



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA
GENOTÍPICA SECUNDÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM
PACIENTES COM AIDS E PREVALÊNCIA DE SUBTIPOS DO
HIV-1 NOS ESTADOS DO PARÁ E AMAZONAS, BRASIL: 2002
A 2006**

OLINDA MACÊDO

Belém – Pará

2010

OLINDA MACÊDO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA
GENOTÍPICA SECUNDÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM
PACIENTES COM AIDS E PREVALÊNCIA DE SUBTIPOS DO
HIV-1 NOS ESTADOS DO PARÁ E AMAZONAS, BRASIL: 2002
A 2006**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia dos Agentes Infeciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários.

Belém – Pará

2010

Macêdo, Olinda

Caracterização molecular da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com Aids e prevalência de subtipos do HIV-1 nos estados do Pará e Amazonas, Brasil: 2002 a 2006 / Olinda Macêdo. Belém: Universidade Federal do Pará, 2009.

109f.: il.; 30cm.

Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

1. Terapia Antirretroviral de Alta Atividade. 2. HIV-1 - mutação. I. Universidade Federal do Pará. II. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616.071.9

"Se vi ao longe é porque estava nos ombros dos gigantes"

(Aristóteles)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao Prof. Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos, por aceitar me orientar colaborando, com críticas e correções durante a realização deste trabalho.

À Diretora do Instituto Evandro Chagas (IEC) Dra. Elisabeth Conceição de Oliveira Santos pela boa vontade de ver acontecer o crescimento de todos os profissionais desta instituição.

Ao Coordenador do programa de Mestrado em Biologia dos Agentes Infecciosos e Parasitários (BAIP) da UFPA.

À Bibliotecária Vânia Araújo por sua incansável dedicação e pela competência em dirigir profissionais de alto nível tão bem afinados com o nosso objetivo.

Ao meu pai Othon, minha mãe Hilda e meu irmão “Tinho” *in memorium* por iluminarem o meu caminho me dando a certeza de que sempre é tempo de recomeçar.

À minha família (Oneide, Mara, Nildo, sobrinhos...) unida pelo amor, carinho, tão necessários ao equilíbrio do ser humano.

Aos colegas de Laboratório, Raimundo e Celina pela fundamental ajuda na realização técnica desta tarefa.

À sobrinha Luciana Macêdo pelo apoio na digitação e correção bibliográfica.

Aos demais colegas do Laboratório de Virologia pelo incentivo.

Ao Marcos Loyola pelo incondicional apoio, amizade e dedicação neste momento.

À todos os pacientes minha total e eterna gratidão pois sem eles nada seria possível.

À todos os colegas do Mestrado, pelo constante estímulo e amizade expressados na nossa jornada de trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | 9 |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS..... | 10 |
| RESUMO..... | 12 |
| ABSTRACT..... | 13 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE HIV E AIDS..... | 14 |
| 1.2 MORFOLOGIA | 17 |
| 1.2.1 Genoma..... | 18 |
| 1.2.2 Ciclo de Replicação..... | 19 |
| 1.3 PATOGENICIDADE..... | 21 |
| 1.4 HETEROGENEIDADE GENÉTICA..... | 23 |
| 1.5 EPIDEMIOLOGIA..... | 25 |
| 1.5.1 Modos de transmissão..... | 25 |
| 1.5.1.1 Sexual..... | 25 |
| 1.5.1.2 Parenteral..... | 25 |
| 1.5.1.3 Vertical..... | 25 |
| 1.5.2 Cepas resistentes..... | 26 |
| 1.5.3 Distribuição geográfica..... | 27 |
| 1.5.4 Estudos relacionando os subtipos de HIV-1 com a progressão clínica da doença..... | 29 |
| 1.5.4.1 Subtipos do HIV-1 no Brasil..... | 30 |
| 1.6 MUTAÇÕES GENÉTICAS..... | 32 |
| 1.7 TRATAMENTO..... | 33 |
| 1.7.1 Resistência a drogas antirretrovirais..... | 34 |
| 1.8 DROGAS..... | 36 |
| 1.9 QUALIDADE DE VIDA..... | 37 |
| 1.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... | 38 |
| 1.10.1 Genotipagem..... | 38 |

