região Sul concentra 19,5% dos casos (115.598 notificações), a Nordeste 12,6% (74.364), a Centro-Oeste 5,7% (34.057) e a Norte 4,2% (24.745) (Brasil 2010b, MS 2010b).

Em queda nos grandes centros urbanos, a epidemia avança pelo interior do país. De 1997 a 2008, a taxa de incidência cresceu em municípios com menos de 50 mil habitantes. Porém, as regiões Norte e Nordeste apresentam um perfil diferente, com aumento da taxa de incidência, quando se compara 1998 com 2008, tanto em municípios grandes quanto em pequenos. O número de municípios brasileiros com pelo menos um caso de aids cresce ao longo dos anos e atingiu 87% em 2008 (Brasil 2010a).

A razão de gênero (número de casos em homens, dividido por número de casos em mulheres) no Brasil diminuiu consideravelmente do início da epidemia para os dias

atuais. Em 1986, a razão era de 15 casos de aids em homens para cada caso em mulheres. A partir de 2003, a razão se estabilizou, para cada 15 homens, existem 10 mulheres. Tanto entre homens quanto entre mulheres, as maiores taxas de incidência encontram-se na faixa etária de 25 a 49 anos e observa-se uma tendência de crescimento nos últimos dez anos, a partir de 40 anos de idade (Brasil 2010a).

Entre adultos do sexo masculino, na categoria de exposição sexual, há maior transmissão em heterossexuais (45,2%). Entre HSH, ocorre uma tendência de estabilização na proporção de casos, em média 28% a partir de 2000. Contudo, na faixa etária de 13 a 24 anos do segmento, observa-se um aumento na proporção de casos de aids. Em mulheres, o predomínio da forma de transmissão é heterossexual em toda a série histórica. A transmissão por UDI apresentou uma acentuada redução tanto em homens quanto em mulheres. Entre os homens caiu de 22,6% em 1997, para 7,4% em 2008. Nas mulheres, a queda foi de 10,2% em 1997, para 2,6% em 2008 (Brasil 2010a, MS 2010b).

No Brasil, a partir de 1991, o aumento do número de casos associados à subcategoria de exposição heterossexual se fez acompanhar de uma proporção cada vez maior de mulheres em idade fértil infectadas pelo HIV-1. Esse fenômeno, denominado de “feminização” da epidemia, por sua vez, trouxe como consequência crianças infectadas através da via perinatal (Vermelho et al. 1999). A transmissão vertical, ou também chamada materno-infantil, é hoje a principal via de infecção pelo HIV-1 em crianças (Burns & Mofenson 1999). Porém, o Brasil reduziu em 49% a incidência de casos de aids em crianças menores de cinco anos de idade no período de 1998 a 2008. O coeficiente de mortalidade também caiu. A taxa de incidência de aids nessa faixa etária é utilizada para monitorar rotineiramente a transmissão vertical do HIV, pois praticamente representa a principal forma de transmissão de quase a totalidade de casos nessa faixa etária (93,9% das notificações) (Brasil 2010a, MS 2010b).

O Brasil foi o primeiro país não-industrializado a adotar uma política pública de acesso universal ao tratamento antirretroviral. Aproximadamente 200.000 indivíduos HIV positivos estão em tratamento gratuito na rede pública de saúde brasileira, o que representa cerca 95% dos pacientes elegíveis diagnosticados (MS 2010b).



## 1.6. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1

Os vírus da imunodeficiência símia (SIVs) constituem um grande grupo de vírus encontrados naturalmente em muitas espécies de primatas africanos. Apesar destes lentivírus de primatas não-humanos serem chamados de vírus da imunodeficiência, eles não induzem uma doença em seus hospedeiros naturais. Estes primatas africanos podem ser naturalmente infectados por mais de 40 diferentes vírus da imunodeficiência símia (SIV), dois dos quais cruzaram a barreira das espécies e geraram os vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2) (Keele et al. 2009). Apesar de apresentarem a mesma via de transmissão, possuem potenciais patogênicos diferentes: o HIV tipo 1 é o mais virulento e o responsável pela pandemia da aids. O HIV tipo 2 apresenta progressão mais lenta da doença, é encontrado quase que exclusivamente no oeste da África e, é responsável por microepidemias restritas à Europa, Ásia e Estados Unidos (Hu et al. 1996, Grant & Cock 2001). Cada um dos dois tipos divide-se em grupos, subtipos, subsubtipos, Formas Recombinantes Circulantes (CRFs) e Formas Recombinantes Únicas (URFs) (Hahn et al. 2000).

O HIV-1, amplamente distribuído por todos os continentes, apresenta uma alta variabilidade genética decorrente de diversos fatores que atuam em sinergismo, permitindo uma rápida evolução viral. Essa variabilidade genética do HIV-1 ocorre pela sua elevada taxa de replicação *in vivo*, de aproximadamente 300 ciclos por ano, e pelo rápido *turnover* do vírus (a cada dia em média, são produzidas  $10^{10}$  novas partículas virais) (Bebenek et al. 1989, Ho et al. 1995). Ademais, a alta taxa de erros da enzima TR e a ausência de mecanismos eficientes de reparo durante os estágios da retrotranscrição do genoma viral, podem levar a eventos de substituição, deleção e incorporação de nucleotídeos, produzindo, assim, vírus com mutações. Algumas mutações podem gerar vírus não funcionais, porém outras podem permitir que o vírus escape da resposta imune do hospedeiro ou podem conferir resistência aos antirretrovirais (ARV), escapando do efeito destes medicamentos (Pulsinelli & Temin 1991, Mansky 1998).

As elevadas taxas de replicação e de mutação viral, somada à baixa atividade de correção dos erros da TR resultam numa complexa distribuição de genomas virais intimamente relacionados, porém não idênticos denominados *quasispecies* (Eigen 1996). Sequências de nucleotídeos de espécies virais em um único indivíduo podem

diferir em até 10%. A pressão seletiva aplicada, por exemplo, pelo sistema imunológico ou por medicamentos ARVs afetam também a evolução viral (Thomson et al. 2002).

Devido a esta diversidade na sequência de nucleotídeos o HIV-1 pode ser classificado em três principais grupos filogenéticos: grupo M (“*major*” / maior), grupo O (“*outlier*” / divergente), e grupo N (“*non-M non-O*” / nem M nem O). Em 2009, foi descrita uma nova variante distinta dos três grupos já estabelecidos, chamada de grupo P (Plantier et al. 2009). O grupo M é o responsável pela maioria absoluta das infecções em todo o mundo.

O HIV-1 grupo M pode ser subdividido em 9 subtipos filogenéticos reconhecidos: A, B, C, D, F, G, H, J e K. Dentro do grupo M, a variabilidade genética intersubtipo média é de 15% para o gene *gag* e de 25% para o gene *env* (Robertson et al. 2000, Thomson et al. 2002). A região *pol* é mais conservada, pois codifica as enzimas que são essenciais para a replicação (TR, PR e IN), sendo que uma mutação nesta região poderia levar à formação de vírus não funcionais (Spira et al. 2003).

Além disso, dentro de um mesmo subtipo viral, é possível identificar grupos de isolados geneticamente relacionados, chamados subsubtipos, que parecem ser filogeneticamente mais relacionados entre si do que com outros subtipos (Robertson et al. 2000). Este é o caso dos subtipos A e F, cujos vírus estão atualmente classificados em subsubtipos A1, A2, A3 e A4 e, F1 e F2, respectivamente (Triques et al. 2000, Thomson et al. 2002, Meloni et al. 2004, Vidal et al. 2006).

Outro fator relacionado à diversidade genética do HIV-1 é a formação de vírus recombinante intersubtipo devido à infecção, simultânea ou sequencial de uma mesma célula, por dois ou mais subtipos virais diferentes. Eventos de recombinação entre vírus do mesmo subtipo, conhecida como recombinação intrasubtipo também pode ocorrer. Durante a recombinação, a TR executa uma leitura alternada entre os diferentes transcritos de RNA, que quando são distintos resultam na formação de um vírus heterozigoto (Nájera et al. 2002). As recombinações intersubtipos do HIV-1 têm contribuído de forma significativa para o aumento da diversidade viral, podendo constituir formas recombinantes circulantes (CRFs) ou formas recombinantes únicas (URFs) (Thomson et al. 2002).

- CRFs são formas recombinantes capazes de causar micro-epidemias. São definidas mediante sequenciamento completo ou quase completo do genoma viral em três indivíduos que não apresentam vínculo epidemiológico, sendo que é necessário descrever sequências idênticas no genoma completo de pelo

menos dois indivíduos e o sequenciamento do genoma quase completo em um terceiro indivíduo (Robertson et al. 2000).

- URFs são cepas de vírus recombinantes que não constituem classe ou grupo filogenético definidos, que podem ser identificados em apenas um indivíduo ou em grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico (Thompson et al. 2002).

Até o momento foram reconhecidas 45 CRFs. A primeira CRF classificada (CRF01\_AE), oriunda da África Central, representa os subtipos A e E recombinantes. O genoma completo puro para o subtipo E nunca foi descrito. Porém, a designação “E” tem sido amplamente utilizada, e sua renomeação levaria à confusão. Entretanto, atualmente, sequências de vírus para as quais não há subtipo puro completo são denominadas não classificadas ou “U” de *unclassified*. Se o vírus recombinante envolver mais de três subtipos distintos, a CRF recebe a notação *cpx* (complexa) (Los Alamos 2010).

### **1.6.1. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 NO MUNDO**

Estudos moleculares epidemiológicos mostram que, com exceção da África Subsaariana, onde quase todos os subtipos, CRFs, e URFs têm sido detectados, há um padrão geográfico específico de distribuição dos subtipos do HIV-1 pelo mundo (Osmanov et al. 2002, Hamelaar et al. 2006). Esta distribuição padrão parece ser a consequência do tráfico ou migração viral acidental, com um efeito fundador resultante, ou a prevalência de uma rota de transmissão, o que resulta em uma forte vantagem local para a predominância de determinado subtipo em uma população (Myers 1994).

Em uma escala global, as formas genéticas prevalentes do HIV-1 grupo M são os subtipos A, B e C (Hamelaar et al. 2006). O subtipo C é responsável por aproximadamente 50% das infecções por HIV-1 no mundo, e predomina na África do Sul e na Índia. O subtipo A é predominante na África Central e Oriental (Quênia, Uganda, Tanzânia e Ruanda) e em países da Europa Oriental. O subtipo B é a principal forma genética predominante na Europa Ocidental e Central, nas Américas e na Austrália e também é comum em vários países do Sudeste da Ásia, Norte e Sul da África, do Oriente Médio e entre homens homossexuais Russos. A importância das

CRFs na pandemia global do HIV-1 é cada vez mais reconhecida, e estima-se que as CRFs compreendem 18% das infecções (Osmanov et al. 2002, Hamelaar et al. 2006).

O subtipo A pode ser encontrado formando CRFs, sendo estimado que 27% do total das infecções pelo HIV-1 são causadas por este subtipo, com a maioria dos casos representados pela CRF02\_AG. A infecção pelo HIV-1 na África Ocidental é principalmente devido a esta CRF (Gao et al. 2001, Osmanov et al. 2002).

Na Europa e Estados Unidos, onde o subtipo B do HIV-1 grupo M predomina, subtipos não-B e formas recombinantes estão se tornando cada vez mais frequentes (Tagliamonte et al. 2006, Tramuto et al. 2007). Na América do Sul, apesar do subtipo B ainda ser o de maior prevalência, a frequência do subtipo F1 e subtipo C, bem como de formas recombinantes B/F1, B/C e F1/C têm aumentado significativamente (Sanabani et al. 2006a, Dileria et al. 2007, Guimarães et al. 2008, Bello et al. 2010, Delgado et al. 2010). Na Argentina, foram identificadas duas epidemias: subtipo B, responsável pela maioria dos casos em homens homossexuais e recombinantes B/F1 encontrado principalmente em heterossexuais e usuários de drogas injetáveis (Avila et al. 2002).

O HIV-1 grupo O parece ser endêmico nos Camarões e países vizinhos da África Central e Ocidental, onde representa apenas cerca de 1-5% das amostras de HIV-1 positivas (Peeters et al. 1997). De forma semelhante, os vírus do grupo N foram identificados em um número limitado de indivíduos nos Camarões (Ayouba et al. 2000).

Uma nova variante do HIV-1, distinta dos três grupos já estabelecidos, grupos M, N e O, relacionada com o SIVgor (vírus da imunodeficiência símia do gorila), foi encontrada em uma mulher oriunda de Camarões de 62 anos de idade, soro positiva para HIV em 2004, pouco depois de se mudar para Paris. A provável explicação para o seu aparecimento é a transmissão do vírus de gorilas para humanos representando uma nova variante do HIV-1 classificada como grupo P. Esta nova descoberta recente destaca o contínuo surgimento de novas variantes do HIV, particularmente no Centro-Oeste da África, a origem de todos os atuais grupos do HIV-1 (Plantier et al. 2009).

O HIV-2 também exibe uma elevada diversidade genética com a existência de oito grupos filogenéticos, classificados de A a H, sendo o grupo A o mais prevalente em todo o mundo (Schim & Aaby 1999, Damond et al. 2004). O HIV-2 é responsável por epidemias localizadas em alguns países da África Ocidental, principalmente na Guiné-Bissau, Senegal, Gambia, Burkina Faso, Ghana, Costa do Marfim, Nigéria e Cabo Verde. A nível mundial, estima-se que cerca de 420.000 indivíduos estejam infectados pelo HIV-2. A prevalência da infecção por este vírus é relativamente elevada em

Portugal (cerca de 3% dos casos de aids), devido às ligações históricas e socioeconômicas com a Guiné-Bissau e Cabo Verde. Por outro lado, se mostra bastante reduzida na maior parte dos outros países com casos descritos na França, Holanda, Alemanha, Suécia, Espanha e também na Índia (Schim & Aaby 1999, Peeters et al. 2003).

O elevado nível de variabilidade genética do HIV, em especial do HIV-1, pode ter implicações importantes para a patogênese, transmissão, diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas. Diferentes subtipos de HIV-1 podem ter diferentes propriedades biológicas, resultando em diferenças na transmissibilidade e patogenicidade, entretanto estas diferenças não foram comprovadas (Tscherning et al. 1998).

### **1.6.2. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 NO BRASIL**

Como o maior país da América do Sul, o Brasil tem sido fortemente afetado pela epidemia do HIV/aids. O Brasil apresenta uma complexa distribuição geográfica de subtipos genéticos do HIV-1 em virtude de uma grande extensão territorial e, apresenta diferenças no padrão de distribuição dos subtipos. As regiões Sul e Sudeste têm sido amplamente caracterizadas em relação à epidemiologia molecular do HIV-1. No entanto, pouca informação está disponível sobre as outras regiões do país, principalmente região Norte.

HIV-1 subtipo B é o subtipo predominante no Brasil, seguido pelos subtipos F1, C, e casos isolados de D e A. Além disso, mosaicos recombinantes entre os subtipos B, F1, C, e D foram identificados (Figura 4) (Vicente et al. 2000, Gadelha et al. 2003, Cabral et al. 2006, Brígido et al. 2007, Cavalcanti et al. 2007, Eyer-Silva et al. 2007, Locateli et al. 2007, Veras et al. 2007, Cardoso et al. 2009, Machado et al. 2009, Sanabani et al. 2009, Sanabani et al. 2010).

Na região Sudeste, o epicentro da epidemia, o subtipo circulante principal é o B (aproximadamente de 70 a 90%), seguido por F1 e recombinantes B/F1 (aproximadamente de 10 a 30%), uma pequena proporção de subtipo C (<8%) e casos esporádicos dos subtipos A e D. Há algumas evidências de que a prevalência do subtipo C está aumentando desde a sua introdução no Sul do Brasil e que esteja se disseminando para o Norte do país (Brígido et al. 2005, Cabral et al. 2006, Eyer-Silva et al. 2007,

Sanabani et al. 2009, Sanabani et al. 2010). Uma distribuição similar dos subtipos também foi observada nas regiões Nordeste e Centro-Oeste. No Nordeste do Brasil, o subtipo B foi descrito em aproximadamente 90% das amostras analisadas, além de casos esporádicos dos subtipos F1, C e recombinantes B/F1 (Gadelha et al. 2003, Medeiros et al. 2006, Cavalcanti et al. 2007). No Centro-Oeste, o subtipo B apresenta-se em mais de 80% das infecções seguido pela forma recombinante B/F1, subtipo F1 e subtipo C (Cerqueira et al. 2004, Stefani et al. 2007, Veras et al. 2007, Cardoso et al. 2009).

Na região Norte observa-se também uma prevalência do subtipo B, seguido pelo subtipo F1 e forma recombinante B/F1. Foram descritas pela primeira vez, a introdução de novos subtipos (D e C), a introdução da CRF02\_AG, a presença de vários mosaicos *env/pro*, e a presença da forma recombinante  $C^{env}/B^{PR}$  (Vicente et al. 2000, Machado et al. 2009). A CRF02\_AG, uma forma altamente prevalente em diversos países africanos e a forma recombinante circulante mais disseminada no mundo, foi introduzida na América do Sul e no Rio de Janeiro quase ao mesmo tempo, assim como na região Norte, em Belém (Cornelissen et al. 2000, Carrion et al. 2003, Eyer-Silva et al. 2007, Machado et al. 2009).

Diferentemente do resto do país, na região Sul a epidemia de aids é impulsionada principalmente pelo subtipo C, seguido pelo subtipo B e da forma recombinante circulante CRF31\_BC. O subtipo C é altamente prevalente, chegando a 45% das infecções, seguido por proporções iguais ou menores do subtipo B e menor fração do subtipo F1 e recombinantes B/F1. A CRF31\_BC é particularmente prevalente no Sul do Brasil, e estudos indicam uma origem local desta forma recombinante (Soares et al. 2003a, Brigido et al. 2007, Locateli et al. 2007, Santos et al. 2007).

O subsubtipo F1 era considerado o principal subtipo não-B circulante no país. No entanto, dados recentes indicaram uma baixa proporção do subsubtipo F1 puro no Brasil (Sanabani et al. 2006). A maioria das sequências publicadas do subsubtipo F1 foi baseada em pequenos fragmentos genéticos e apenas algumas tiveram seu genoma quase completo sequenciado. Diferentemente do que se pensava, o subtipo F1 foi substituído pela forma recombinante B/F1. Assim, o declínio subsequente da taxa de crescimento deste subsubtipo foi associado com aumento da epidemia de variantes recombinantes B/F1 no Brasil (Sanabani et al. 2006, Bello et al. 2007, Sanabani et al. 2009).

A reconstrução da história desses subtipos é fundamental para compreender as características reais da epidemia do HIV-1 no Brasil. O subtipo B parece ter sido

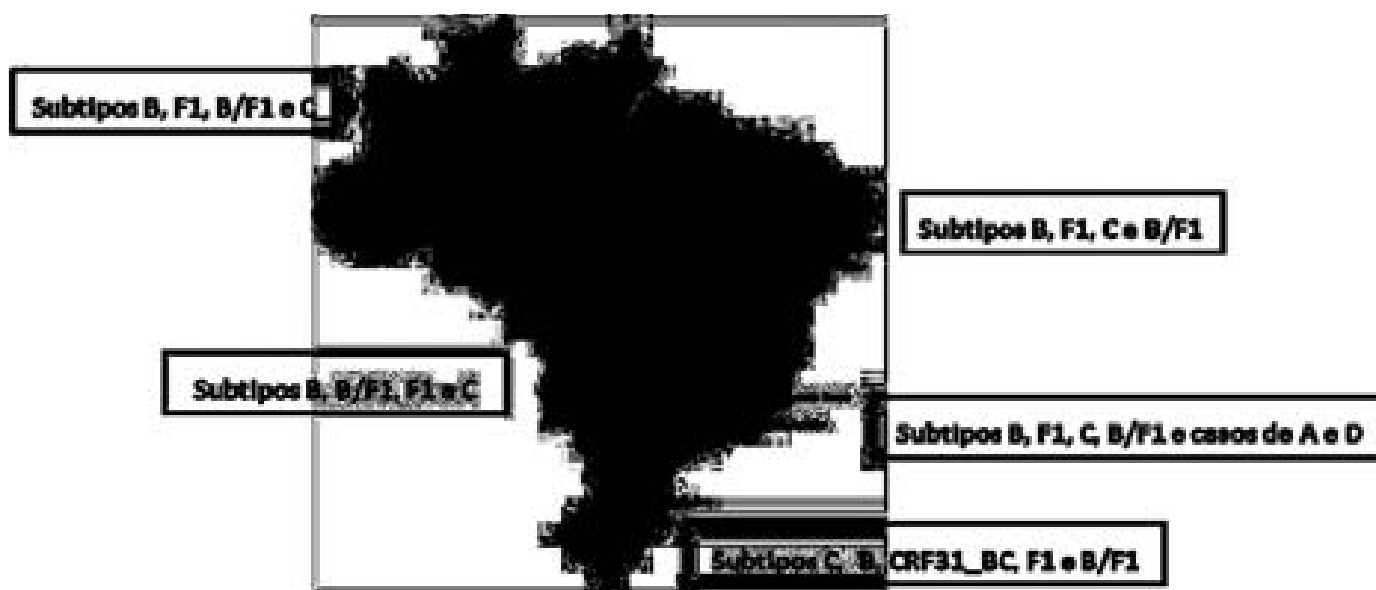
inicialmente introduzido no Brasil entre os anos de 1960 e meados da década de 1970. Este vírus provavelmente veio dos Estados Unidos (Bello et al. 2007, Gilbert et al. 2007). A epidemia do subtipo F1 foi provavelmente iniciada entre a metade de 1970 e início de 1980, pela introdução de um único vírus da África Central (Aulicino et al. 2007, Bello et al. 2007). Após suas introduções, ambos os subtipos parecem ter se espalhado de forma exponencial, e desde meados da década de 1980, a taxa de propagação de ambos têm diminuído, pelo menos na região Sudeste que representa o epicentro provável das epidemias destes subtipos no Brasil (Bello et al. 2007).