| | |
|--|-----|
| 1.11 OBJETIVOS | 40 |
| 1.11.1 Objetivo Geral | 40 |
| 1.11.2 Objetivos Específicos | 40 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 41 |
| 2.1 ASPECTOS ÉTICOS | 41 |
| 2.2 POPULAÇÃO ESTUDADA | 41 |
| 2.2.1 Critérios de inclusão | 41 |
| 2.2.2 Critérios de exclusão | 42 |
| 2.3 ANÁLISE MOLECULAR | 42 |
| 2.3.1 Extração do RNA | 44 |
| 2.3.2 Transcrição reversa | 45 |
| 2.3.3 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) | 47 |
| 2.3.3.1 Purificação do produto da PCR para reação de sequenciamento. | 48 |
| 2.3.3.2 Quantificação do DNA..... | 49 |
| 2.3.4 Reação de sequenciamento | 50 |
| 2.3.5 Purificação do produto de sequenciamento | 51 |
| 2.3.6 Detecção automática e análise de sequências | 52 |
| 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 52 |
| 3 RESULTADOS | 53 |
| 3.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA | 53 |
| 4 DISCUSSÃO | 67 |
| 5 CONCLUSÕES | 77 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 79 |
| ANEXOS | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Estrutura do vírus HIV-1 (Adaptada de www.aids-india.org/images/avertp12.jpg)..... | 14 |
| Figura 2 – Genoma do HIV-1 (Adaptada de www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html)..... | 16 |
| Figura 3 – Replicação do HIV-1 (Adaptado de http://www.thebody.com...)..... | 17 |
| Figura 4 – Caracterização molecular dos subtipos de HIV-1 nos estados do Amazonas e Pará, 2002-2006..... | 50 |
| Figura 5 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da RT em pacientes com falha terapêutica, estado do Pará, 2002-2006..... | 51 |
| Figura 6 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da PR em pacientes com falha terapêutica, estado do Pará, 2002-2006..... | 52 |
| Figura 7 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da RT em pacientes com falha terapêutica no estado do Amazonas, 2005-2006..... | 53 |
| Figura 8 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da PR em pacientes com falha terapêutica no estado do Amazonas, 2005-2006..... | 54 |
| Figura 9 – Frequência das mutações comuns aos subtipos B e não-B no gene da RT nos estados do Amazonas e Pará, 2005-2006..... | 55 |
| Figura 10 – Frequência das mutações comuns aos subtipos B e não-B no gene da PR nos estados do Amazonas e Pará, 2005-2006..... | 56 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|-----------------|--|
| µL | Microlitros |
| 3TC | Lamivudina |
| aa | Aminoácidos |
| ABC | Abacavir |
| Aids | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| APV | Amprenavir |
| ARV | Antirretrovirais |
| AZT | Zidovudina |
| CA | Capsídeo |
| cDNA | DNA complementar |
| CRF | Formas recombinantes circulantes |
| d4T | Estavudina |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| EFV | Efavirenz |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FDA | Food and Drug Administration |
| g | Gravidade |
| HAART | Terapia Antirretroviral de Alta Eficácia |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| HIV-1 | Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 |
| HIV-2 | Vírus da imunodeficiência humana tipo 2 |
| IDV | Indinavir |
| IN | Integrase |
| LPV | Lopinavir |
| LTR | Sequência de repetição terminal |
| MA | Matriz |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| mRNA | RNA mensageiro |
| NC | Núcleo capsídeo |
| NFV | Nelfinavir |

| | |
|-------------|---|
| nm | Nanômetros |
| NNRTI | Inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa |
| NPV | Nevirapina |
| NRTI | Inibidor nucleosídico da transcriptase reversa |
| °C | Graus centígrados |
| ORF | Fase de leitura aberta |
| Pb | Pares de base |
| PBMC | Peripheral blood mononuclear cells |
| PCR | Reação em cadeia mediada pela polimerase |
| PI | Inibidor da protease |
| PR | Protease |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| rpm | Rotações por minuto |
| RT | Transcriptase reversa |
| RTI | Inibidores da transcriptase reversa |
| RT-PCR | Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida de transcrição reversa |
| RTV | Ritonavir |
| SQV | Saquinavir |
| SU | Proteína de superfície |
| T20 | Enfuvirtida |
| TA | Temperatura ambiente |
| TAM (1) | Via mutacional 1 dos análogos a Timidínicos: 41, 210 e 215 |
| TAM (1)+(2) | Qualquer combinação de mutações das duas vias TAM aos análogos a Timidínicos: 41, 215, 210, 67, 70, 215 e 219 |
| TAM (2) | Via mutacional 2 dos análogos a Timidínicos: 67, 70 e 219 |
| TARV | Terapia antirretroviral |
| TBE | Tris, Ácido bórico, EDTA |
| TDF | Tenofovir |
| TM- | Proteína transmembrana |
| UV | Ultravioleta |