Estudos filogenéticos indicam que a introdução do subtipo C no Brasil ocorreu, provavelmente, por um único evento de um ou alguns vírus geneticamente relacionados, provavelmente na região Sul (Soares et al. 2003b, Bello et al. 2008). No entanto, sua exata origem não está elucidada. Dois estudos sugerem que a data do início da epidemia do subtipo C brasileiro ocorreu entre os anos de 1987 e 1990 (Salemi et al. 2005, Santos et al. 2007).

Embora a origem africana do subtipo C não seja conhecida, foi observado pela primeira vez na Etiópia, mas pode ser observado, juntamente com outras variantes, em muitos países da África Central e Oriental (Ayehunie et al. 1990, Hamelaar et al. 2006). Dois estudos traçam a origem do subtipo C na América do Sul e colocam o Brasil como sua provável origem (Bello et al. 2008, Fontella et al. 2008). Enquanto Bello et al. (2008) sugerem que o subtipo C no Brasil tem origem no Burundi, Fontella et al. (2008) sugerem sua origem no Quênia. Contudo, foi questionado o fato de ambos os estudos terem ignorado questões culturais e históricas que poderiam elucidar a região geográfica da qual o subtipo C no Brasil se originou. Segundo esta argumentação o subtipo C Brasileiro poderia ter se originado de Moçambique, país africano que possui uma estreita relação com o Brasil (Brígido 2009). Porém, a análise filogenética de sequências do HIV-1 do subtipo C de origem brasileira e não brasileira mostrou que sequências do Brasil e de Burundi formam um grupo monofilético, quando comparadas com sequências de outros vírus do mesmo subtipo de várias origens no mundo. Além disso, assinaturas de aminoácidos que estão presentes em sequências do subtipo C brasileiro listadas por Bello et al. (2008) são comumente encontradas em sequências que circulam no Burundi. Sugerindo que a epidemia brasileira do subtipo C pode ser o resultado da introdução de sequências do subtipo C de Burundi (Bello et al. 2008).

A cocirculação de múltiplos subtipos do HIV-1 dentro de uma região geográfica e a ocorrência de infecção dupla de indivíduos com distintos subtipos virais aumentam a

probabilidade de recombinação do HIV-1 e o desenvolvimento de mosaicos genômicos (Andrew et al. 1996), como tem sido observado no Brasil. Estudos de caracterização do genoma completo do HIV apresentaram CRFs brasileiras designadas como CRF28\_BF, CRF29\_BF, CRF39\_BF, CRF40\_BF e CRF31\_BC. As CRF28\_BF, CRF29\_BF, CRF39\_BF e CRF40\_BF foram identificadas na região Sudeste (Sa-Filho et al. 2006, Sanabani et al. 2006, Guimaraes et al. 2008), e a CRF31\_BC no Sul do Brasil (Santos et al. 2006).



**Figura 4:** Mapa representativo dos subtipos genéticos do HIV-1 no Brasil.

## 1.7. DROGAS ANTIRRETROVIRAIS

As drogas de ação antirretroviral agem impedindo diversas etapas do ciclo replicativo do HIV. Os ARVs são divididos em cinco classes (Quadro 1):

- 1.7.1. Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (INTR)
- 1.7.2. Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (INNTR)
- 1.7.3. Inibidor da Protease (IP)
- 1.7.4. Inibidor de Entrada (IE)
- 1.7.5. Inibidor da Integrase



**Quadro 1: Antirretrovirais disponíveis no Brasil**

<b>INTR</b>	<b>INNTR</b>	<b>IP</b>	<b>Inibidor de Entrada</b>	<b>Inibidor de Integrase</b>
Zidovudina (AZT)	Nevirapina (NVP)	Ritonavir (RTV)	Enfuvirtida (T-20)	Raltegravir
Estavudina (d4T)	Efavirenz (EFZ)	Saquinavir (SQV)	Maraviroc	
Didanosina (ddI)		Indinavir (IDV)		
Lamivudina (3TC)		Amprenavir (APV)		
Abacavir (ABC)		Lopinavir (LPV)		
Tenofovir (TDF)		Atazanavir (ATV)		
		Fosamprenavir (FPV)		
		Darunavir (DRV)		

### **1.7.1. Inibidor Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (INTR)**

Os inibidores do tipo INTR são precursores que sofrem trifosforilação pelas enzimas da célula hospedeira. Essas formas trifosfatadas, que não possuem o grupamento hidroxila (OH) no carbono 3 do açúcar, competem com os desoxinucleotídeos trifosfatados naturais (dNTPs) pela incorporação nas novas cadeias de DNA sintetizadas, onde provocam a terminação dessas cadeias impedindo sua alongação, ou seja, impedem a transcrição e, com isso, interrompem a síntese de DNA (Robbins et al. 1998). Os análogos de timidina (AZT e d4T) são fosforilados em células ativadas enquanto os não-timidínicos são fosforilados, de preferência, em células de memória (King et al. 2002).

### **1.7.2. Inibidor Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (INNTR)**

Os INNTR são inibidores não competitivos da enzima TR, que não requerem a ativação molecular para manifestar seu efeito antiviral. Os INNTR ligam-se a um local próximo ao sítio ativo da enzima TR, e a inibição ocorre por ligação a resíduos conservados da subunidade p66 que altera a conformação estrutural, bloqueando o sítio ativo da proteína (Joly & Yeni 1999).

### **1.7.3. Inibidor da Protease (IP)**

Os IP pertencem a uma classe de compostos peptidomiméticos que se ligam ao sítio ativo da enzima e inibem a clivagem das poliproteínas precursoras necessárias para produzir os vírions, assim, as partículas virais produzidas não são capazes de infectar novas células (Peng et al. 1989).

### **1.7.4. Inibidor de Entrada (IE)**

Os IE atuam interferindo em algum aspecto do processo da entrada do HIV-1 na célula humana, como: impedindo a ligação da gp120 do HIV-1 ao receptor CD4 na célula do hospedeiro; impedindo a ligação da gp120 aos co-receptores; ou impedindo a fusão do vírus com a célula do hospedeiro pela ligação na gp41 (Biswas et al. 2007). A enfuvirtida (T-20) bloqueia a formação da estrutura de seis hélices da gp41 e, conseqüentemente, a fusão HIV-célula (Matthews et al. 2004).

### **1.7.5. Inibidor da Integrase**

A enzima IN catalisa um processo conhecido como transferência de fita de DNA (*DNA strand transfer*) que cliva a fita de DNA do hospedeiro e une a extremidade 3' do cDNA viral à extremidade 5' do DNA do hospedeiro. A integração do cDNA viral ao genoma da célula hospedeira resulta na formação do provírus que servirá de molde para a geração de RNA genômicos e mensageiros (Barré-Sinoussi 1996). Portanto, a IN é necessária para que o DNA viral seja inserido com sucesso no DNA da célula hospedeira, para que o vírus possa utilizar o maquinário celular para produzir novos vírions. Assim, os inibidores da integrase bloqueiam a ação da enzima IN impedindo a fusão do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro (Hazuda et al. 2000).

## 1.8. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

A epidemia da aids está presente em todos os continentes (Calleja et al. 2002, Hamers & Downs 2004, Lau & Muula 2004). Um dos maiores avanços na redução da morbi-mortalidade da infecção causada pelo HIV foi a instituição da terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART / *Highly Active Antiretroviral Therapy*) em meados dos anos 90. A terapia antirretroviral (TARV) tem como objetivo a redução da carga viral, ou seja, redução da capacidade replicativa do vírus, prevenindo a infecção de novas células e maiores danos ao sistema imune, bem como reduzir a transmissão viral (Sepkowitz 2001).

O advento dos ARVs trouxe significativas mudanças na história da epidemia de HIV/aids, criando condições para a redução da incidência de infecções oportunistas, da incidência da aids (ao diminuir a disseminação do vírus à medida que reduz a carga viral), assim como, da mortalidade dela decorrente. Portanto, como consequência da introdução dos ARVs, tem-se verificado aumento da sobrevida e melhora da qualidade de vida do paciente (Palella et al. 1998, Sepkowitz 2001).

A melhoria do acesso à TARV tem contribuído para a redução da mortalidade relacionada ao HIV principalmente em países de alta renda (Phillips et al. 2007). Resultados similares estão começando a emergir em países de baixa e média renda, como no Norte do Malawi, onde nos primeiros oito meses da TARV observou-se uma redução do nível de mortalidade de 35% (Jahn et al. 2008).

Estima-se que no final de 2008 mais de 4 milhões de pessoas infectadas em países de baixa e média renda tiveram acesso ao tratamento ARV. Em 2008, isto representa um aumento de 36% no acesso ao tratamento ARV em um ano. Nos países de alta renda estima-se que 700.000 pessoas receberam o tratamento. Apesar do considerável progresso, a cobertura global permanece baixa: apenas 42% dos que necessitam de tratamento ARV tiveram acesso a ele (UNAIDS 2009).

No Brasil, a Lei Federal nº 9.313, de 13 de novembro de 1996, garante o acesso universal e gratuito ao tratamento ARV a todos os pacientes para os quais eles são indicados. Ao longo do tempo, foi também estruturado no país, o acesso da população aos exames de monitoramento laboratorial da infecção pelo HIV (carga viral e contagem de CD4), bem como aos insumos e ações de prevenção (MS 2010b).

### 1.8.1. ESQUEMA TERAPÊUTICO INICIAL PARA O TRATAMENTO DA INFECÇÃO PELO HIV-1

A definição do momento ideal para a introdução da terapia ARV é importante para a clínica do paciente. Os benefícios potenciais da terapia ARV devem ser comparados com possíveis efeitos adversos destas drogas, decorrentes da introdução precoce do tratamento, incluindo o desenvolvimento de distúrbios metabólicos, cardiovasculares e emergência de vírus resistentes às drogas, com consequente esgotamento das opções terapêuticas remanescentes (Palella et al. 2003).

De acordo com o Suplemento II das Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV: 2008, (Critérios para Início do Tratamento Antirretroviral - Atualização das páginas 34-36), publicado em fevereiro de 2010, o Comitê Assessor para Terapia Antirretroviral fez uma revisão estruturada das recomendações para atualização dos critérios de início do tratamento, tornando-o mais precoce, sobretudo para determinados grupos de indivíduos. Nos últimos anos, tem-se tentado defini-las a partir de estimativas de risco de infecções oportunistas, evolução para aids e óbito por condições associadas à infecção pelo HIV e aids. Algumas condições clínicas não relacionadas à aids devem ser consideradas na definição do risco de progressão da infecção. Em paciente assintomático e com contagens elevadas de células T CD4<sup>+</sup>, a replicação viral e a ativação imune crônica têm sido associadas ao desenvolvimento de doenças não tradicionalmente relacionadas à infecção pelo HIV, tais como eventos cardiovasculares e neoplasias (Hammer et al. 2008, Bedimo et al. 2009). Tais evidências justificam o estabelecimento de novos critérios para início do tratamento ARV.

Portanto, algumas condições que não são definidoras de aids, são mais frequentes nos indivíduos infectados pelo HIV, e representam pior prognóstico devido à infecção ativa e/ou são consequências diretas da replicação viral. Tais condições clínicas podem potencialmente ser beneficiadas pela TARV. Entretanto, os riscos de toxicidade, baixa adesão e emergência de resistência em longo prazo não podem ser descartados (MS 2010b).

De acordo com esses parâmetros, atualmente no Brasil, recomenda-se iniciar TARV para pacientes (MS 2010b):

- Sintomáticos, independentemente da contagem de CD4<sup>+</sup> e em algumas situações clínicas não definidoras de aids, tais como sintomas potencialmente relacionados

à infecção do HIV, candidíase oral, púrpura trombocitopênica idiopática, alterações cognitivas (mesmo menores) e tuberculose ativa, entre outras;

- Assintomáticos com contagem de CD4<sup>+</sup> menor ou igual a 350 células/mm<sup>3</sup>;
- Gestantes, independente da presença de sintomas e da contagem de células T-CD4<sup>+</sup>;
- Para pacientes com contagem de CD4<sup>+</sup> entre 350 e 500 células/mm<sup>3</sup>, na presença das seguintes condições:
  1. Coinfecção pelo vírus da hepatite B;
  2. Coinfecção pelo vírus da hepatite C;
  3. Idade igual ou superior a 55 anos;
  4. Doença cardiovascular estabelecida ou com risco elevado (acima de 20%, segundo escore de Framingham);
  5. Nefropatia secundária ao HIV;
  6. Neoplasias, incluindo as não definidoras de aids;
  7. Carga viral elevada, superior a 100.000 cópias.

Atualmente, em nosso país, estão disponíveis cinco classes de ARVs: Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INTR), Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa (INNTR), Inibidores da Protease (IP), Inibidores de Entrada e Inibidores da Integrase.

Esquemas preferenciais para a terapia inicial devem incluir combinações de três drogas: dois INTR associados a um INNTR. Esquema alternativo deve conter dois INTR associados a um IP reforçado com ritonavir (IP/r) (MS 2008).

A associação zidovudina / lamivudina (AZT/3TC) é a dupla de INTR de primeira escolha para compor o esquema antirretroviral inicial. Nos casos de intolerância ao AZT, a didanosina entérica (ddI) ou o tenofovir (TDF) podem ser drogas alternativas para substituí-lo, sempre combinados com a 3TC (MS 2008).

Quanto à escolha dos INNTR, o efavirenz (EFZ) continua sendo preferencial à nevirapina (NVP), exceto em gestantes. Essa opção está fundamentada na sua elevada potência de supressão viral, na comprovada eficácia em longo prazo e no menor risco de efeitos adversos sérios (MS 2008).

A combinação de IP com ritonavir (r) como adjuvante farmacológico apresenta várias vantagens, entre elas: proporcionar níveis sanguíneos do IP mais elevados, estáveis e por tempo mais prolongado com menor risco de mutações que conferem resistência viral. Caso a escolha da terapia inicial envolva um esquema composto por

um IP, o lopinavir/r (LPV/r) deve ser o IP/r preferencial. A associação atazanavir/r (ATV/r) é considerada a combinação de inibidores da protease alternativa (MS 2008).

### **1.8.2. FALHA NA ADESÃO AO TRATAMENTO ANTIRRETROVIRAL**

Após a instituição do tratamento ARV, basicamente três parâmetros sinalizam falha ou sucesso terapêutico: a evolução da carga viral, a contagem de células T CD4<sup>+</sup> e a ocorrência de eventos clínicos.

A falha virológica é definida por não-obtenção ou não-manutenção da carga viral indetectável. Caracteriza-se por carga viral confirmada acima de 400cópias/mL após 24 semanas ou acima de 50cópias/mL após 48 semanas de tratamento (Gallant 2007). A falha imunológica é caracterizada pelo declínio progressivo da contagem de células T CD4<sup>+</sup>. Portanto, frente a reduções maiores que 25% na contagem de células T CD4<sup>+</sup> suspeita-se de falha imunológica (Turner et al. 1994). Já a falha clínica é caracterizada pela progressão clínica da infecção expressa principalmente por meio de infecções ou tumores oportunistas. No entanto, na ausência de falha virológica, a ocorrência de doenças oportunistas não indica falha do tratamento ARV, mas reflete, na maioria dos casos, reconstituição imune parcial e insuficiente (MS 2008).

A falha virológica pode ter impacto imunológico e clínico devido à viremia persistente, aumentando o risco de progressão da doença, além de levar a emergência de mutações que podem conferir resistência viral a drogas, o que, por sua vez, diminui as opções terapêuticas posteriores. A manutenção dos ARVs na presença de carga viral detectável pode levar ao acúmulo de mutações de resistência. Quanto mais elevada a carga viral na presença da medicação, maior a chance de seleção de novas mutações de resistência (Gallant 2007).

### **1.8.3. TESTE DE GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS E TERAPIA DE RESGATE**

A identificação de falha terapêutica determina a realização do teste de genotipagem que orienta a troca do esquema o mais precocemente possível (MS 2008). Estudos sobre a utilidade do teste de genotipagem para detecção de resistência do HIV-

l aos medicamentos antirretrovirais apontam benefício quando o teste é utilizado para auxiliar na escolha de um esquema de resgate. Nesses estudos, comparou-se a magnitude da queda da carga viral ou porcentagem de pacientes com carga viral indetectável após instituição de um esquema de resgate montado sem e com auxílio da genotipagem, e o desempenho dos esquemas baseados no teste foi superior (Durant et al. 1999, Tural et al. 2002).

O exame de genotipagem detecta a presença de mutações nas cepas majoritárias do HIV que estão relacionadas à resistência a cada um dos medicamentos ARVs. A genotipagem é indicada em casos de falência terapêutica na vigência de tratamento regular, com níveis plasmáticos de HIV acima de 5.000cópias/mL. O laudo da genotipagem serve para subsidiar a composição de esquemas terapêuticos alternativos (Brasil 2010c).

Na prática clínica, segundo o Ministério da Saúde (2008), o teste de genotipagem para detecção de resistência às drogas apresenta várias aplicações, entre elas a troca de esquemas ARVs com resistência identificada, ao invés de resistência presumida; propicia o uso de drogas ativas por períodos mais prolongados; evita trocas desnecessárias de antirretrovirais; evita toxicidade desnecessária de drogas inativas; e economiza custos relacionados a trocas de drogas (MS 2008).

O manejo do resgate antirretroviral permanece em constante modificação. Distintamente do que ocorre em relação à terapia inicial, são poucas as recomendações consensuais específicas principalmente devido à inexistência de ensaios clínicos randomizados que comparam diferentes estratégias de resgate em um grande número de pacientes. Algumas recomendações para orientar na escolha dos esquemas de resgate, não são regras, já que o grupo de pacientes em falha terapêutica é bastante heterogêneo em relação a causas de falha, número e tipo de esquemas antirretrovirais prévios, prevalência de mutações de resistência, opções de drogas ativas, limites e possibilidades do novo esquema (MS 2008).

Os últimos medicamentos introduzidos no Brasil foram enfuvirtida (2005), darunavir (2008) e raltegravir (2009). Cerca de cinco mil pacientes são considerados multiexperimentados em TARV e utilizam algum dos antirretrovirais considerados de reserva. A introdução do darunavir e da nova classe de inibidores da integrase (o raltegravir) acarretou intenso crescimento de prescrições em curto período de tempo. Os critérios de indicação dos novos ARVs no Brasil incluem a experimentação e falha com as três classes clássicas de ARVs: INTR, INNTR e IP (MS 2010a).

## 1.9. RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS

A duração eficaz da TARV relaciona-se a diversos fatores como: potência do esquema antirretroviral utilizado, comodidade posológica, efeitos colaterais, adesão do paciente ao tratamento, alterações na biodisponibilidade e metabolismo dos medicamentos, com destaque para variações na absorção e interações medicamentosas e pela penetração insuficiente de alguns medicamentos nos reservatórios virais (Dressers et al. 2000, Rabound et al. 2002).

O principal fator responsável pelo surgimento de resistência se refere à adesão insuficiente. O aparecimento de cepas resistentes aos antirretrovirais ocorre devido à supressão viral incompleta, portanto, está diretamente relacionado às altas taxas de replicação viral, aliada à ausência de mecanismos eficientes de auto-correção da TR viral, que possibilita a ocorrência de milhares de mutações virais. A pressão seletiva criada pela TARV seleciona cepas variantes que, por acúmulo de mutações, apresentam melhor *fitness* (maior capacidade replicativa em um dado meio) e passam a predominar, determinando a falha terapêutica (Shafer 2002).

A resistência aos ARVs subdivide-se em primária e secundária. Define-se como resistência primária a presença de mutações que conferem resistência aos antirretrovirais presentes no genoma viral em pacientes virgens de TARV. Pode ocorrer por dois mecanismos distintos: (1) em indivíduos cronicamente infectados em decorrência da geração espontânea e fixação de vírus mutantes resistentes, devido ao alto índice replicativo do HIV-1 aliado à ausência de mecanismos de correção da TR; (2) pela transmissão de cepas resistentes, provenientes de um indivíduo já exposto aos antirretrovirais (resistência transmitida). A resistência primária pode provocar impacto na resposta ao primeiro esquema antirretroviral (Kozal et al. 2004). A resistência viral secundária é a emergência de mutações de resistência aos antirretrovirais em decorrência da pressão seletiva exercida pela medicação ARV (Hirsch et al. 2008).

As mutações associadas à resistência aos ARVs podem ser classificadas como principais e acessórias. As mutações principais são aquelas capazes de conferir elevado nível de resistência a uma ou várias drogas de uma determinada classe. Já as mutações acessórias não conferem níveis significativos de resistência às drogas quando presentes isoladamente. No entanto, as mutações acessórias quando presentes em grupos, acompanhando mutações principais específicas, podem compensar a perda do *fitness*



que estas geralmente impõem ao vírus ou podem conferir algum grau de resistência aos inibidores, levando à diminuição da susceptibilidade viral (Nijhuis et al. 1998).

A resistência viral é determinada por mutações na sequência de nucleotídeos do material genético viral em relação às sequências de nucleotídeos de uma cepa selvagem padrão (Johnson et al. 2009). A cepa de referência mais comumente utilizada é a HXB2, que é um vírus selvagem do subtipo B do HIV-1. As mutações de resistência aos ARVs são designadas usando-se o formato letra-número-letra, sendo que a primeira letra representa o aminoácido selvagem codificado por uma trinca de nucleotídeos e a segunda o aminoácido mutante, enquanto o número indica a posição ocupada pelo aminoácido na proteína em questão. Por exemplo, a designação M184V, indica que a metionina da posição 184 da TR no vírus selvagem foi substituída pela valina no vírus resistente. Devido à redundância do código genético, diferentes trinca de nucleotídeos podem codificar um mesmo aminoácido, configurando as mutações silenciosas (Shafer 2002).

### **1.9.1. RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS**

O surgimento de resistência do HIV-1 aos medicamentos antirretrovirais representa um desafio para a prevenção da progressão da doença, e inclui também o risco da transmissão de vírus resistentes para outras pessoas. A transmissão de vírus com mutações de resistência é denominada resistência primária. Assim, programas para monitorar a prevalência de resistência primária em diferentes regiões são extremamente importantes para subsidiar os manuais de tratamento ARV, indicar o nível de sua eficiência e orientar os programas de prevenção do HIV-1 (Shafer & Schapiro 2008).

Estudos em países desenvolvidos indicam que a resistência primária apresenta um obstáculo à estratégia antirretroviral inicial (Johnson et al. 2007). Desta forma, a maioria das diretrizes para tratamento antirretroviral de países desenvolvidos preconiza o uso da genotipagem antes mesmo do primeiro esquema terapêutico. Com o aumento do acesso aos medicamentos antirretrovirais nos países em desenvolvimento, muitos dos problemas que são comuns nos países desenvolvidos, também começaram a ocorrer nesses países. Apesar dos testes de resistência ainda não terem uma utilização ampla nesses locais, devido ao alto custo, estes deverão ser amplamente empregados pela

necessidade de testes para determinar a terapia antirretroviral mais adequada (Tural et al. 2002).

Assim, a transmissão do HIV-1 resistente aos medicamentos tem sido observada na maioria dos países onde o tratamento antirretroviral está disponível e põe em risco o sucesso da TARV inicial. A prevalência da transmissão destas cepas resistentes varia muito com a localização, grupo de risco de transmissão, e o tempo de amostragem após infecção (Little et al. 2002, Wensing et al. 2005, Shet et al. 2006, Yerly et al. 2007). A persistência, em longo prazo, das mutações de resistência primária na ausência da pressão seletiva de drogas tem sido documentada (Barbour et al. 2004, Little et al. 2008).

O maior aumento da resistência primária global, de 13,2% no período de 1995-1998 para 24,1% no período de 2003-2004, foi relatado em Nova York, e a taxa de transmissão de multirresistência teve um aumento de 2,6% para 9,8% no mesmo período (Shet et al. 2006). Estudo de vigilância representativo de 10 anos de transmissão (1996-2005) realizado na Suíça mostrou taxas consideravelmente mais baixas: 7,7% para qualquer classe de droga, 5,5% para INTRs, 1,9% para INNTRs e 2,7% para o IPs. Resistência a duas ou três classes de drogas foi observada em apenas 2% dos pacientes (Yerly et al. 2007). Estes exemplos demonstram que cada país ou região necessita de seu próprio sistema de vigilância para monitorar a prevalência de transmissão do HIV-1 resistente às drogas.

Vários estudos independentes realizados no Brasil que analisaram as populações de indivíduos virgens de tratamento selecionados com infecção recente ou crônica mostraram taxas de resistência variando de baixa a moderada (Brindeiro et al. 2003, Cerqueira et al. 2004, Eyer-Silva & Morgado 2005, Medeiros et al. 2006, Cardoso et al. 2009, Inocencio et al. 2009). Entretanto dois estudos apontaram taxas preocupantes nas cidades portuárias de Santos (36%) (Sucupira et al. 2007) e Salvador (22%) (Pedroso et al. 2007). Quando comparados com valores reportados nos países industrializados, estes números são relativamente diferentes, pois a prevalência da transmissão do vírus resistente a um ou mais agentes ARVs é mais alta e, é relatada desde 1993. Por exemplo, pesquisas realizadas em países desenvolvidos no final da década de 90 mostraram taxas de prevalência de resistência primária de 10% a 17% na França, 13% na Alemanha, 14% no Reino Unido, 15% a 26% na América do Norte, e 23% a 26% na Espanha (Chaix et al. 1999, Puig et al. 2000, Briones et al. 2001, Duwe et al. 2001, Little et al. 2001, UK et al. 2001, Zaidi et al. 2001). Um contraste para este quadro é a

baixa prevalência de mutações de resistência primária às drogas na América do Sul e no Caribe (<4%) (Cesaire et al. 1999, Delgado et al. 2001, Kijak et al. 2001).

Dados recentemente publicados no projeto da Rede Nacional de Isolamento e Caracterização do HIV (RENIC), realizado entre 2007 e 2008 em grandes municípios (São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Brasília e Belém), mostraram que a prevalência da resistência transmitida em pessoas recém diagnosticadas com infecção pelo HIV-1 é 8,1% no total: prevalência baixa (< 5%) em Salvador e Porto Alegre; intermediária (entre 5-15%) no Rio de Janeiro, São Paulo, Brasília e Belém (Inocencio et al. 2009). Comparados com os resultados de um estudo realizado em 2003, a prevalência permanece estável (6,6% em 2002 versus. 8,1% em 2007-2008), mas com tendência ao aumento da resistência aos INNTR (0,24% em 2002 versus. 3,3% em 2007-2008;  $p < 0,001$ ) (Brindeiro et al. 2003, Inocencio et al. 2009).

Resultados de outro estudo, realizado em oito estados brasileiros, mostrou que 5,7% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 que nunca tinham recebido a terapia antirretroviral apresentavam vírus com uma ou mais mutações relacionadas à resistência. Além disso, indivíduos que relataram o uso de medicamentos ARVs pelos seus parceiros tiveram um risco 2,5 vezes maior de apresentar as variantes do HIV-1 com mutações de resistência às principais drogas, sugerindo que estes vírus podem ter sido transmitidos diretamente por seus parceiros em tratamento (Sprinz et al. 2009). Esta indicação sugere que uma proporção de indivíduos infectados pelo HIV-1 recebendo medicação antirretroviral apresenta comportamento de risco (Kozal et al. 2004, Sprinz et al. 2009). Além disso, a grande maioria dos indivíduos portadores de cepas do HIV-1 resistentes aos medicamentos foi infectada com o subtipo B (91%) versus 9% de indivíduos com vírus não-B. O HIV-1 do subtipo B é o subtipo predominante no Brasil e a diferença na prevalência da resistência de acordo com o subtipo do vírus provavelmente reflete o período durante o qual o vírus do subtipo B foi exposto aos antirretrovirais (Sprinz et al. 2009).

Uma maior prevalência de mutações de resistência associadas com INNTR tem sido relatada, o que pode refletir o uso extensivo de esquemas com INNTR em comparação com os regimes baseados em IP. Um maior nível de resistência a INNTR na população em geral pode também ser devido ao fato de que apenas um ponto de mutação é suficiente para conferir resistência a esta classe de drogas. As mutações INNTR têm demonstrado impacto modesto no *fitness* viral, e estudos têm encontrado

uma alta persistência dessas mutações em indivíduos virgens de tratamento (Gianotti et al. 2005, Sprinz et al. 2009).

O Ministério da Saúde tem patrocinando uma política de acesso universal a medicamentos antirretrovirais para pacientes com aids desde 1996. No ano de 2009, o Brasil tinha cerca de 200.000 doentes em uso de ARV no Sistema Único de Saúde (SUS). Dentro deste programa, o Ministério da Saúde tem adotado periodicamente diretrizes para o tratamento ARV, para facilitar a prescrição adequada e uniforme em todo o país, bem como garantir uma abordagem mais racional e logística do uso destas drogas no SUS (MS 2010a). Doentes com falha virológica relacionada às cepas resistentes aos medicamentos podem ser uma fonte de transmissão de variantes resistentes para os indivíduos recém-infectados. Assim, a seleção destas variantes resistentes aos medicamentos é uma importante questão de saúde pública que pode colocar em risco os esforços no controle da mortalidade por aids através da TARV. Desta forma, as variantes virais resistentes aos ARVs podem ser transmitidas e iniciar uma epidemia de HIV-1 resistente às drogas nos países onde a HAART é generalizada (Boden et al. 1999).

A prevalência de resistência primária no Brasil está sendo notificada por estudos baseados principalmente nos grandes centros urbanos e pouco se sabe sobre a prevalência de cepas resistentes em pequenos municípios brasileiros e áreas rurais, assim como em estados do interior do país (Szwarcwald et al. 2000, Eyer-Silva & Morgado 2005). À medida que a epidemia se espalha a partir dos grandes centros urbanos para pequenos municípios e regiões isoladas, aumenta a necessidade de estudar as características clínicas, epidemiológicas e virológicas da infecção pelo HIV-1 nestas áreas (Szwarcwald et al. 2000). Os resultados destes estudos podem contribuir para aperfeiçoar a instituição de medidas de controle adequadas, levando em conta a verdadeira magnitude do problema, melhorando o reconhecimento clínico e gestão da infecção pelo HIV-1, assim como os recursos locais.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

Em todos os países onde pacientes infectados pelo HIV-1 têm acesso à HAART observou-se uma redução acentuada na morbidade e mortalidade e recuperação funcional do sistema imunológico. Porém o surgimento de mutações de resistência aos ARVs é uma das principais causas de falha do tratamento e tem sido associado com maior taxa de mortalidade. A incidência, prevalência e transmissão de vírus resistentes aos medicamentos ARVs variam de país para país, e até mesmo dentro de uma nação. Desta forma, a prevalência de mutações de resistência aos medicamentos ARVs é importante tema de saúde pública que permite otimizar a escolha do esquema terapêutico.

O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a oferecer acesso universal e gratuito aos medicamentos ARVs a pacientes infectados pelo HIV-1 que preenchem critérios definidos pelo comitê assessor do Ministério da Saúde. No entanto, existem poucos dados sobre transmissão de vírus resistentes em pacientes virgens de tratamento de pequenos centros urbanos no interior do país. Assim, o conhecimento das taxas de prevalência de resistência primária e do padrão de mutações é importante para se avaliar a utilidade e custo-benefício dos testes de genotipagem para resistência antes do início da terapia.

Diversos estudos descreveram a epidemiologia molecular do HIV-1 em pacientes de grandes centros urbanos principalmente das regiões Sul e Sudeste. No entanto, há uma lacuna de informação na literatura sobre subtipos do HIV-1 que circulam em outras regiões do país. A epidemia de aids no Brasil se disseminou de grandes centros urbanos para pequenos municípios no interior do país e os estudos publicados não têm acompanhado esta tendência de interiorização da epidemia.

O conhecimento dos subtipos genéticos do HIV-1 circulando em pequenos centros urbanos contribui para o mapeamento molecular do HIV-1 no país. No vasto território brasileiro, diferentes padrões de distribuição de subtipos do HIV-1 têm sido relatados entre as suas cinco regiões geográficas. A diversidade genética do HIV-1 e a presença de genomas recombinantes descritos refletem a complexidade da epidemia no país.

A região Norte compreende a região de maior extensão territorial e a menos povoada no Brasil, apresentando 4,2% dos casos notificados de HIV-1. Este é o primeiro estudo sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 realizado em pacientes do

Tocantins, o mais novo dos 26 estados do Brasil, criado em 1989 a partir da divisão do estado de Goiás. Dentre os estados do Brasil, Tocantins apresenta uma das menores taxa de incidência de HIV-1, com aproximadamente 13,3 casos por 100 mil habitantes. Desta forma, o presente estudo visa contribuir para o conhecimento da prevalência e do perfil de mutações relacionadas à resistência primária aos ARVs. Além disso, este estudo visa caracterizar a diversidade genética do HIV-1 em pacientes virgens de tratamento no estado do Tocantins.

## **3. OBJETIVOS**

---

### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Este estudo tem como objetivo geral investigar mutações de resistência primária aos ARVs e identificar os subtipos genéticos do HIV-1 em pacientes HIV+/aids virgens de tratamento do estado do Tocantins.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar a prevalência de mutações associadas à resistência primária em pacientes naive do estado do Tocantins;
2. Identificar o perfil das mutações associadas à resistência primária;
3. Identificar os subtipos genéticos do HIV-1 nas sequências dos genes da PR e TR na população de estudo;
4. Caracterizar HIV-1 recombinantes intersubtipo;
5. Estudar a filogenia dos isolados sequenciados na região *pol*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 4.1. GRUPO DE ESTUDO

Participaram deste estudo 52 pacientes HIV+/aids virgens de tratamento, com infecção recente ou crônica, recrutados durante o período de 2008 a 2010 no Laboratório Central do Tocantins (LACEN / TO – laboratório de referência na avaliação da contagem de CD4 e carga viral), localizado na cidade de Palmas, capital do estado do Tocantins. Após concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2), os participantes responderam a um questionário padronizado (Anexo 3), através do qual foram obtidos dados sócio-demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Os valores da carga viral plasmática e CD4 foram obtidos através dos prontuários (carga viral: *branched-chain* DNA - bDNA, SIEMENS; e CD4: FACSCalibur, Becton Dickison).

Após a entrevista, foram coletados aproximadamente 5mL de sangue venoso periférico em tubos com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (vacutainer-EDTA, Becton-Dickinson, San José, CA, USA) e o plasma foi separado por centrifugação. As amostras de sangue total e de plasma foram aliqüotadas e enviadas sob refrigeração ao Laboratório de Imunologia da Aids e Hanseníase, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, onde foram estocadas à temperatura de -80 °C até o processamento.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana e Animal (HAA/HDT/SUS, CEPMHA/HC/UFG protocolo 073/05) (Anexo 4), e foi financiado pelo Programa Nacional DST/AIDS do Ministério da Saúde/UNESCO (Grant # 310-06) (Anexo 5) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Os resultados dos testes de genotipagem para resistência primária do HIV-1 aos ARVs foram disponibilizados aos médicos responsáveis e/ou pacientes.



## **4.2. EXTRAÇÃO DO RNA GENÔMICO**

A extração do RNA foi realizada através do kit de extração QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Resumidamente, foram empregados 140µL de amostra de plasma, 5,6µL da enzima carrier-RNA e 560µL do tampão de lise, seguido por 10 minutos de incubação a temperatura ambiente (15-25°C). As partículas virais circulantes foram lisadas e o RNA viral precipitado com 560µL de etanol absoluto (Merck). Durante uma rápida centrifugação (8000 rotações por minuto – rpm, por um minuto), o RNA foi adsorvido a uma membrana de sílica. Seguiram-se duas etapas rápidas de centrifugação com um volume de 500µL 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 membrana de sílica foi realizada por uma rápida centrifugação em 60µL de tampão de eluição e os produtos de extração foram armazenados à -80°C.

## **4.3. SÍNTESE DO DNA COMPLEMENTAR ATRAVÉS DA RETRO-TRANSCRIÇÃO DO RNA**

A transcrição reversa do RNA para obtenção do DNA complementar (cDNA) foi realizada através do kit de transcrição reversa do RNA (Invitrogen). Resumidamente, em 10µL de RNA extraído ( $\leq 1\mu\text{g}$ ), adicionou-se 1µL de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (mistura de dNTPs constituída por dATP desoxiAdenina trifosfatada; dCTP desoxiCitosina trifosfatada; dTTP desoxiTimina trifosfatada e dGTP desoxiGuanina trifosfatada) (10mM) e 1µL de primer randômico (150ng/µL) seguindo-se incubação de cinco minutos a 65°C e depois, choque térmico em gelo por um minuto. Em seguida foi adicionado 1µL da enzima super script III RT (200U/µL), 4µL de tampão 5x, 1µL do agente redutor ditioneitol (DTT a 0,1 M), 1µL da enzima RNase out (40U/mL) e 1µL de água ultra pura (Gibco). A reação de retrotranscrição foi realizada em termociclador com o período de ciclagem de 25°C por 5 minutos, 50°C por 60 minutos, seguida de inativação da reação a 70°C por 15 minutos. As amostras de cDNA foram armazenadas à -80°C.

#### 4.4. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (NESTED-PCR)

Duas regiões diferentes do gene *pol*, em um único fragmento, foram alvos de amplificação por nested-PCR: o gene completo da PR (nucleotídeos 2253-2549, relativo a sequência referência HXB2, número de acesso ao GenBank, K03455) e o fragmento de 750pb (pares de base) do gene da TR (HXB2, 2550-3299).

Para a primeira etapa da nested-PCR do gene *pol* (HXB2, 2147-3338) utilizou-se tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> a 50mM (Invitrogen), dNTP a 25mM (Invitrogen), primers externos Kozal-1 e Kozal-2 a 10pmol/μL cada (Gibco) (Kozal et al. 1996), Taq DNA polimerase a 5U/μL (Invitrogen), 5μL do cDNA obtido por RT-PCR e água ultra pura (Gibco) quantidade suficiente para (qsp.) 50μL, gerando um produto de amplicon de 1192pb (Quadro 2).

Para a segunda etapa da nested-PCR do gene *pol* (HXB2, 2197-3321) foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl<sub>2</sub> a 50mM (Invitrogen), dNTP a 25mM (Invitrogen), primers internos DP10 e Frenkel-2 a 10pmol/μL cada (Gibco) (Frenkel 1995), Taq DNA polimerase a 5U/μL (Invitrogen), 5μL do produto da primeira etapa da nested-PCR e água ultra pura (Gibco) qsp 100μL, gerando um produto de amplicon de 1125pb (Quadro 2).

<b>Quadro 2: Reação de Nested-PCR</b>		
<b>Nested-PCR</b>	<b>1ª Etapa</b>	<b>2ª Etapa</b>
H <sub>2</sub> O Ultra Pura	33,45μL	71,9μL
Tampão de PCR 10x	5μL	10μL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	3,5μL	7μL
Mistura de dNTP 25mM	0,8μL	1,6μL
Primer K1 10pmoles/μL	1μL	2μL
Primer K2 10pmoles/μL	1μL	2μL
Taq 5U/μL	0,25μL	0,5μL
Amostra de cDNA	5μl	
Produto da 1ª Etapa		5μl
Volume total	50μL	100μL

O Quadro 3 contém as informações sobre as sequências de nucleotídeos dos primers utilizados na nested-PCR (K1, K2, DP10 e F2).

As duas reações de amplificação por nested-PCR foram realizadas em termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e extensão final de 72°C por 10 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

#### 4.5. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos da amplificação (fragmento de 1125pb do gene *pol* obtido por nested-PCR) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Gibco) em presença de brometo de etídio 0,005% (30µL de brometo de etídio/1L de tampão Tris-Acetato-EDTA [TAE] 1x, Gibco). Uma mistura contendo 4µL de produto de amplicon e 1µL de azul de bromofenol puro (Gibco) foi aplicada no gel e paralelamente 4µL de uma mistura de padrão de peso molecular (100pb Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e 1µL de azul de bromofenol puro (Gibco). Este marcador de peso molecular consiste em uma mistura de fragmentos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100pb contendo 200, 120, 80, 40, 20, e 10ng 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 uma hora a 100V e 400mA. O gel foi analisado sob luz ultravioleta 310nm de comprimento de onda para visualização de fragmentos de DNA de tamanho esperado (1125pb) (Figura 5).



**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose do produto de 1125pb obtido através da amplificação pela nested-PCR (2ª Etapa), analisado sob luz ultravioleta. M: peso molecular; C+: controle positivo; C-: controle negativo; 1 a 7: amostras de sete pacientes.

#### **4.6. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO OBTIDO ATRAVÉS DA NESTED – PCR**

Os produtos amplificados da segunda etapa da nested-PCR foram purificados empregando-se o kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme protocolo do fabricante. Neste, 96µL do produto amplificado da segunda etapa da nested-PCR foram adicionados a 480µL de tampão com alta concentração de sais caotrópicos que modificam a estrutura da água e permitem pH (potencial hidrogeniônico) ótimo para ligação eficiente de produtos de PCR de dupla fita e ainda é removedor de primers, sais, enzimas e nucleotídeos não incorporados. Mediante uma etapa rápida de centrifugação (13000rpm por um minuto), o produto de PCR foi adsorvido a uma membrana de sílica. Seguiu-se uma etapa rápida de centrifugação com um volume de 750µL 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 50µL de tampão de eluição que provoca a redução do pH e da concentração de sais, seguida por uma incubação de um minuto a temperatura ambiente e uma etapa rápida de centrifugação. As amostras de produto de PCR purificadas foram armazenadas à -20°C.

#### **4.7. SEQUENCIAMENTO AUTOMATIZADO DO GENE *POL***

Os produtos de PCR purificados do gene *pol* foram submetidos ao sequenciamento automatizado utilizando o kit BigDye Terminator (Applied Biosystems). Em placas de 96 poços (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) foram adicionados 2µL de produto de PCR purificado, 3µL de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA), 4µL de cada um dos oito primers separadamente a 1,5pmol/µL (Gibco) (DP10, DP11, DP16, DP17, RT9, RT1, F2 e F3 – Quadro 3), 1µL de BigDye Terminator (Applied Biosystems) e 5µL de água ultra pura (Gibco). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems Inc,

Foster City, CA, USA) com o seguinte programa de ciclagem: 25 ciclos de 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

<b>Quadro 3:</b> Sequência dos primers 5' → 3' empregados para amplificação e sequenciamento do gene <i>pol</i> do HIV-1			
<b>Nome dos Primers</b>	<b>Sequência 5' → 3'</b>	<b>Localização HXB2*</b>	<b>Comprimento (pb)</b>
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	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	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 à sequência referência do HIV-1 (HXB2 nº de acesso no GeneBank K03455).

O produto sequenciado foi submetido à precipitação com isopropanol e etanol para purificação do material. Foi adicionado à placa contendo amostras já sequenciadas 60µL de isopropanol 65% (Merck). A placa foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e depois incubada por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Seguiu-se uma centrifugação de 45 minutos a 2000g (força centrífuga relativa à gravidade). Após esse período o sobrenadante foi descartado por inversão da placa em papel absorvente por dois minutos. Adicionou-se 250µL de etanol 60% (Merck) que foi centrifugado por 10 minutos a 2000g. Novamente o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 100µL de etanol 60% (Merck) seguido de centrifugação por 10 minutos a 2000g. Descartou-se o sobrenadante e a placa invertida foi centrifugada por um minuto a 500rpm para sua completa secagem. As amostras foram ressuspensas em 10µL 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 dois minutos a 95°C e

choque térmico em gelo por dois minutos. A leitura da reação foi feita em sequenciador automático (ABI PRISM<sup>®</sup> 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) que realiza uma corrida eletroforética e lê a fluorescência, e o sinal é transformado em eletroferogramas.

#### **4.8. ANÁLISE DOS CROMATOGRAMAS**

Após a obtenção dos cromatogramas, as sequências foram editadas manualmente por comparação de complementaridade dos contigs e alinhadas com a sequência de referência HXB2 através do programa *Staden Package* (<http://staden.sourceforge.net/>), para verificar e corrigir possíveis erros no alinhamento das sequências.

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 Tool* (<http://www.sanbi.ac.za>), que testa as sequências quanto a possível existência de contaminações usando BLAST (comparação) com um banco de dados público no GenBank de aproximadamente 200.000 sequências publicadas do HIV-1 e um BLAST com o banco de dados interno do laboratório e também, foi realizada a inspeção visual do alinhamento utilizando o Bioedit (Hall 1999).

#### **4.9. ANÁLISE GENÉTICA DO HIV-1**

A presença de mutações relacionadas à resistência aos ARVs foi avaliada empregando-se a ferramenta de bioinformática Calibração da População com Resistência (CPR), do programa da Universidade de Stanford (*Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation* – SDRM - <http://hivdb.stanford.edu>), que define as mutações a partir de diferenças da sequência consenso do subtipo B do HIV-1 (Gifford et al. 2009). Mediante análise de similaridade genética, as mutações virais nas sequências de nucleotídeos foram interpretadas e indicam o perfil de resistência as drogas ARV (suscetível, potencial de baixo nível, baixo nível, intermediário e alto nível de resistência) (Acesso: Dezembro/2010).

Para a definição dos subtipos genéticos do HIV-1, as sequências obtidas foram submetidas ao programa de subtipagem REGA HIV-1 (versão 2.0 disponível no site <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html>) e também por inferência filogenética (Oliveira et al. 2005). As sequências virais recombinantes intersubtipo foram analisadas no programa SIMPLOT versão 3.5.1 (Lole et al. 1999).

A inferência filogenética foi realizada através do alinhamento das sequências de estudo com sequências referências representativas dos diversos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1 obtidas no banco de dados do Los Alamos HIV Database ([http://hiv\\_web.lanl.gov](http://hiv_web.lanl.gov)). O alinhamento das sequências em formato FASTA foi realizado utilizando-se o programa Clustal X e ajustadas no programa BioEdit (<http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>) e, em seguida foram editadas manualmente (Hall 1999). A árvore filogenética foi construída empregando-se o método de Neighbor-Joining (NJ) e modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com valor de suporte (*bootstrap*) de 1000 replicatas no programa MEGA versão 4.0 obtido através do site [http://www.megasoftware.net/fixed\\_bugs.html](http://www.megasoftware.net/fixed_bugs.html). Os valores de *bootstrap* acima de 70% foram considerados significativos. A sequência do vírus da imunodeficiência símia do chimpanzé (SIVcpz) foi utilizada como grupo externo.

#### **4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O banco de dados contendo todas as informações de cada paciente deste estudo foi depositado no programa “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) para Windows versão 13.0 (Chicago, IL, USA), onde também foram realizados os cálculos de frequência, mediana para as principais variáveis obtidas e Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Cinquenta e dois pacientes infectados pelo HIV-1 virgens de tratamento recrutados no LACEN de Palmas/Tocantins foram incluídos no estudo de genotipagem para resistência primária do HIV-1 e subtipos genéticos. A maioria dos pacientes (59,6%; 31/52) era do sexo masculino e a mediana de idade foi de 30 anos (variação 14 a 65 anos). A categoria de exposição heterossexual representou 73,1% (38/52) dos casos, seguida por 17,3% (09/52) de homens que fazem sexo com homens (HSH), 3,9% (02/52) de transfusão sanguínea, um caso referindo acidente de trabalho, um usuário de drogas injetáveis (UDI) e um caso de transmissão vertical. Um dos pacientes pertencia a Tribo Karajá, 19 pacientes eram da cidade de Palmas e os demais pacientes eram provenientes de cidades do interior do estado do Tocantins. A mediana da contagem de células CD4<sup>+</sup> foi de 380 células/μL (variação 25-1.082 células/μL) e 47,1% (24/51) dos pacientes apresentavam contagem de CD4 menor que 350 células/μL. Portanto, baseando-se no critério de contagem de células CD4<sup>+</sup> em torno da metade dos pacientes já tinha indicação para início da TARV. A maioria dos pacientes (48%; 24/50) teve carga viral plasmática entre 10.000 e 100.000 cópias/mL, 24% (12/50) possuíam carga viral abaixo de 10.000 cópias/mL e 28% (14/50) tinham carga viral acima de 100.000 cópias/mL (Tabela 1). Para 39/52 pacientes o ano de diagnóstico foi informado sendo que para 25/39 dos casos o diagnóstico foi entre os anos de 2008-2010.



**Tabela 1:** Principais características dos pacientes HIV-1 participantes do estudo (n=52)

<b>Idade (anos)</b>	
Mediana (variação)	30 (14 – 65)
<b>Sexo % (n/N)</b>	
Masculino	59,6% (31/52)
Feminino	40,4% (21/52)
<b>Categoria de exposição % (n/N)</b>	
Heterossexual	73,1% (38/52)
HSH	17,3% (09/52)
Outras	9,6% (05/52)
<b>CD4 (cel/<math>\mu</math>L)</b>	
Mediana (variação)	380 (25 – 1.082)
<b>Carga viral (cópias/mL) - % (n/N)</b>	
< 10.000	24,0% (12/50)
10.000 – 100.000	48,0% (24/50)
> 100.000	28,0% (14/50)

## 5.2. GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM PACIENTES DO ESTADO DO TOCANTINS

As seqüências do gene *pol* (PR e TR) analisadas pela ferramenta de Calibração da População com Resistência (CPR) empregando a ferramenta do *Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation* (SDRM-2010), mostraram mutações que conferem resistência primária aos ARVs em 11,5% (06/52) (IC 95%, 4.4 - 23.4%) dos pacientes. Paciente BRTO08-43 apresentou as seguintes mutações: M41L, L210W, T215D (INTR); paciente BRTO02-83: mutação Y181C (INNTR); paciente BRTO13-83: mutações D67G, K219E (INTR); paciente BRTO20-83: mutações V108I, Y181C (INNTR); paciente BRTO02-66: mutação M46L (IP); e paciente BRTO13-66: mutações V90I, K103N (INNTR). Todos os isolados apresentaram mutações que conferem resistência a apenas uma classe de drogas ARVs: três pacientes possuíam resistência aos

INNTR, dois aos INTR e um aos IP. Os perfis de mutação de cada paciente assim como o nível de resistência às drogas antirretrovirais estão representados na Tabela 2.

Todas as mutações de resistência primária foram encontradas em pacientes infectados com o subtipo B do HIV-1. Entre pacientes com vírus com resistência primária, três eram mulheres que referiram a categoria de transmissão heterossexual (03/06), seguida de (02/06) HSH e um paciente do sexo masculino que relatou infecção por acidente de trabalho. Nenhum paciente do sexo masculino da categoria de exposição heterossexual apresentou mutações de resistência aos ARVs. A mediana da contagem de CD4 entre os pacientes com resistência primária foi de 413 células/ $\mu$ L (variação 244-611 células/ $\mu$ L) e um paciente apresentou contagem de CD4 inferior a 350 células/ $\mu$ L. A mediana da carga viral dos pacientes com resistência foi de 48.199 cópias/mL (variação 5.361-141.124 cópias/mL). A resistência transmitida foi observada nos pacientes diagnosticados entre os anos de 2003 a 2009 e a maioria referiu residência em Palmas nos últimos 10 anos. A mediana da idade dos pacientes com resistência primária foi de 30 anos (variação 21 a 42 anos).

As mutações que conferem resistência aos INTR são classificadas de acordo com as diferentes drogas desta classe. As mutações aos análogos de timidina (TAMs) podem ser: M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F e K219Q/E. Essas mutações são selecionadas pelo AZT e d4T. Quando presentes com outras mutações podem resultar em elevado nível de resistência cruzada a outros INTR. Encontramos dois pacientes que apresentaram mutações do grupo das TAMs: BRTO08-43 (M41L e L210W) apresentando um nível intermediário de resistência ao ABC, AZT, d4T, ddI, TDF; e o paciente BRTO13-83 (K219E) que confere baixo nível de resistência ao d4T e nível intermediário ao AZT.

A mutação T215D, também presente no paciente BRTO08-43, que pode ser encontrada na lista da SDRM-2010, é relatada como uma mutação de transição entre cepas selvagens e as mutações Y e F. A maioria não reduz a susceptibilidade aos INTR e parece surgir devido à vantagem de *fitness*, mas sua presença pode sugerir que os mutantes T215Y ou T215F também estiveram ou estão ainda presentes (Violin et al. 2004).

A mutação de resistência Y181C foi encontrada em dois isolados e provoca alto nível de resistência a alguns INNTR como NVP e DLV e nível intermediário ao EFZ e ETR (Katlama et al. 2007). Um destes isolados também apresentou, juntamente com a

mutação Y181C, a mutação V108I que diminui em níveis baixos a susceptibilidade aos INNTR exceto ETR.

Um único isolado apresentou a mutação K103N, que confere alto nível de resistência a NVP, DLV e EFZ (INNTR). Este mesmo isolado também apresentou a mutação V90I, que é um polimorfismo comum, que parece associado com uma diminuição fraca da resposta ao ETR (Katlama et al. 2007).

O paciente BRTO02-66 foi o único isolado que apresentou uma mutação (M46L) que confere resistência a alguns IP, como: IDV, FPV, LPV, ATV e NFV.

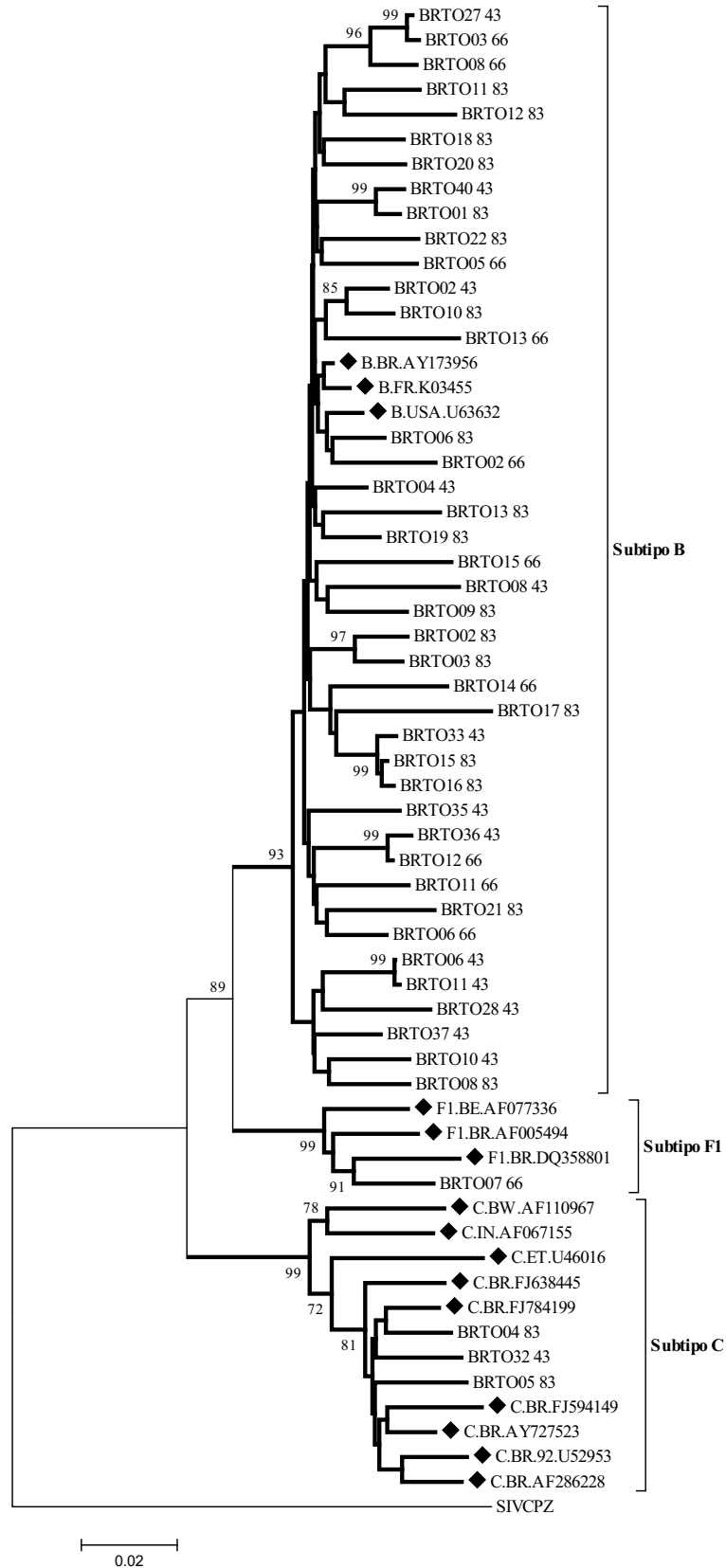
### 5.3. DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES DO ESTADO DO TOCANTINS

Entre os 52 isolados analisados, 86,5% (45/52) apresentaram subtipos concordantes em ambas as regiões da PR e TR: 78,8% (41/52) eram subtipo B, 5,8% (03/52) eram subtipo C e um isolado era subtipo F1. Estes resultados podem ser confirmados pelo estudo filogenético baseado na construção da árvore filogenética mediante comparação das sequências deste estudo com sequências de referência disponíveis no banco de dados de *Los Alamos*. A árvore filogenética confirmou a formação de grupos dos subtipos B, C e F1 nas amostras dos pacientes do estado do Tocantins, que se agruparam com suas respectivas sequências referências. Sete *clusters* com valores de *bootstrap* elevado (>70%) foram observados entre isolados do subtipo B do HIV-1 (Figura 6).

A recombinação intersubtipo foi confirmada pelo programa SIMPLOT mediante análise por *bootscanning* através da comparação da sequência de nucleotídeos das regiões da PR e TR com sequências de diferentes subtipos do HIV-1. Quanto aos 13,5% dos isolados (07/52) que apresentaram subtipos discordantes nas regiões da PR e TR: 1,9% (01/52) era recombinante B<sup>PR</sup>/F1<sup>TR</sup>, 7,7% (04/52) eram recombinantes B<sup>PR</sup>/BF1<sup>TR</sup> e 3,9% (02/52) recombinantes C<sup>PR</sup>/CF1<sup>TR</sup> (Figura 7). Os isolados recombinantes C<sup>PR</sup>/CF1<sup>TR</sup> também apresentaram valor de *bootstrap* elevado na árvore filogenética (dado não mostrado).

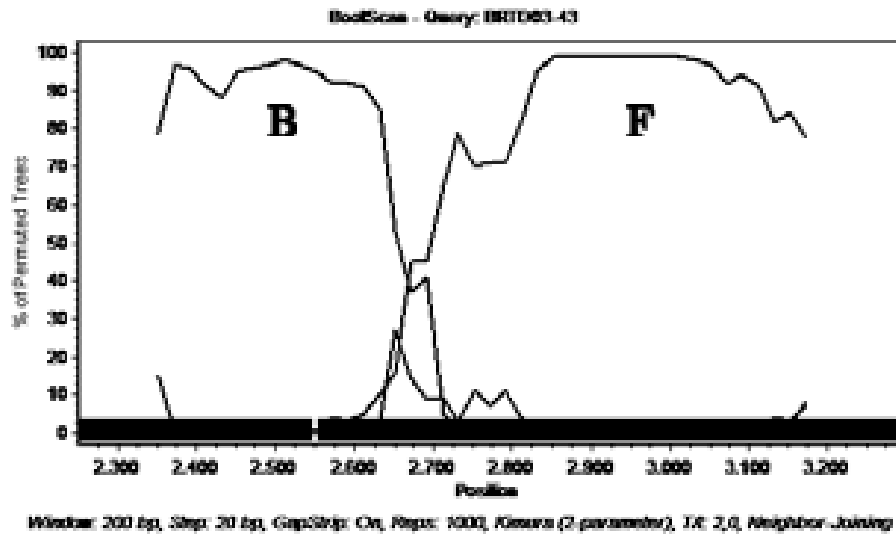
**Tabela 2:** Características dos pacientes com mutações associadas à resistência primária em *pol* (PR e TR) e nível de resistência aos ARVs

Número do Paciente / GenBank	Categoria de exposição / Sexo / Subtipo PR/TR	CD4 / CV	IP Mutação principal	ITRN Mutação	ITRNN Mutação	Perfil de Resistência		
						Baixo	Intermediário	Alto
BRTO08-43 GU214071	Acidente de trabalho / M BB	611 / 62.743	-	M41L, L210W, T215D	-	ABC, AZT, d4T, ddI, TDF	-	-
BRTO02-83 GU214083	Hetero / F / BB	244 / 94.154	-	-	Y181C	-	EFV, ETR	DLV, NVP
BRTO13-83 GU214094	HSH / M / BB	378 / 33.654	-	D67G, K219E	-	d4T	AZT	-
BRTO20-83 GU214100	Hetero / F / BB	511 / 141.124	-	-	V108I, Y181C	-	EFV, ETR	DLV, NVP
BRTO02-66 HM583573	Hetero / F / BB	381 / 5.887	M46L	-	-	ATV, FPV, IDV, LPV	NFV	-
BRTO13-66 HM583584	HSH / M / BB	444 / 26.764	-	-	V90I, K103N	-	-	DLV, EFV, NVP

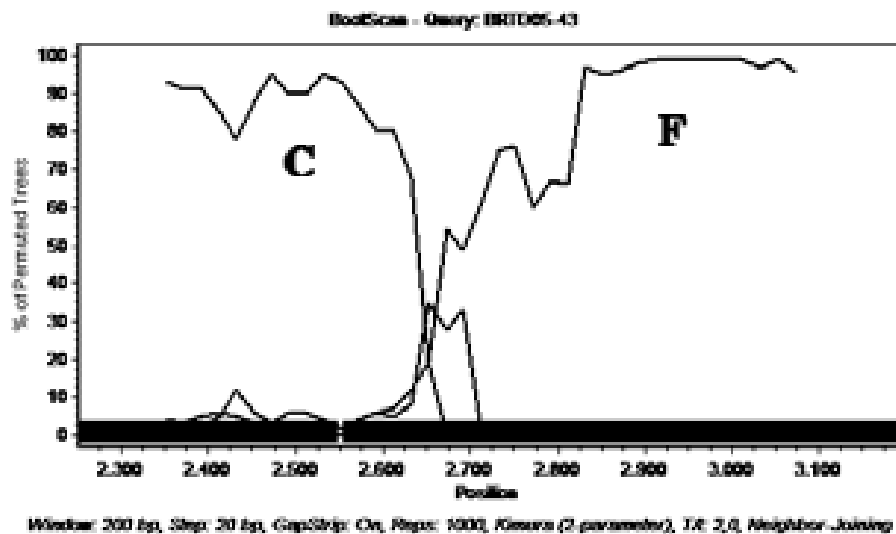


**Figura 6:** Árvore filogenética das sequências do gene da PR e TR (subtipos puros) do HIV-1 de pacientes virgens de tratamento do estado do Tocantins (método Neighbor-Joining e modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com valor de suporte *bootstrap* de 1000 replicatas empregando-se o programa MEGA). A sequência do vírus da imunodeficiência símia do chimpanzé (SIVcpz) foi utilizada como grupo externo.(♦ sequências referências).

A



B



**Figura 7:** Análise por *Bootscanning* da sequência de nucleotídeos das regiões da PR e TR dos isolados **A)** BRTO03-43 ( $B^{PR}/BF1^{TR}$ ) e **B)** BRTO05-43 ( $C^{PR}/CF1^{TR}$ ). O eixo horizontal representa o número de nucleotídeos analisados e o eixo vertical a porcentagem de árvores permutadas que apoiam um determinado subtipo. Parâmetros: janela = 200pb, passo = 20pb, GapStrip on, número de repetições = 1000, Ts/Tv = 2.0, método Neighbor-Joining, modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros.

## 6. DISCUSSÃO

---

A epidemiologia molecular do HIV-1 nas regiões Sul e Sudeste do Brasil vem sendo amplamente investigada e documentada. No entanto, existe pouca informação sobre a prevalência de resistência primária aos ARVs e diversidade genética do HIV-1 em pacientes de outras regiões do país, principalmente nos pequenos centros urbanos no interior do Brasil. Dois estudos prévios de resistência primária envolvendo vários estados do Brasil incluíram isolados virais de pacientes da região Norte, especificamente dos estados do Pará e do Amazonas (Tanuri et al. 1999, Inocencio et al. 2009). Porém, estes estudos não discriminam os dados individuais de cada estado. Assim, os dados sobre diversidade genética do HIV-1 e perfil e prevalência de resistência primária aos ARVs nesta região são escassos.

Este estudo apresenta dados pioneiros de sequenciamento da região *pol* do HIV-1 de pacientes recrutados no estado do Tocantins, o mais novo dos 26 estados brasileiros, criado em 1989 a partir da divisão do estado de Goiás, e localizado no centro geográfico do país entre estados do Nordeste, Centro-Oeste e do próprio Norte. A economia tocantinense está assentada em um agressivo modelo expansionista de agroexportações que atraiu imigrantes de todo o país em busca de novas possibilidades. Suas principais atividades estão concentradas na capital Palmas, uma cidade planejada, que é considerada a “capital das oportunidades”. Enquanto Palmas, nosso sítio de recrutamento, possui apenas duas décadas, a maioria das outras cidades do estado, de onde metade dos pacientes vieram, remota o período colonial quando o ciclo do ouro atraiu imigrantes principalmente do Sul do país. Todos estes fatores históricos e geográficos relacionados com o estado do Tocantins certamente contribuíram para importante fluxo migratório e afluxo de pacientes de outras regiões que podem ter transmitido o HIV-1 para moradores da nova capital.

O estado do Tocantins também possui algumas reservas indígenas como a Tribo Karajá e, um dos pacientes incluído pertencia a esta tribo localizada na Ilha do Bananal que possui em torno de 600 habitantes. Este paciente indígena relatou risco de exposição heterossexual. Relações sexuais com profissionais do sexo das cidades vizinhas são frequentemente relatadas entre os índios do sexo masculino no Brasil, porém a possibilidade da prática homossexual não pode ser descartada. Baixa

prevalência de infecção pelo HIV-1 foi relatada em outras tribos do Norte na região Amazônica (Andrada-Serpa et al. 1988, Ishak et al. 1995, Shindo et al. 2002). Entre 155 nativos indígenas da Tribo Tiriyo na região Amazônica, um indivíduo do sexo masculino com infecção pelo HIV-1 foi identificado (Machado et al. 2006). Importante salientar a possibilidade de disseminação/transmissão do HIV-1 por este índio Karajá do sexo masculino para o seu parceiro sexual (s) dentro e fora da tribo. Destacamos aqui a importância do monitoramento da prevalência de doenças infecciosas sexualmente transmissíveis, como a aids, em comunidades indígenas em risco de extinção localizadas em área remotas do país para preservar sua saúde, fertilidade e expectativa de vida.

Este estudo relatou um nível moderado de resistência transmitida às drogas (11,5%) acima das taxas observadas na maioria dos estudos no país e semelhantes às taxas observadas em países desenvolvidos (Weinstock et al. 2000). Acreditamos que a prevalência de mutações de resistência primária encontrada em Palmas foi influenciada por imigrantes infectados com HIV-1 que vieram de grandes áreas metropolitanas caracterizadas por um maior tempo de exposição às drogas antirretrovirais e, portanto, maior prevalência de resistência.

Diferentes perfis e prevalência de resistência primária do HIV-1 a ARVs tem sido descritos em várias regiões do Brasil, entretanto permanece uma lacuna sobre a região Norte. O primeiro estudo multicêntrico brasileiro em 2001 mostrou que 6,6% dos pacientes possuíam resistência primária às drogas ARVs. Este estudo incluiu 17 amostras do estado do Pará localizado na região Norte, mas nenhuma mutação de resistência foi detectada nestes pacientes (Brindeiro et al. 2003).

Dois recentes estudos brasileiros multicêntricos relataram níveis de resistência transmitida às drogas variando entre 5,7% (95% IC, 4,4 - 9,6%) e 8,1% (95% IC, 4,8 - 12,6%) entre os pacientes, principalmente de áreas metropolitanas (Inocencio et al. 2009, Sprinz et al. 2009). De acordo com o estudo realizado nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Belém e Brasília, a prevalência de resistência primária foi de 8,1%. Neste estudo, os dados de Belém/Pará localizado na região Norte e Brasília/Centro-Oeste foram analisados em conjunto e três casos de resistência primária foram encontrados (Inocencio et al. 2009). Outro estudo realizado em 13 cidades brasileiras mostrou uma baixa prevalência de resistência primária (5,7% dos 387 pacientes virgens de tratamento) (Sprinz et al. 2009). Um estudo recente realizado no estado de Goiás, que faz divisa com o estado do Tocantins, mostrou uma prevalência



de resistência primária de 10% (Cardoso et al. 2009). Embora a maioria dos estudos indique níveis baixos a moderados de resistência primária no Brasil, altos níveis já foram relatados nas cidades de Santos no estado de São Paulo e Salvador no estado da Bahia (Pedroso et al. 2007, Sucupira et al. 2007). Em conjunto com os dados aqui relatados, evidenciam a necessidade de estudos de vigilância de resistência primária em todo o país, principalmente em cidades com crescimento acelerado e grande fluxo migratório como Palmas.

A introdução da HAART em pacientes infectados com HIV-1 está associada com uma redução acentuada na morbidade e mortalidade e uma recuperação significativa do comprometimento imunológico funcional (Lederman et al. 1998, Palella et al. 1998). Porém, a resistência aos ARVs é uma das principais causas de falência do tratamento em indivíduos com infecção pelo HIV (Miller et al. 1998). Apesar do alto nível de exposição aos ARVs, no Brasil em geral a prevalência de resistência primária continua baixa. Porém, a circulação de um nível moderado de cepas do HIV-1 com mutações de resistência primária entre as três principais classes de drogas ARVs disponíveis no Brasil, foi encontrada no estado do Tocantins, sugerindo transmissão do vírus resistente nesta área.

O primeiro dado sobre a epidemiologia molecular descrito na região Norte do Brasil mostrou proporções iguais dos subtipos B e F1 do HIV-1 e 45,16% de mosaicos recombinantes entre os subtipos B, C e F1, entre 31 indivíduos infectados que participaram de um Centro de Testagem e Aconselhamento em Aids na cidade de Manaus, estado do Amazonas (Vicente et al. 2000). Em pacientes de Belém no estado do Pará e Macapá no estado do Amapá, seqüências das regiões C2V3 e PR mostraram predomínio do HIV-1 subtipo B, circulação do subtipo F1, introdução do subtipo D e da CRF02\_AG e várias formas recombinantes (Machado et al. 2009). Os dados do estado do Tocantins auxiliam a compor o mapa molecular do HIV-1 no Norte do país onde foram identificados nas regiões da PR e TR os subtipos B, C e F1 puros e as formas recombinantes B/F1 e C/F1 em pacientes recrutados entre os anos de 2008 e 2010.

Em relação ao subtipo B encontrado no estado do Tocantins, análise filogenética indicou a formação de alguns *clusters* de transmissão local, incluindo dois ou três isolados cada, com valores de *bootstrap* elevados (quatro grupos com *bootstrap* de 99, e os demais grupos com *bootstrap* de 97, 96 e 85 cada). No total, sete *clusters* sugerem a transmissão local em um grupo de 16 isolados que representam 30,8% dos pacientes analisados no trabalho. Além destes, foram identificados nas análises filogenéticas

outros *clusters*, porém com valores de *bootstrap* menores. Deste modo, podemos observar que além da importação de subtipos de outras regiões também está ocorrendo uma disseminação localizada do vírus HIV-1 no estado do Tocantins.

No Brasil maiores proporções do subtipo C encontram-se na região Sul do país, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e vem aumentando nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (Soares et al. 2003b, Rodrigues et al. 2006, Santos et al. 2006). O subtipo C do HIV-1 já foi identificado fora da região Sul e Sudeste indicando a interiorização deste subtipo para o Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país, como nos estados de Goiás, Pará e Bahia respectivamente (Stefani et al 2007, Pedroso et al. 2007, Cardoso et al. 2009, Machado et al. 2009) e agora, também, no estado do Tocantins.

O subtipo B do HIV-1 é predominante no Brasil. No entanto, um crescente número de infecções por HIV-1 não-B e formas recombinantes estão sendo identificados (Vicente et al. 2000, Eyer-Silva et al. 2007). No estado do Tocantins, 21,2% dos isolados incluíam subtipos não-B. A maioria era recombinantes B/F1 e C/F1, demonstrando a natureza dinâmica e complexa da epidemia do HIV-1 no estado do Tocantins.

À semelhança do que tem sido descrito nos estados do Sul uma proporção significativa dos isolados (13,4%) era HIV-1 recombinante principalmente incluindo os subtipos B e F1. Além disso, recombinantes C/F1, incluindo dois subtipos que não são prevalentes na região Norte, foram detectados em dois pacientes sem vínculo epidemiológico. Uma vez que neste cenário a prevalência dos subtipos F1 e C foram baixas, é mais provável supor que estes recombinantes, especialmente as formas C/F1 foram importados de regiões metropolitanas do Sul do Brasil, onde esses subtipos principalmente o subtipo C, co-circulam em maior frequência e têm maior chance de causar a co-infecção ou superinfecção e gerar formas recombinantes.

Em geral os dados da epidemiologia molecular no estado do Tocantins sugerem a influência da epidemia da região Sul e Sudeste e também início da epidemia no próprio estado, pois tem ocorrido disseminação interna do HIV-1 onde vários *clusters* de transmissão local do subtipo B foram identificados. As primeiras sequências de HIV-1 subtipo C do estado do Tocantins formaram um *cluster* monofilético com sequências do subtipo C da região Sul, indicando o impacto da epidemia desta região sobre a epidemia no Norte do Brasil. Curiosamente, os dois isolados C<sup>PR</sup>/CF1<sup>TR</sup> formaram *cluster* com valor de *bootstrap* elevado (>70%). Desta forma, os resultados da

epidemiologia molecular do estado do Tocantins, indicam complexos padrões genéticos do HIV-1 semelhante ao que foi descrito nas grandes regiões metropolitanas. Estes resultados indicam a influência de HIV-1 importados de outras regiões na epidemia do estado do Tocantins, especialmente na recém criada cidade de Palmas. O paciente indígena da Tribo Karajá descrito no presente estudo foi infectado pelo subtipo B do HIV-1, indicando a introdução e circulação deste subtipo entre os índios do Norte do Brasil, à semelhança do que foi encontrado na Tribo Tiriyo (Machado et al. 2006).

Apesar do tamanho da amostra de estudo ser relativamente pequeno, este grupo representa em torno de 40-50% dos pacientes virgens de tratamento desta área durante o período de recrutamento (dado pessoal). No Tocantins a incidência de infecção pelo HIV-1 e a densidade demográfica são baixas. Um dos fatores limitantes deste estudo foi o ensaio genotípico utilizado que não identifica variantes minoritárias do vírus que constituem menos de 20 a 30% da população viral (Barbour et al. 2004). Outra possível limitação deste estudo pode ser o uso de ARV não relatado por algum paciente. Embora esta possibilidade não possa ser completamente descartada, uma evidência que reforça que os pacientes incluídos eram realmente virgens de tratamento foi, a ausência de mutações de resistência associadas a duas ou a três classes de drogas. De acordo com a Sociedade Internacional da AIDS (IAS-EUA) dupla ou tripla resistência a ARV é geralmente observada em pacientes já tratados com ARV (Caseiro et al. 2008).

Embora nós não saibamos, ao certo, a data de infecção destes pacientes virgens de tratamento, considerando a contagem de células CD4, a maioria deles é paciente com infecção crônica. Em indivíduos recém infectados a presença de vírus com mutações de resistência pode ser mais frequente que em indivíduos com infecção crônica, pois na ausência de pressão seletiva das drogas, os isolados com mutação tendem a cair a níveis indetectáveis pelos métodos de sequenciamento convencional. Contudo, algumas mutações associadas à resistência podem persistir durante meses ou anos em indivíduos virgens de tratamento ARV, presumivelmente porque estas mutações não conferem uma desvantagem significativa do *fitness* viral. Mutações de resistência que causam pouco ou nenhum impacto no *fitness* viral podem ser detectadas por longo período de tempo em indivíduos virgens de tratamento ou em indivíduos que interromperam a terapia, diferentemente das mutações que impõem um grande custo adaptativo ao vírus (Shafer 2002).

Mutações de resistência transmitidas associadas à INNTR representam o grupo melhor estudado dessas mutações, e alguns estudos sugerem que algumas

dessas mutações podem persistir por anos após a infecção em pacientes tratados (Geretti 2006). Em nosso grupo de estudo a diminuição da susceptibilidade aos INNTR predominou entre as três classes de drogas. Mutações que tendem a ser menos estáveis na ausência da pressão exercida pelos medicamentos e que predominam em pacientes recém-infectados ou recém-tratados, como M184V e K65R, não foram observadas.

A identificação de genótipos do HIV-1 representa uma ferramenta importante para estudos de epidemiologia molecular, auxiliando na avaliação da evolução da epidemia e contribuindo para a compreensão da evolução e disseminação do vírus. A epidemia do HIV-1 no Brasil é amplamente heterogênea. Os números relacionados com as regiões Sul e Sudeste indicam estabilização da epidemia, entretanto no Norte do país há tendência de crescimento da epidemia. Os resultados aqui apresentados indicam a presença de uma epidemia com características complexas em Palmas, Tocantins devido ao nível moderado de resistência primária e alta diversidade genética do HIV-1 com alto número de formas recombinantes circulantes.

Em geral, esse levantamento no estado do Tocantins, Norte do Brasil, indica o aspecto dinâmico da epidemia do HIV-1 neste cenário de crescimento rápido e sugere uma forte influência de casos importados das regiões Sul e Sudeste, juntamente com alta taxa de disseminação interna do HIV-1. Neste cenário de crescimento rápido em uma área geograficamente distante, outros estudos devem monitorar a diversidade genética do HIV-1 e a circulação de cepas resistentes em indivíduos virgens de tratamento. Estes dados poderão indicar se estes pacientes podem se beneficiar do teste genotípico para resistência pré-tratamento.

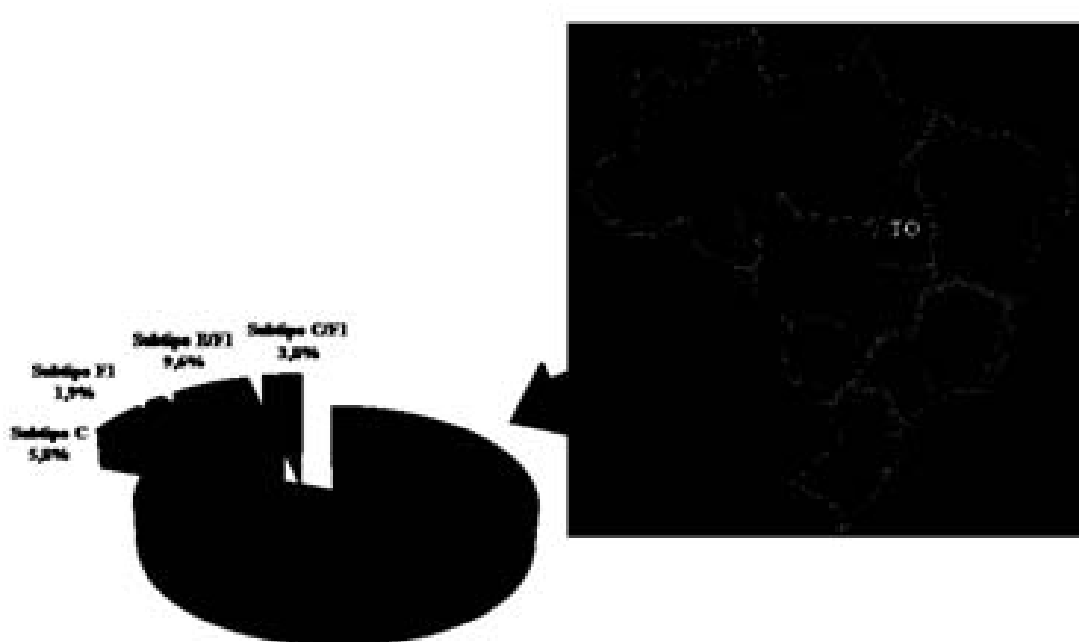
## 7. CONCLUSÕES

Prevalência e perfil de mutações associadas à resistência primária em pacientes virgens de tratamento do estado do Tocantins recrutados no período de 2008 a 2010:

1. Nível intermediário de resistência primária aos ARVs;
2. Mutações associadas à resistência primária entre as 3 principais classes de drogas ARVs (INTR, INNTR e IP).
3. Ausência de mutações a mais de uma classe de ARV;
4. Maior frequência de mutações a INNTR, seguida de mutações a INTR e a IP.

Diversidade genética do HIV-1 em pacientes virgens de tratamento do estado do Tocantins recrutados no período de 2008 a 2010 (figura 8):

1. Prevalência do subtipo B que co-circula com menores proporções dos subtipos C e F1;
2. Formas recombinantes do HIV-1 envolvendo os subtipos B e F1 representaram a segunda forma genética mais prevalente. Também foi observada a presença de recombinantes C/F1;
3. Análise filogenética indicou a ocorrência de *clusters* de transmissão local do subtipo B e interiorização do subtipo C proveniente da região Sul do Brasil para a região Norte.



**Figura 8:** Subtipos genéticos do HIV-1 nas regiões da PR e TR em pacientes do estado do Tocantins.

## **8. RECOMENDAÇÕES**

---

Neste estado, a prevalência de resistência primária deve ser monitorada para indicar o custo-benefício da implantação do teste de genotipagem pré-TARV para auxiliar na seleção de esquemas ARVs que permitam atingir e manter a supressão viral.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Andrada-Serpa MJ, Dobbin JA, Gomes P et al 1988. Incidence of retroviruses in some Brazilian groups. *Immunol Lett* 18(1):15-18.

Andrew W, Artenstein TC, VanCott JR, et al 1996. Dual Infection with human immunodeficiency virus type 1 of distinct envelope subtypes in humans. *J Infect Dis* 171: 805-10.

Avila MM, Pando MA, Carrion G, Peralta LM, Salomon H, Carrillo MG, Sanchez J, Maulen S, Hierholzer J, Marinello M, Negrete M, Russell KL, Carr JK 2002. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29(4): 422-426.

Ayehunie S, Johansson B, Soñnerborg A, Salminen M, Zewdie DW, Fehniger T, et al 1990. New subtype of HIV-1 in Ethiopia. *Lancet* 336: 942.

Ayouba A, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P, Barré-Sinoussi F, Mauclore P, Simon F, Nerrienet E 2000. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 14: 2623-2625.

Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, et al 2004. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS* 18: 1683-9.

Barré-Sinoussi F 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348(9019): 31-35.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre M.T, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220(4599): 868-871.

Bartlett JG 1999. Update in infectious diseases. *Ann Intern Med* 131(4): 273-280.

Bebenek K, Abbotts J, Roberts JD, Wilson SH, Kunkel TA 1989. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *J Biol Chem* 264(28): 16948-16956.

Bedimo RJ, McGinnis KA, Dunlap M, Rodriguez-Barradas MC, Justice AC 2009. Incidence of non-AIDS-defining malignancies in HIV-infected versus noninfected patients in the HAART era: impact of immunosuppression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 52(2): 203-208.

Bello G, Aulicino PC, Ruchansky D, Guimaraes ML, Lopez-Galindez C, Casado C, Chiparelli H, Rocco C, Mangano A, Sen L, Morgado MG 2010. Phylodynamics of HIV-1 circulating recombinant forms 12\_BF and 38\_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology* 7: 22.

Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SL, et al 2007. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol* 7: 263-270.

Bello G, Passaes CP, Guimaraes ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, Medeiros RM, Alencastro PR, Morgado MG 2008. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 22(15): 1993-2000.

Biswas P, Tambussi G, Lazzarin A 2007. Access denied? The status of co-receptor inhibition to counter HIV entry. *Expert Opin Pharmacother* 8(7): 923-933.

Boden D, Hurley A, Zhang L, Cao Y, Guo Y, Jones E, Tsay J, Ip J, Farthing C, Limoli K, Parkin N, Markowitz M 1999. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 282: 1135-1141.

Brasil 2000. Boletim Epidemiológico AIDS.DST ano XIII nº 01. A Aids no Brasil: Situação Atual e Tendências. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS – Ministério da Saúde.

Brasil 2001. Boletim Epidemiológico AIDS.DST ano XIV nº 2. Dados Epidemiológicos do Brasil. Brasília: Programa nacional de DST e AIDS – Ministério da Saúde.



Brasil 2010a. Boletim Epidemiológico AIDS.DST ano VI nº 01. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS – Ministério da Saúde.

Brasil 2010b. Boletim Epidemiológico AIDS.DST ano VII nº 01 (Versão Preliminar). Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS – Ministério da Saúde.

Brasil 2010c. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo de assistência farmacêutica em DST/HIV/Aids: recomendações do Grupo de Trabalho de Assistência Farmacêutica Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 224 p.: il. – (Serie A. Normas e Manuais Técnicos).

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

Brigido LF, Nunes CC, Oliveira CM, Knoll RK, Ferreira JL, Freitas CA, et al 2007. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 1579-1586.

Brigido LFM 2009. On the origin of South America HIV-1C epidemic. *AIDS* 23: 543-544.

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-1069.

Briones C, Perez-Olmeda M, Rodriguez C, Romero J, Hertogs K, Soriano V 2001. Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 145-150.

Burns DN, Mofenson LM 1999. Pediatric HIV-1 infection. *Lancet* 354(suppl II): 1-6.

Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EF, Pinto-Neto LF, Couto- Fernandez JC, Dietze R, et al 2006. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espirito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 881-885.

Calleja JMG, Walker N, Cuchi P, Lazzari S, Ghys PD, Zacarias F 2002. Status of the HIV/AIDS epidemic and methods to monitor it in the Latin America and Caribbean region. *AIDS* 16(suppl 3): S3-S12.

Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM 2009. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 46(2): 134-139.

Carrion G, Hierholzer J, Montano S, Alava A, Perez J, Guevara A, et al 2003. Circulating recombinant form CRF02\_AG in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19: 329-332.

Caseiro MM, Golega AA, Etzel A, Diaz RS 2008. Characterization of virologic failure after an initially successful 48-week course of antiretroviral therapy in HIV/AIDS outpatients treated in Santos, Brazil. *Braz J Infect Dis* 12(3):162-166.

Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S 2007. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the northeast region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102: 785-792.

Centers for Disease Control and Prevention 1993. Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. MMWR 41(RR-17). <http://hiv.net/link.php?id=184>

Centers of Disease Control and Prevention 1981. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men – New York City and California. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 30:305-8.

Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR 2004. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1

isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(8): 877-882.

Cesaire R, Dos Santos G, Abel S, Bera O, Sobesky G, Cabie A 1999. Drug resistance mutations among HIV-1 strains from antiretroviral-naive patients in Martinique, French West Indies. *J Acquire Immune Defic Syndr* 22: 401-405.

Chaix ML, Harzic M, Masquelier B, Pellegrin I, Meyer L, Costagliola DI, Rouzioux C, Brun-Vezinet F 1999. Resistance Group Cohort, Primo and Primoferon Study Groups: Prevalence of genotypic drug resistance among French patients infected during the year. Eighth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago 2001: 2-4.

Coffin JM, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss RA 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10.

Connor RI, Ho DD 1992. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: Devita VT. editor. AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention. Philadelphia: J.B. Lippincott Company p.13-85.

Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR 1997. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1 infected individuals. *J Exp Med.* 185: 621-628.

Cornelissen M, vanden Burg R, Zorgdrager F, Goudsmit J 2000. Spread of distinct human immunodeficiency virus type 1 AG recombinant lineages in Africa. *J. Gen. Virol.* 81: 515-523.

Daar ES, Kesler KL, Petropoulos CJ, et al 2007. Hemophilia Growth and Development Study. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clin Infect Dis* 45: 643-649.

Damond F, Worobey M, Campa P, Farfara I, Colin G, Matheron S, Brun-Vezinet F, Robertson DL, Simon F 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and

proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20(6): 666-672.

Delgado E, Leon-Ponte M, Villahermosa ML, Cuevas MT, Deibis L, Echeverria G, Thomson MM, Pérez-Alvarez L, Osmanov S, Nájera R 2001. Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: A UNAIDS study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: 753-758.

Dilernia DA, Gomez AM, Lourtau L, Marone R, Losso MH, Salomon H, Gomez-Carrillo M 2007. HIV type 1 genetic diversity surveillance among newly diagnosed individuals from 2003 to 2005 in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23: 1201-1207.

Dresser GK, Spence JD, Bailey DG 2000. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet* 38: 41-57

Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, et al 1999. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomized controlled trial. *Lancet* 353(9171): 2195-2199.

Duwe S, Brunn M, Altman D, Hamouda O, Schmidt B, Walter H, Pauli G, Kücherer C 2001. Frequency of genotypic and phenotypic drugresistant HIV-1 among therapy-naive patients from the German seroconverter study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 266-273.

Eigen M 1996. On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol* 4(6): 216-218.

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG 2007. Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 303-308.

Eyer-Silva WA, Morgado MG 2005. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100(8): 869-873.

Fontella R, Soares MA, Schrago CG 2008. On the origin of HIV-1 subtype C in South America. *AIDS* 22: 2001-2011.

Freed EO 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26(1-6): 13-33.

Frenkel 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(2): 342-7.

Gadelha SR, Shindo N, Cruz JNM, Morgado MG, and Galvão-Castro B 2003. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. *Memórias Inst Oswaldo Cruz* 98(4): 461-464.

Gallant JE 2007. Approach to the treatment-experienced patient. *Infect Dis Clin N Am* 21: 85-102.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes B, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD 1984. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) From Patients With AIDS and at Risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

Gao F, Vidal N, Li Y, Trask SA, Chen Y, Kostrikis LG, Ho DD, Kim J, Oh MD, Choe K, Salminen M, Robertson DL, Shaw GM, Hahn BH, Peeters M 2001. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17: 675-688.

Gavin PJ, Yogev R 2002. The role of protease inhibitor therapy in children with HIV infection. *Paediatr. Drugs* 4: 581-607.

Geretti AM 2006. Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* 8(4):210-220.

Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, Delfraissy JF, Meyer L 2007. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology* 4: 65.

Gianotti N, Galli L, Boeri E, Maillard M, Serra G, Ratti D, et al 2005. In vivo dynamics of the K103N mutation following the withdrawal of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in human immunodeficiency virus-infected patients. *New Microbiol* 28: 319-326.

Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY et al 2009. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 20:1-3.

Gilbert MT, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M 2007. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18566-18570.

Gotlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosa candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New Engl J Med* 305: 1425-1431.

Grant AD, De Cock KM 2001. ABC of AIDS. HIV infection and AIDS in the developing world. *BMJ* 322(7300): 1475-1478.

Guimaraes ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG 2008. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 22: 433-435.

Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287(5453): 607-614.

Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.

Hamelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20: W13-W23.

Hamers FF, Downs AM 2004. The changing face of the HIV epidemic in western Europe: what are the implications for public health policies? *Lancet* 364: 83-94.

Hammer SM, Eron JJ, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, Cahn P, Fischl MA, Gatell JM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Montaner JS, Richman DD, Yeni PG, Volberding PA 2008. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 300(5): 555-570.

Hazuda DJ, Felock P, Witmer M 2000. Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 287: 646-650.

Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al 2008. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society – USA Panel. *Clinical Infectious Diseases* 47: 266-85.

Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373: 123-126.

Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, Luo CC, Kalish ML, Weniger BG, Pau CP, Schable CA, Curran JW 1996. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 275(3): 210-216.

IBGE 2008: Estatísticas do Século XX, população. [http://www.ibge.gov.br/english/default.php#sub\\_populacao](http://www.ibge.gov.br/english/default.php#sub_populacao). [Accessed 11 November 2008].

Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, et al 2009. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 12: 20.

Ishak R, Harrington WJ, Jr., Azevedo VN et al 1995. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(7):813-821.

Jahn A et al 2008. Population-level effect of HIV on adult mortality and early evidence of reversal after introduction of antiretroviral therapy in Malawi. *Lancet* 371: 1603-1611.

Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, et al 2007. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. *Top HIV Med* 15: 119-25.

Johnson VA, Brun-Vézinet 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(5): 138-145.

Joly V, Yeni P 1999. Non nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*. Rev 1: 3744.

Karon JM, Buehler JW, Byers RH, Farizo KM, Green TA, Hanson DL, Rosenblum LS, Gail MH, Rosenberg PS, Brookmeyer R 1992. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons-United States, 1992-1994. *MMWR Recomm Rep* 41(RR-18): 1-29.

Katlama C, Esposito R, Gatell JM, Goffard JC, Grinsztejn B, Pozniak A, Rockstroh J, Stoehr A, Vetter N, Yeni P, Parys W, Vangeneugden T 2007. Efficacy and safety of TMC114/ritonavir in treatment-experienced HIV patients: 24-week results of POWER 1. *AIDS* 21(4): 395-402.

Keele BF, Jones JH, Terio KA, Estes JD, Rudicell RS, Wilson ML, Li Y, Learn GH, Beasley TM, Schumacher-Stankey J, Wroblewski E, Mosser A, Raphael J, Kamenya S, Lonsdorf EV, Travis DA, Mlengeya T, Kinsel MJ, Else JG, Silvestri G, Goodall J, Sharp PM, Shaw GM, Pusey AE, Hahn BH 2009. Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature* 460(7254): 515-519.

Kijak GH, Pampuro SE, Avila MM, Zala C, Cahn P, Wainberg MA, Salomon H 2001. Resistance profiles to antiretroviral drugs in HIV-1 drug-naive patients in Argentina. *Antiviral Ther* 6: 71-77.



King JR, Kimberlin DW, Aldrovandi GM, Acosta EP 2002. Antiretroviral pharmacokinetics in the paediatric population: a review. *Clin. Pharmacokinet.* 41: 1115-1133.

Kozal MJ, Amico KR, Chiarella J, Schreiber T, Cornman D, Fisher W, et al 2004. Antiretroviral resistance and high-risk transmission behavior among HIV-positive patients in clinical care. *AIDS* 18: 2185-2189.

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(7): 753-759.

Lau C, Muula AS 2004. HIV/AIDS in Sub-Saharan Africa. *Croat Med J* 45(4): 402-14.

Learn GHJ, Korber BT, Foley B, Hahn BH, Wolinsky SM, Mullins JI 1996. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. *J Virol* 70(8): 5720-5730.

Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, et al 1998. Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: Results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 178: 70-79.

Levy JA 1996. Infection by human immunodeficiency virus – CD4 is not enough. *N Engl J Med* 335(20): 1528-30.

Levy RM, Pons VG, Rosenblum ML 1984. Central nervous system mass lesions in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Neurosurg* 61(1): 9-16.

Little SJ, Frost SD, Wong JK, et al 2008. The persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary HIV infection. *J Virol* 82: 5510-8.

Little SJ, Holte S, Routy JP, et al 2002. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347: 385-94.

Little SJ, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Conway B, Saag MS, Connick E, Holte S, Corey L, Keiser PH, Mwatha A, Dawson K, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD 2001. Antiretroviral drug susceptibility and response to initial therapy among recently HIV-infected subjects in North America. *Antiviral Ther* 6(Suppl 1): 21.

Locateli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcantara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, et al 2007. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype C in southern Brazil. *J Med Virol* 79: 1455-1463.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73(1): 152-160.

Los Alamos 2010 - HIV Sequence database. Acesso: março 2010 (Disponível em: <http://www.hiv-web.lanl.gov>).

Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, Souza MI, Fernandes LM, Souza LL, Ishak R 2009. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(10): 961-966.

Machado LF, Vallinoto AC, Souza MI et al 2006. Serological and molecular typing of HIV type 1 infection in the Tiriyo tribe, a native Indian community of the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(12):1267-1270.

Mansky LM 1998. Retrovirus mutation rates and their role in genetic variation. *J Gen Virol* 79(Pt 6): 1337-1345.

Matthews T, Salgo M, Greenberg M, Chung J, DeMasi R, Bolognesi D 2004. Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nat. Rev. Drug Discov* 3: 215-225.

Mayers G, Korber B, Berzofsky JA, Smith RF, Pvlakis GN 1992. Human Retrovirus and ADS. *Los Alamos National Laboratory* 3: 2-4.

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

Meira DA 2002. Acquired immunodeficiency syndrome in Brazil. *Croat Med J.* 43(4): 475-479.

Meloni ST, Kim B, Sankale JL, Hamel DJ, Tovanabutra S, Mboup S, McCutchan FE, Kanki PJ 2004. Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3. *J Virol* 78(22): 12438-12445.

Miller JH, Presnyak V, Smith HC 2007. "The dimerization domain of HIV-1 viral infectivity factor Vif is required to block APOBEC3G incorporation with virions". *Retrovirology* 4(1): 81.

Miller V, Phillips A, Rottmann C, Staszewski S, Pauwels R, Hertogs K, et al 1998. Dual resistance to zidovudine and lamivudine in patients treated with zidovudine-lamivudine combination therapy: Association with therapy failure. *J Infect Dis* 177: 1521-1532.

Ministério da Saúde 2008. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV: 2008. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. 7. Ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

Ministério da Saúde 2010a. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Recomendações para terapia antirretroviral em adultos infectados pelo HIV, 2008. Suplemento II. Critérios para Início do Tratamento Antirretroviral.

Ministério da Saúde 2010b. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Resposta Brasileira 2008-2009. Relatório de Progresso do País.

Mulder LC, Chakrabarti LA, Muesing MA 2002. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. *J. Biol. Chem.* 277: 27489-27493.

Mulky A, Sarafianos SG, Arnold E, Wu X, Kappes JC 2004. Subunit-specific analysis of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase in vivo. *J. Virol.* 78: 7089-7096.

Myers G 1994. Tenth anniversary perspectives on AIDS. HIV: between past and future. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10: 1317-1324.

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

Nijhuis M, Boucher CB, Schipper P et al 1998. Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during sub optimal protease-inhibitor therapy. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95(24): 14441-14446.

Okie S 2006. Fighting HIV-lessons from Brazil. *New England Journal of Medicine* 354: 1977–1981.

Oliveira T, Deforche K, Cassol S, et al 2005. Na Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics* 21:3797-3800.

Osmanov S, Pattou C, Walker N, Schwardlander B, Esparza J 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29: 184-190.

Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338(13): 853-860.

Palella FJ, oria-Knoll M, Chmiel JS, Moorman AC, Wood KC, Greenberg AE, Holmberg SD 2003. Survival benefit of initiating antiretroviral therapy in HIV-infected persons in different CD4+ cell strata. *Ann Intern Med* 138(8): 620-626.

Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, Brites C 2007. 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* 45: 251-253.

Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrago R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G, Koumare B, Saidou M, Esu-Williams E, Lombart JP, Badombena W, Luo N, Vanden HM, Delaporte E 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 11: 493-498.

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

Peng C, Ho BK, Chang TW, Chang NT 1989. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J Virol* 63(6): 2550-2556.

Phillips AN et al 2007. HIV in the UK 1980-2006: reconstruction using a model of HIV infection and the effect of antiretroviral therapy. *HIV Medicine* 8: 536-546.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemee V, Damond F, Robertson DL, Simon F 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 15(8): 871-872.

Puig T, Perez-Olmeda M, Rubio A, Ruiz L, Briones C, Franco JM, Gómez-Cano M, Stuyver L, Zamora L, Alvarez C, Leal M, Clotet B, Soriano V 2000. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain. *AIDS* 14: 727-732.

Pulsinelli GA, Temin HM 1991. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. *J Virol* 65(9): 4786-4797.

Raboud JM, Harris M, Rae S, Montaner JS 2002. Impact of adherence on duration of virological suppression among patients receiving combination antiretroviral therapy. *HIV Med* 3: 118-24.

Robbins BL, Srinivas RV, Kim C, Bischofberger N, Fridland A 1998. Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R (2-phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA), Bis (isopropylloxymethylcarbonyl) PMPA. *Antimicrob Agents Chemother* 42(3): 612-617.

Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kalish M, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan FE, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 288: 55-56.

Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhake 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.

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

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

Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC 2006. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 6: 368-377.

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

Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC 2010. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in Sao Paulo, Brazil. *Virology* 7: 74.

Santos AF, Schrago CG, Martinez AM, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM, et al 2007. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31\_BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 328-333.

Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, et al 2006. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 20: 2011-2019.

Schim van der Loeff MF, Aaby P 1999. Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS*. 13 Suppl A: S69-84.

Sepkowitz KA 2001. AIDS – The first 20 years. *N Eng J Med* 344(23): 1764-72.

Serwadda D, Gray RH, Sewankambo NK, Wabwire-Mangen F, Chen MZ, Quinn TC, Lutalo T, Kiwanuka N, Kigozi G, Nalugoda F, Meehan MP, Ashley Morrow R, Wawer MJ 2003. Human immunodeficiency virus acquisition associated with genital ulcer disease and herpes simplex virus type 2 infection: a nested case-control study in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 188(10): 1492-1497.

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

Shafer RW, Schapiro JM 2008. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS Rev* 10: 67-84.

Shet A, Berry L, Mohri H, et al 2006. Tracking the prevalence of transmitted antiretroviral drug-resistant HIV-1: a decade of experience. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 439-46.

Shindo N, Alcantara LC, Van DS et al 2002. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18(1):71-77.

Sierra S, Kupfer B, Kaiser R 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol* 34: 233-244.

Soares EA, Santos RP, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, and Soares MA 2003a. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34(5): 520-526.

Soares MA, Oliveira TD, Brindeiro RM, et al 2003b. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 17: 11-21.

Spira S, Wainberg MA, Loemba H, Turner D, Brenner BG 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 51(2): 229-240.

Sprinz E, Netto EM, Patelli M, Lima JS, Furtado JJ, da Eira M, Zajdenverg R, Madruga JV, Lewi DS, Machado AA, Pedro RJ, Soares MA 2009. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(9): 861-867.

Staprans SI, Feinberg MB 2004. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert Rev Vaccines* 3(4Suppl): 5-32.

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, et al 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in central west Brazil. *J Clin Virol* 39: 205-209.

Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC, Castelo A, Page-Shafer K, Diaz RS 2007. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 21: 116-128.



Swanson CM, Puffer BA, Ahmad KM, Doms RW, Malim MH 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *EMBO J* 23(13): 2632-2640.

Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL 2000. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saude Publica* 16: 7-19.

Tagliamonte M, Vidal N, Tornesello ML, Peeters M, Buonaguro FM, Buonaguro L 2006. Genetic and phylogenetic characterization of structural genes from non-B HIV-1 subtypes in Italy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(10): 1045-1051.

Tanuri A, Vicente AC, Otsuki K et al 1999. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 43(2): 253-258.

Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2: 461-471.

Tramuto F, Bonura F, Perna AM, Mancuso S, Firenze A, Romano N, Vitale F 2007. Genetic diversity of HIV-1 non-B strains in Sicily: evidence of intersubtype recombinants by sequence analysis of gag, pol, and env genes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23(9): 1131-1138.

Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M 2000. Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV-1 subtype F viruses leads to the identification of a new HIV-1 subtype designated K. *ARHR* 16: 139-151.

Tscherning C, Alaeus A, Fredriksson R, Bjorndal A, Deng H, Littman DR, et al 1998. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241: 181-188.

Tural C, Ruiz L, Holtzer C, et al 2002. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 16: 209-18.

- Turner BG, Summers MF 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285(1): 1-32.
- Turner BJ, Hecht FM, Ismail RB 1994. CD4+ T-lymphocyte measures in the treatment of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. A review for clinical practitioners. *Arch Intern Med* 154(14): 1561-73.
- UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance 2001. Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. *Br Med J* 322: 1087-1088.
- UNAIDS 2009. Report on the global AIDS epidemic. Geneva, UNAIDS.
- Vermelho LL, Barbosa RH, Nogueira AS 1999. [Women with AIDS: disclosing risk stories]. *Cad Saude Publica* 15(2): 369-379.
- Vicente ACP, Otsuki K, Silva NB, et al 2000. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 327-331.
- Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M 2006. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22(2): 182-187.
- Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Vincenti A, D'Elia S, Chiodo F, Ghinelli F, Bertoli A, d'Arminio Monforte A, Perno CF, Moroni M, Balotta C 2004. Risk of failure in patients with 215 HIV-1 revertants starting their first thymidine analog-containing highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 18: 227-235.
- Wang WK, Chen MY, Chuang CY, Jeang KT, Huang LM 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Immunol Infect* 33(3): 131-140.
- Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X, Laeyendecker O, Kiwanuka N, Kigozi G, Kiddugavu M, Lutalo T, Nalugoda F, Wabwire-Mangen F, Meehan MP, Quinn TC 2005. Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J Infect Dis* 191(9): 1403-1409.

Weinstock H, Respass R, Heneine W, Petropoulos CJ, Hellmann S, Luo CC, Pau CP, Woods T, Gwinn M, Kaplan J 2000. Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drug susceptibility among human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. *J Infect Dis*, 182: 330-333.

Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, et al 2005. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 192: 958-66.

Yerly S, Von Wyl V, Ledergerber B, et al 2007. Transmission of HIV-1 drug resistance in Switzerland: a 10-year molecular epidemiology survey. *AIDS* 21: 2223-9.

Zaidi I, Weinstock H, Woods T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Luo CC, Pau CP, Woods T, Gwinn M, Kaplan J 2001. Prevalence of mutations associated with antiretroviral drug resistance among HIV-1-infected persons in 10 US cities, 1997-2000. *Antiviral Ther* 6(Suppl 1): 118.

## 10. ANEXOS

---

---

**ANEXO 1.** Sistema de classificação da infecção pelo HIV do Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 1993

### **Categorias clínicas do sistema de classificação do CDC em pessoas infectadas pelo HIV**

---

#### **Categoria A**

---

Infecção assintomática pelo HIV

Infecção aguda (primária) pelo HIV com doença associada ou história de infecção aguda pelo HIV

Linfadenopatia generalizada persistente

---

#### **Categoria B**

---

Situações sintomáticas \* que não estão incluídas nas condições da categoria C. Alguns exemplos mas que não são únicos:

- Angiomatose bacilar
  - Candidíase orofaríngea (sapinhos)
  - Candidíase vulvovaginal persistente, frequente, ou que responde mal ao tratamento
  - Displasia do colo uterino (moderada ou grave/carcinoma do colo in situ)
  - Sintomas sistêmicos tais como febre (38.5°C) ou diarreia com duração superior a um mês
  - Leucoplasia oral
  - Herpes zoster envolvendo pelo menos dois episódios ou mais que um dermatomo
  - Púrpura trombocitopênica idiopática
  - Listeriose
  - Doença inflamatória pélvica, particularmente se complicada por abscesso tubar e ovárico
  - Neuropatia periférica
- 

#### **Categoria C – Critérios definidores de aids\*\***

---

Candidíase dos brônquios, traqueia ou pulmão

Candidíase esofágica

Carcinoma invasivo do colo uterino

Coccidioidomicose disseminada ou extrapulmonar

Criptococose extrapulmonar

Criptosporidiose intestinal crônica (duração superior a um mês)

Doença por citomegalovírus (além do fígado, baço ou gânglios linfáticos)

---

Retinite a citomegalovirus (com perda da visão)  
Encefalopatia associada ao HIV  
Herpes simples: úlceras crônicas (duração superior a um mês), bronquite, pneumonite ou esofagite  
Histoplasmose disseminada ou extrapulmonar  
Isosporiase intestinal crônica (duração superior a um mês)  
Sarcoma de Kaposi's Linfoma de Burkitt's (ou forma equivalente)  
Linfoma imunoblástico (ou equivalente)  
Linfoma primário cerebral  
*Micobacterium avium* disseminado ou extrapulmonar  
*Micobacterium tuberculosis* em qualquer localização (pulmonar ou extrapulmonar)  
Mycobacterium de outras espécies ou espécies não identificadas disseminada ou extrapulmonar  
Pneumonia a Pneumocistis  
Pneumonia recorrente\*  
Leucoencefalopatia multifocal progressiva  
Septicemia a Salmonella recorrente  
Toxoplasmose cerebral  
Síndrome de emaciação por HIV

---

\* Estas condições devem ter pelo menos um dos seguintes critérios: a) Situações atribuídas ao HIV ou indicativas de uma deficiência de imunidade celular; ou b) Condições consideradas medicamente como tendo uma evolução clínica ou que requerem um tratamento que é mais complicado pela infecção HIV.

\*\* Uma vez tenha ocorrido a condição para a Categoria C o doente fica com essa categoria C.

<b>Categorias pela contagem de CD4*</b>
Categoria 1: >500 CD4células/ $\mu$ l
Categoria 2: 200-499 CD4células/ $\mu$ l
Categoria 3: <200 CD4células/ $\mu$ l

\* A Categoria deve ser determinada pelo valor mais baixo de CD4 e não pelo mais recente.



**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**

**Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase - Laboratórios n° 326, 327 e  
335.**

**Telefones: (62) 32096111**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado para participar como voluntário em uma investigação sobre infecção pelo HIV/AIDS. Você será informado sobre todas as etapas da investigação. Caso você aceite participar da investigação, assine ao final deste documento. 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:** RESISTÊNCIA PRIMÁRIA AOS ARVs E DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES DO ESTADO DO TOCANTINS.

**Responsável:** Dra Mariane Martins de Araújo Stefani – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública / Universidade Federal de Goiás

**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 genéticas diferentes chamadas de subtipos. Além disto, o HIV pode mudar seu material genético e ficar resistente a drogas que são normalmente utilizadas no tratamento da infecção. O objetivo deste estudo é identificar o tipo de HIV-1 responsável pela sua infecção e analisar se este vírus apresenta alterações que fazem com que o vírus não seja destruído pelas drogas usadas para combatê-lo.

**Procedimento da Pesquisa**

Se você concordar em participar desse estudo, nós iremos fazer perguntas sobre fatores que podem levar a maior risco para infecção pelo HIV e coletar uma única amostra de sangue que apresenta um risco mínimo à saúde.

Tudo o que soubermos sobre você através do estudo (resultados de exames, entrevista) será confidencial. A sua identidade jamais será revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado de nenhuma maneira.

Os resultados sobre o tipo de HIV-1 que causou sua infecção e se este vírus sofreu alteração e pode não responder ao tratamento serão repassados 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 a investigação, você poderá contactar o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Imunologia da AIDS, Prof Dra Mariane Martins de Araújo telefone 0XX62 3209 6111 que estará disponível para esclarecer suas dúvidas.

### **Participação**

A sua participação é voluntária, você pode recusar e retirar o seu consentimento 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 integridade física, não cabendo, pois, qualquer tipo de indenização por danos, pois estes não existem.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO - Pacientes HIV positivos/aids, provenientes ou com domicílio no estado onde faz acompanhamento clínico e laboratorial.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO - Pacientes HIV positivos/aids que não morem nem sejam provenientes da área de estudo, pacientes HIV positivos/aids que tenham os 2 últimos resultados de Carga Viral indetectável ou resultados de contagens de CD4 inferiores a 200 células/uL pois nestes casos, as chances de recuperação do vírus nas amostras de sangue são reduzidas.

### **Confidencialidade**

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

### **Consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_,  
RG/CPF nº. \_\_\_\_\_ concordo em participar deste estudo. Certifico que fui informado sobre o estudo, estou ciente que minha participação é voluntária, que responderei a um questionário e serei submetido a uma única coleta 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. Informo que aceito participar/ou que o menor de 18 anos sob minha responsabilidade participe da investigação.

\_\_\_\_\_

Assinatura do participante ou responsável pelo menor

\_\_\_\_\_

Assinatura do entrevistador

\_\_\_\_\_

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

Assinatura do Pesquisador

Testemunhas não vinculadas as equipe de pesquisadores:

Assistimos a informação sobre o estudo, solicitação do consentimento e o aceite do voluntário em participar

Nome \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_





**ANEXO 3: QUESTIONÁRIO PADRONIZADO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA,**  
**PARASITOLOGIA E PATOLOGIA**  
**Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase - nº 326/327/335**  
 Rua 235, esquina 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**

**DADOS GERAIS**

**UNIDADE:**..... **Data:**...../...../.....

**Nome do (a) Médico (a):**.....

**Nome do Paciente:**..... **ID:**.....

**Nº do Prontuário:**.....

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

**Endereço:**.....  
 .....

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

**Cidade de Residência nos Últimos Dez Anos:**.....

**Telefones para Contatos:**.....

**Escolaridade:**..... **Profissão:**.....

**Tipo de Exposição:**

(.....) parceiro heterossexual HIV +/-aids (.....) parceiro homossexual HIV +/-aids  
 (.....) usuário de drogas injetáveis (.....) transfusão de sangue  
 (.....) transmissão vertical (mãe/filho) (.....) outro .....

**Ano, Local e Unidade de Diagnóstico da Infecção pelo HIV:**.....

**Tem Filhos?** (.....) Não (.....) Sim **Quantos?**.....

**Tem Algum Filho com HIV/aids?** (.....) Não (.....) Sim **Quantos?**..... **Qual Idade?**.....

**Em Esquema Anti-retroviral?**

(.....) Não- Naive:.....  
 (.....) Sim- Início do Tratamento:.....

**Município e Unidade da realização do tratamento:**.....

INNRT:.....

INRT:.....

IP:.....

**Último Resultado da Carga Viral:.....Data:...../...../.....**

**Último Resultado da Contagem de CD4:.....Data:...../...../.....**

**Último Resultado da Contagem de CD8:.....Data:...../...../.....**

**Observações:.....**

.....

.....

.....

.....

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pelo Questionário

Data ...../...../.....

**ANEXO 4: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



## ANEXO 5: FINANCIAMENTO DO PROJETO DE PESQUISA



**ANEXO 6: MANUSCRITO**

**MODERATE PREVALENCE OF PRIMARY DRUG RESISTANCE AND  
INTERIORIZATION OF HIV-1 SUBTYPE C IN THE INLAND NORTH STATE  
OF TOCANTINS, BRAZIL**

Bruna Coelho Carvalho<sup>1</sup>

Ludimila Paula Vaz Cardoso<sup>1</sup>

Sirlene Damasceno<sup>2</sup>

Mariane Martins de Araújo Stefani<sup>1</sup>

**Affiliation:**

<sup>1</sup>Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiânia/Goiás, Brazil.

<sup>2</sup>Public Health Central Laboratory of Tocantins/LACEN, Palmas/TO, Brazil.

**Running Title:** HIV-1 primary resistance, subtypes, Brazil

**Correspondence:** Mariane Martins de Araújo Stefani. Address: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia-Goiás/Brazil. Fax: 55 62 3209 63 63 Phone: 55 62 3209 61 11. email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

## Abstract

The diverse Brazilian AIDS epidemic has reached small cities and scant molecular information is available about the epidemic in North Brazil, where incidence is growing. This study describes primary HIV-1 drug resistance mutations and subtypes in the protease (PR) and reverse transcriptase (RT) regions among naïve patients recruited in Palmas, capital of Tocantins State, a newly built city in north Brazil. PR/RT regions were retrotranscribed from plasma HIV-1 RNA and 52 were sequenced after direct nested PCR. HIV-1 subtypes were assigned by phylogenetic analysis. Primary drug resistance was analyzed by the Calibrated Population Resistance (CPR)-Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) tool. Most patients included (59.6%) were males, median age 30 years, mainly referring heterosexual or homosexual unprotected sex. One male patient was from the Karajás indigenous tribe. Prevalence of primary resistance mutations was 11.5% (CI 95%, 4.4-23.4%): non-nucleoside-RT-inhibitor mutations (n=3), nucleoside-RT-inhibitor mutations (n=2), protease inhibitor mutation (n=1). Dual or triple class resistance was not observed. HIV-1 subtype B<sup>PR</sup>/B<sup>RT</sup> represented 78.8%, 5.8% were subtype C, 1.9% were subtype F1. Recombinant viruses represented 13.5% (07/52): B<sup>PR</sup>/F1<sup>RT</sup> (n=1), B<sup>PR</sup>/BF1<sup>RT</sup> (n=4) and C<sup>PR</sup>/CF1<sup>RT</sup> (n=2). This study about the AIDS epidemic in the recently founded city of Palmas/Tocantins in inland north Brazil shows moderate levels of primary drug resistance and the circulation of complex recombinant viruses. This pattern is similar to what has been described in major metropolitan cities, suggesting the influence of imported cases from the south/southeast. Moreover these results indicate that patients from this setting should be monitored regarding primary drug resistance mutations.

## **Introduction**

The Brazilian Ministry of Health has been providing free universal access to antiretroviral drugs (ARV) for two decades. Currently around 200000 AIDS patients are under treatment, including mainly nucleoside/non nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI/NNRTI) and protease inhibitors (PI).<sup>1</sup> Under this context of widespread ARV use, primary and secondary drug resistance mutations represent important public health issues since they may compromise further treatment options and increase the risk of virologic failure.<sup>2</sup> Surveillance studies in the USA indicate that the rates of primary resistance are either increasing (from 3.4% to 12.5%) or stable around 10% over the years.<sup>3,4</sup> An European study including ARV-naïve patients from 19 countries detected 10% primary drug resistance.<sup>5</sup> Brazilian studies including mainly from medium to large urban cities from the south/southeast and central west regions have shown low to moderate levels (5-15%) of primary drug resistance in patients infected with HIV-1.<sup>6-9</sup>

Extensive molecular epidemiology data of HIV-1 including several full length or near full-length recombinant genomes from south/southeast Brazil indicates the prevalence of subtype B, followed by subtypes F and C.<sup>10-12</sup> More recently a growing number of recombinant forms especially involving subtypes B and F1, subtypes B and C have been described throughout the country.<sup>6,7,9,13-19</sup>

Most of what is known about HIV-1 drug resistance and molecular epidemiology in Brazil reflects the southeast region, considered the epicenter of the epidemic where the prevalence has been considered stable at 0.6% (around 600000 individuals).<sup>1</sup> However several evidences indicate that the epidemic continues to grow in other parts of the

country such as the north region.<sup>1</sup> Scarce molecular information is available about the epidemic in North Brazil which represents almost half of the country's territory comprising the Amazon region and is characterized by low demographic density and AIDS prevalence.<sup>20-22</sup>

This study reports for the first time HIV-1 drug resistance mutations and subtypes circulating among ARV naïve patients recruited in the newest Brazilian State capital, Palmas from the inland North State of Tocantins in Brazil.

## **Materials and Methods**

### Study area, patients and methods

The study area was Palmas city (around 220000 inhabitants; 10°South/48°West), capital of the Tocantins State in the north Brazilian region, legally created in 1989 from the division of the Goiás State, which accounts around 1300 notified AIDS cases.<sup>1</sup> Patients with confirmed diagnosis of HIV-1 infection were recruited at the regional Public Health Central Laboratory (LACEN- reference laboratory for CD4 counts and plasma viral load (PVL) assessments) in Palmas between 2008-2010. Inclusion criteria were patients with recent or chronic diagnosis of HIV-1 infection, from both sexes, of any age range, never treated with any ARV drug. Local Ethical Committee (CEPMHA/HC/UFG) approved this study and all included patients signed an informed consent. For the patient under 18 years, the informed consent was signed by the legal guardian. A standardized questionnaire was used to collect the socio-behavioral, clinical and laboratory data (HIV RNA load: *branched-chain* DNA - bDNA, SIEMENS; CD4 counts: FACSCalibur, Becton Dickison).



For the molecular study the RNA was extracted from plasma (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) (Invitrogen) and used as the target for nested polymerase chain reaction (nested-PCR) employing HIV-1 PR and RT K1/K2 external primers and DP10/F2 internal primers, as previously described.<sup>7</sup> The reaction products were sequenced using ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). All generated sequences were subjected to quality control analysis by HIV-1 Quality Analysis Pipeline Tool (<http://www.sanbi.ac.za>) and screening by visual inspection of the alignment by Bioedit software to exclude sample mix-ups and contaminations.<sup>23,24</sup>

HIV-1 genetic subtypes were defined by REGA automated genotyping tool version 2.0 and phylogenetic inference.<sup>25</sup> Study sequences were aligned with reference set from the Los Alamos HIV database ([ww.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)) using the Clustal X software and adjusted manually by the BioEdit software.<sup>24</sup> Phylogenetic inferences were performed by the Neighbor-Joining (NJ) method under Kimura's two-parameter correction using MEGA4 software.<sup>26</sup> *Bootstrap* values (1000 replicates) above 70% were considered significant. Isolates with discordant subtypes in the PR and RT regions were analyzed by SIMPLOT 3.5.1 software in 200 bp sliding window advanced in 20 bp steps size increments (1000 replicates).<sup>27</sup> Sequences were gap-stripped, the transversion-to-transition ratio was set to 2.0, and distances were calculated according to Kimura's two-parameter model.

Primary drug resistance was analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool employing the Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) ([hivdb.stanford.edu](http://hivdb.stanford.edu)).<sup>28</sup> ARV mutation susceptibility profile was defined by Stanford HIV Drug Resistance Database. (Accessed: December/2010).

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**

Fifty-two ARV drug naïve HIV-1 infected patients were included in this study: 59.6% (31/52) were males; median age was 30 years (14-65 years range). The predominant risk factor was heterosexual unprotected sex (73.1%, 38/52), followed by 17.3% (09/52) men who have sex with men (MSM), one injecting drug user, one vertical transmission patient (14 years old) and one blood transfusion case. One of the patients was from the Karajás indigenous tribe (600 inhabitants) from north Brazil, 19 patients lived in Palmas city and the rest came from smaller rural cities from Tocantins State. The median of CD4 cell counts (n=51) was 380 cells/ $\mu$ L (25-1082 cells/ $\mu$ L range) and the median of PVL (n=50) was 26605 copies/mL (553-307834 copies/mL); for one patient CD4 cell count was not available and for two patients PVL were missing. Almost half of the patients (24/50) had PVL between 10000 and 100000 copies/mL, 12 patients had PVL below 10000 copies/ml and 14 patients had PVL above 100000 copies/mL.

According to SDRM-2010 database , 11.5% (06/52) (CI 95%, 4.4-23.4%) of the isolates presented primary drug resistance mutations. The individual mutation profiles of naïve patients with primary resistance to ARV are depicted in Table 1. Resistant isolates presented mutations associated with only one class of ARV drug. Three patients presented mutations associated with NNRTI, two patients had mutations associated with NRTI and one patient had mutations associated with PI. The median age of naïve patients with resistant mutations was 30 years (21-42 years range); the median CD4

count was 413 cells/ $\mu$ L (244-611 cells/ $\mu$ L) and the median of PVL was 48199 copies/mL (5361-141124 copies/mL range).

Most HIV-1 *pol* sequences analyzed (86.5%, 45/52) clustered with one subtype in PR and RT genes: 78.8% (41/52) were assigned subtype B, 5.8% (03/52) were subtype C and one patient was subtype F1 (Figure 1). Seven clusters with high support values (>70%) were observed among HIV-1 subtype B isolates from naive patients recruited. Seven isolates (13.5%) had discordant HIV-1 subtypes in PR and RT genes and BF1 and CF1 recombinations were confirmed by bootscanning analysis (Figure 2): B<sup>PR</sup>/F1<sup>RT</sup> (n=1), B<sup>PR</sup>/BF1<sup>RT</sup> (n=4) and C<sup>PR</sup>/CF1<sup>RT</sup> (n=2). The C<sup>PR</sup>/CF1<sup>RT</sup> isolates also represented a cluster with high support value in the phylogenetic tree (data not shown). All the six HIV-1 isolates with primary resistance mutations were HIV-1 subtype B. Figure 3 summarizes the HIV-1 genetic diversity among naive patients from Tocantins State.

## **Discussion**

The diverse Brazilian AIDS epidemic that started in the southeast has reached small cities throughout the country and not much is known about the prevalence of primary drug resistance mutations and the circulating HIV-1 genetic forms in inner smaller cities. This study adds important molecular data about the AIDS epidemic in the newest state capital in Brazil located in the lowest populated and less industrialized North region. So far only three studies had described the molecular epidemiology of HIV-1 in North Brazil.<sup>20-22</sup> This is the first report about the molecular characteristics of the epidemic in the Tocantins State, north Brazil which was legally created in 1989. In this setting we observed a moderate level of primary drug resistance, higher than observed

in other larger metropolitan cities. Moreover extensive HIV-1 genetic diversity, including distinct recombinant forms, was detected.

This study represented a unique opportunity to describe the molecular characteristics of the HIV-1 epidemic in a new, diverse and growing setting in inland north Brazil such as the recruiting site. Palmas, a new planned city, built in an area that belonged to several farms, is still known as the “capital of opportunities” attracting thousands of migrants from all over the country. While Palmas, where naïve patients were recruited, is only two decades old, most of the other cities in the state, from where half of the naïve patients came from, date back to the Portuguese colonial period when missionaries from the north and gold seekers from the south arrived and settled. Tocantins State is also home of some indigenous reservations such as “Karajás Tribe”, from where one the patients, reporting heterosexual risk exposure came from. Sexual relationships with prostitutes from neighboring villages are frequent among male indians in Brazil, although the possibility of homosexual practice cannot be excluded.<sup>22</sup> We have not investigated the prevalence in this tribe, but low prevalence of HIV-1 infection have been reported in other tribes from the north Amazon region.<sup>29-31</sup> Among 155 native indigenous from Tiriyo Tribe in the Amazon region, one male individual was found to be infected with HIV-1.<sup>21</sup> We have to point out the possibility of transmission/dissemination of HIV-1 by this male Karajá indian to his sexual partner(s) within and outside the tribe. This issue highlights the importance of assessing and monitoring the prevalence of sexually transmitted infectious diseases, such as AIDS, within unprotected, culturally distinct and threatened indian communities in remote areas of Brazil, also to preserve their fertility and life span.

This study reported a moderate level of transmitted drug resistance in this inland city in North Brazil (11.5%) above rates observed in most studies in the country and similar to rates observed in developed nations among recently infected individuals.<sup>32</sup> We believe that the prevalence of primary resistance mutations found in Palmas was surely influenced by migrants infected with HIV-1 that came from larger metropolitan areas characterized by a longer exposure to ARV drugs and therefore higher prevalence of transmitted resistance. The first Brazilian survey in 2001 which showed 6.6% primary drug resistance included 17 samples from Pará State in the North region but no resistance mutation was detected.<sup>6</sup> More recent Brazilian multicentric studies reported levels of transmitted drug resistance ranging from 5.7% (95% CI, 4.4-9.6%) to 8.1% (95% CI, 4.8-12.6%) among patients especially from the biggest metropolitan cities.<sup>8,9</sup> The study showing 5.7% primary drug resistance included 387 naïve patients from 13 Brazilian cities, mainly from the south/southeast.<sup>9</sup> The other recent multicentric survey reported 8.1% primary drug resistance mutations among patients from the six most populated state capitals in Brazil (São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Porto Alegre, Brasília and Belém). In this study, the data from Belém/Para state in the north and from Brasília in central-west were analyzed together and 3 resistant cases were reported.<sup>8</sup> In Recife, northeast Brazil 3.6% primary drug resistance was observed in patients recruited in 2003-2004.<sup>33</sup> A recent study from Goiás State, from which Tocantins State was split, showed 8-10% primary drug resistance among naïve patients.<sup>7</sup> Although most studies have indicated stable low to moderate levels of primary drug resistance in Brazil, high levels were reported in some settings.<sup>34,35</sup> Altogether these data including the ones herein reported highlight the need for continued surveillance studies about primary drug resistance throughout the country, especially in a new, fast growing city as Palmas.

The first molecular epidemiology data from north Brazil described equal proportions of HIV-1 subtypes B and F and 45.16% mosaic forms of subtypes B, C and F among 31 infected individuals that attended a Counseling and Testing AIDS center in Manaus, Amazon State.<sup>20</sup> In patients from Belém/Pará State and Macapá/Amapá State in north Brazil C2V3 and PR sequences showed predominance of HIV-1 subtype B, the circulation of subtype F, the introduction of subtype D, CRF02\_AG and several possible recombinant forms.<sup>22</sup> Our study showed besides the predominance of HIV-1 subtype B<sup>PR/RT</sup> the circulation of HIV-1 subtype C<sup>PR/RT</sup>, that prevails in southern states, and one patient infected with subtype F1<sup>PR/RT</sup>. Similar to what has been described in the southern states a significant proportion of isolates (~14%) were recombinant viruses mostly including subtypes B and F1. Additionally another recombinant profile C<sup>PR</sup>/CF1<sup>RT</sup>, including two subtypes that are not prevalent, was also detected among two patients. Since in this setting the prevalence of subtype F and C was low, it is more likely to suppose that these recombinants, especially the CF1 forms were imported from larger metropolitan cities in south Brazil where these subtypes co-circulate at a higher frequency and have a higher chance to cause co-infection or superinfection and generate recombinant forms. Overall our molecular epidemiology data suggest the influence of epidemic from the south/southeast in the beginning of the epidemic and the dissemination of several subtype B clusters locally. Interestingly one these clusters was represented by the two C<sup>PR</sup>/CF1<sup>RT</sup> isolates identified.

The native indigenous patient from Karajás Tribe described in the current study was infected with HIV-1 subtype B confirming the introduction and circulation of this subtype among indians from north Brazil, similarly to what was found in the Tiriyo tribe.<sup>21</sup> The first HIV-1 subtype C sequences from Tocantins State formed a

monophyletic cluster with other subtype C sequences from the remote south region indicating the impact of this region upon the epidemic in north Brazil. Overall the molecular epidemiology results from Tocantins State, indicate complex genetic patterns similar to what has been described in major metropolitan regions, suggesting the influence of imported recombinant viruses in the epidemic, especially in the recently founded city of Palmas.

Although a relatively small sample size was investigated, this study group represented around 40-50% of ARV naïve patients from this area in that period (personal communication) as both the incidence of HIV-1 infection and the demographic density in this setting are low. Another potential limitation of the study could be undisclosed previous ARV use, if any participant did not report prior treatment. Although this cannot be completely ruled out, one evidence that reinforces that the included patients were indeed ARV naïve was the absence of International Aids Society (IAS-USA) defined dual-triple class drug resistance-associated mutations, which would be expected in ARV-experienced subjects.<sup>36</sup> Although we do not know the date of infection of these naïve patients studied, considering the CD4 cell counts, most of them were chronically infected individuals. Recently infected subjects may be more likely to harbor resistance mutations than subjects infected for 1 year or more. However certain resistance-associated mutations may persist for months or years after detection in ARV naïve individuals, presumably because these mutations do not confer a significant fitness disadvantage to the virus. Resistance associated mutations with little or no impact on viral fitness can be detected in virus from ARV naïve individuals (or in individuals who have interrupted therapy) for longer periods of time than mutations that impose a great fitness cost to the virus.<sup>37</sup> Transmitted NNRTI resistance-associated mutations represent

the best studied of these mutations, and some studies suggest that some of these mutations can persist for years post infection in untreated, HIV infected patients.<sup>38</sup> In our study group decreased NNRTI susceptibility predominated among the three drug classes. Mutations which tend to be less stable in the absence of drug selection pressure and which predominate in newly infected or newly treated patients such as M184V and K65R, were not observed. Furthermore, seven HIV-1 isolates from this study presented mutations with potential low-level resistance profile (T74S, Q58E, L33F and V179D/E), however these mutations have no relevant clinical significance.

Overall, this survey in Tocantins State, north Brazil, indicates the dynamic aspect of the HIV-1 epidemic in this fast growing setting and suggest a strong influence of imported cases from the south/southeast together with several clusters of internal HIV-1 dissemination. In this fast growing setting in a geographically remote area, continuous studies should monitor HIV-1 genetic diversity and the pre-existence of circulating drug-resistant strains among drug naïve individuals which should indicate if these patients might benefit from pre-treatment genotypic tests.

### **Acknowledgments**

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



## **Sequence Data**

GenBank accession numbers of the sequences presented in this study are GU214066 - GU214102, GU214111, HM583573 - HM583586.

## **Disclosure Statement**

No competing financial interests exist.

## **References**

1. Brasil, Boletim Epidemiológico AIDS.DST ano VII nº 01, Programa Nacional de DST e AIDS. 2010 Ministério da Saúde: Brasília.
2. Gallant JE. Approach to the treatment-experienced patient. *Infect Dis Clin North Am* 2007; 21(1):85-ix.
3. Little SJ, Holte S, Routy JP et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347(6):385-394.
4. Ross L, Lim ML, Liao Q et al. Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance-associated mutations in antiretroviral therapy-naive HIV-infected individuals from 40 United States cities. *HIV Clin Trials* 2007; 8(1):1-8.
5. Wensing AM, van d, V, Angarano G et al. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005; 192(6):958-966.

6. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17(7):1063-1069.
7. Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. *J Clin Virol* 2009; 46(2):134-139.
8. Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc* 2009; 12(1):20.
9. Sprinz E, Netto EM, Patelli M et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2009; 25(9):861-867.
10. Sanabani S, Kleine NW, Kalmar EM 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 Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 2006; 6(5):368-377.
11. Sanabani S, Neto WK, de Sa Filho DJ et al. Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22(2):171-176.

12. Guimaraes ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008; 22(3):433-435.
13. Guimaraes ML, dos Santos MA, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(17):1261-1269.
14. Gadelha SR, Shindo N, Cruz JN, Morgado MG, Galvao-Castro B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(4):461-463.
15. Sa Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS et al. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21(2):145-151.
16. Soares EA, Martinez AM, Souza TM et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19 Suppl 4:S81-S86.
17. Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22(1):1-13.
18. Santos AF, Sousa TM, Soares EA et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 2006; 20(16):2011-2019.

19. Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in Sao Paulo, Brazil. *Virology* 2010; 7:74.
20. Vicente AC, Otsuki K, Silva NB 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* 2000; 23(4):327-331.
21. Machado LF, Vallinoto AC, Souza MI et al. Serological and molecular typing of HIV type 1 infection in the Tiriyo tribe, a native Indian community of the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22(12):1267-1270.
22. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC 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* 2009; 25(10):961-966.
23. Lehvaslaiho H, Hide W, Oliveira T. South African National Bioinformatics Institute, University of Western Cape, South Africa. <http://www.sanbi.ac.za>. (May/2010, date last accessed).
24. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.

25. de OT, Deforche K, Cassol S et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005; 21(19):3797-3800.
26. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol and Evol* 2007; 24: 1596-9.
27. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999; 73(1):152-160.
28. Gifford RJ, Liu TF, Rhee SY et al. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. *Bioinformatics* 2009; 20:1-3.
29. Andrada-Serpa MJ, Dobbin JA, Gomes P et al. Incidence of retroviruses in some Brazilian groups. *Immunol Lett* 1988; 18(1):15-18.
30. Ishak R, Harrington WJ, Jr., Azevedo VN et al. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11(7):813-821.
31. Shindo N, Alcantara LC, Van DS et al. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18(1):71-77.

32. Weinstock H, Respass R, Heneine W et al. Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drug susceptibility among human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. *J Infect Dis* 2000; 182(1):330-333.
33. de Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AM, de Albuquerque MF. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(8):845-849.
34. Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC 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* 2007; 45(2):251-253.
35. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007; 21(2):116-128.
36. Caseiro MM, Golega AA, Etzel A, Diaz RS. Characterization of virologic failure after an initially successful 48-week course of antiretroviral therapy in HIV/AIDS outpatients treated in Santos, Brazil. *Braz J Infect Dis* 2008; 12(3):162-166.
37. Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):247-277.
38. Geretti AM. Clinical implications of HIV drug resistance to nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitors. *AIDS Rev* 2006; 8(4):210-220.

**Adress reprint requests to:**

Mariane Martins de Araújo Stefani

Universidade Federal de Goiás

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Rua 235, s/n Setor Universitário

Goiânia GO, Brazil 74605-050

email: [mariane.stefani@pq.cnpq.br](mailto:mariane.stefani@pq.cnpq.br)

**FIGURE 1.**

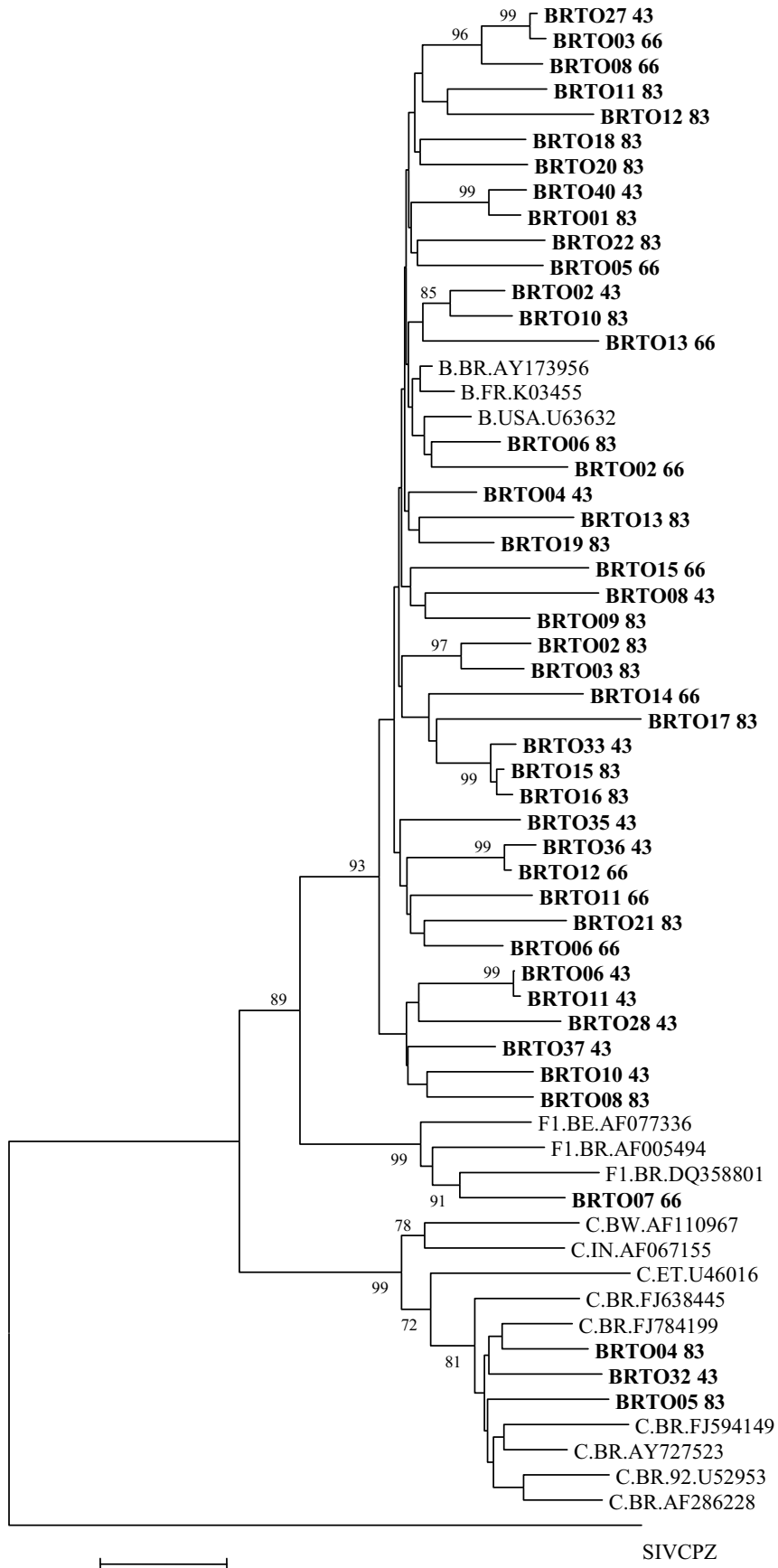




FIGURE 2.

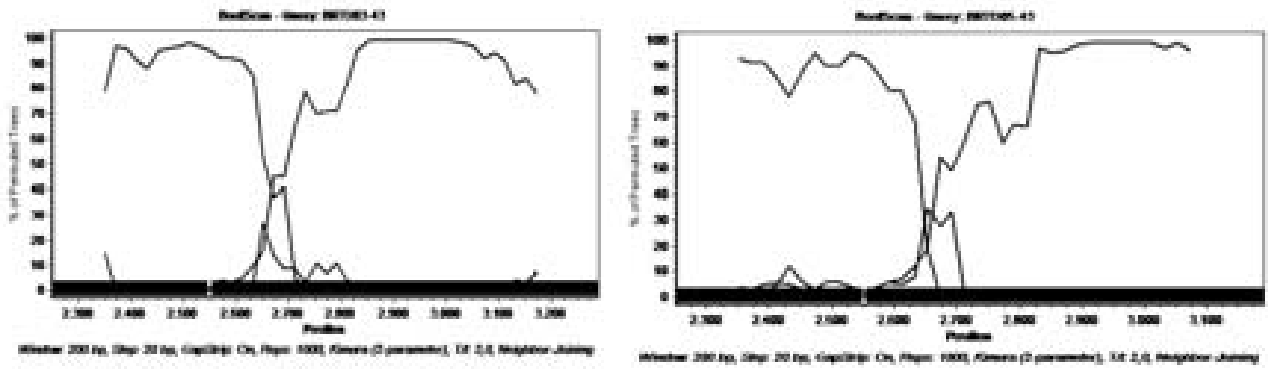
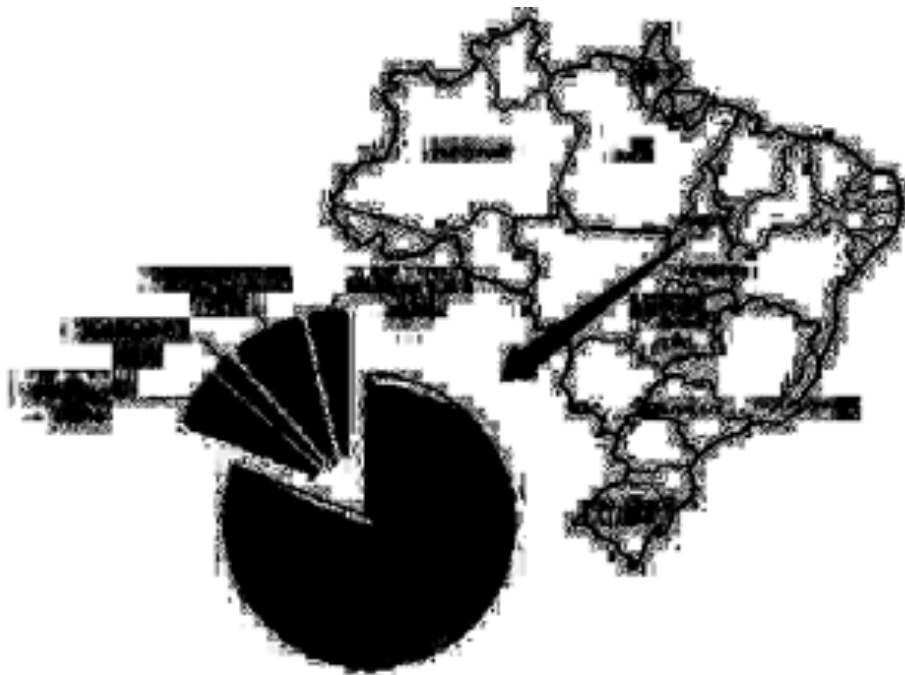


FIGURE 3.



**TABLE 1.** HIV-1 PR and RT primary drug resistance mutations in isolates of naïve patients from Tocantins State, north Brazil.

Sample GenBank Accession Number	Route of infection/Gender age/ HIV-1 Subtype PR/RT	CD4 (cells/ $\mu$ l) / PVL (copies/mL)	PI			NRTI Mutations	NNRTI Mutations	Resistance Profile		
			Minor Mutations	Major Mutations	Mutations			Low	Intermediate	High
BRTO08-43	Unknown/M/	611 / 62743	-	-	M41L, L210W, T215D	-	-	ABC, AZT, d4T, ddI, TDF	-	-
GU214071	42/B									
BRTO02-83	Hetero/F/	244 / 94154	-	-	-	Y181C	-	EFV, ETR	DLV, NVP	
GU214083	40/B									
BRTO13-83	MSM/M/	378 / 33654	-	-	D67G, K219E	-	d4T	AZT	-	
GU214094	30/B									
BRTO20-83	Hetero/F/	511 / 141124	-	-	-	V108I, Y181C	-	EFV, ETR	DLV, NVP	
GU214100	30/B									
BRTO02-66	Hetero/F/	381 / 5887	-	M46L	-	-	ATV, FPV, IDV, LPV	NFV	-	
HM583573	23/B									
BRTO13-66	MSM/M/	444 / 26764	-	-	-	V90I, K103N	-	-	DLV, EFV, NVP	
HM583584	21/B									

PI: protease inhibitors; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. PVL: plasma viral load; Hetero: heterosexual; MSM: men who have sex with men. M: male, F: female. ABC: abacavir; ATV: atazanavir; AZT: zidovudine; ddI: didanosine; DLV: delavirdine; d4T: stavudine; EFV: efavirenz; ETR: etravirine; FPV: fosamprenavir; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine and TDF: tenofovir.

**FIGURE 1.** Phylogenetic classification in PR and RT genes. The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analysis are subtype B: AY173956, K03455 and U63632; subtype C: FJ594149, FJ638445, FJ784199, AY727523, U52953, AF286228, AF110967, U46016 and AF067155; subtype F1: AF077336, AF005494 and DQ358801 and the simian immunodeficiency virus sequence from chimpanzee (SIVcpz): X52154. Sequences from Tocantins State are in bold.

**FIGURE 2.** Bootscanning analysis of HIV-1 *pol* sequences of 2/6 recombinant viruses from Tocantins State. The GenBank accession numbers used in the analysis are subtype A: AF004885; subtype B: AY173956 and K03455; subtype C: U52953 and AF286228; and subtype F1: AF077336 and AF005494.

**FIGURE 3.** HIV-1 subtypes in protease and reverse transcriptase genes circulating among patients from Tocantins State, north Brazil.