RESUMO

A resistência às drogas antirretrovirais é o inevitável resultado da incompleta supressão da replicação do HIV-1. No presente estudo foi caracterizado o perfil de resistência genética aos antirretrovirais em amostras sorológicas provenientes dos estados do Amazonas e Pará, Região Norte do Brasil, no período de 2002 a 2006. Um total de 127 amostras de plasmas obtidas de pacientes HIV positivos e/ou Aids foram submetidas ao teste de resistência pelo *ViroSeqTM Genotyping System* (Celera Diagnostic-Abbott, USA). Considerando a informação genética derivada das regiões da protease e/ou transcriptase reversa do HIV-1, o subtipo B foi observado em 85% dos casos; seguido por ambos subtipo F1 e forma recombinante BF1 (4,6%) e CF1 (0,8%). A mutação M184V (81,1%) foi a mais comumente observada associada aos NRTI, em indivíduos positivos com TARV no estado do Pará, e a mutação T215F/Y (56,3%) em indivíduos do estado do Amazonas. A mutação K103N foi a mais prevalente (em torno de 33,5%) para os NNRTI em ambos os estados. O perfil de mutação de resistência associado ao gene da protease mostrou a mutação *minor* L63P como a mais frequente em ambos os estados. O estudo revelou a importância da identificação de mutações associadas com resistência às drogas antirretrovirais para o uso em futuros esquemas terapêuticos. Os resultados deste estudo foram similares aos outros realizados em várias regiões do Brasil.

Palavras-chave: Terapia Antirretroviral de Alta Atividade, HIV-1 - mutações.

ABSTRACT

Drug resistance is a major consequence of the incomplete suppression of HIV-1 replication. In this study we characterized the HIV-1 genetic resistance profile in blood samples obtained from patients of the Amazonas and Pará states, in the Northern region of Brazil, between 2002 and 2006. A total of 127 plasma samples were collected from HIV positive/Aids patients and submitted to the analyses of resistance by ViroSeq™ Genotyping System test (Celera Diagnostic-Abbott, USA). Regarding the genetic data obtained from protease (PR) and/or reverse transcriptase (RT) genes, the subtype B was the most observed with prevalence of 85% of the cases, followed by F1 subtype and BF1 recombinant forms (4.6%) and CF1 recombinant form (0.8%). The M184V (81.1%) mutation was the most commonly observed NRTI-associated mutation in positive individuals failing HAART from Pará state, and T215F/Y mutation (56,3%) in individuals from Amazonas state. The K103N mutation was the most prevalent (about 33.5%) for non-nucleoside RT inhibitor in both states. The profile of resistance mutation associated with the PR gene displayed the minor protease mutation L63P as the most frequent in both states. This study revealed the importance of identifying mutations associated with viral resistance to antiretroviral drugs to be used in future therapeutic schemes and the results were similar to other performed in different Brazilian regions.

keywords: Antiretroviral Therapy, Highly Active, HIV-1 - mutations.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BREVE HISTÓRICO SOBRE HIV E AIDS

Desde o final dos anos 70 do século XX o mundo convive com o HIV, o vírus da imunodeficiência humana, um retrovírus que causa a Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (do inglês Aids). A Aids é uma doença infectocontagiosa causada por um retrovírus do gênero *Lentivirus* conhecido como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) com duas espécies biológicas, o HIV-1 e o HIV-2, os quais diferem no peso molecular de suas proteínas, como também apresentam diferenças nos seus genes acessórios (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983; Clavel *et al.*, 1986).

O vírus se disseminou rapidamente, por todos os continentes, e a Aids passou a ser considerada uma pandemia, responsável por milhares de mortes todos os anos. Em 1977 ocorreram os primeiros casos nos EUA, Haiti e África e em 1980 no Brasil, porém a classificação somente começou a ser feita em 1982, ocasião em que a comunidade científica reuniu informações que sugeriam a transmissão da doença pelo contato sexual, uso de drogas e transfusão de sangue e hemoderivados. Neste ano também foram identificados cinco “grupos de risco”: homossexuais, haitianos, usuários de heroína injetável, hemofílicos e profissionais do sexo.

Em 1983 foi notificado o primeiro caso de Aids em criança e em profissionais de saúde. No Brasil ocorreu o primeiro caso no sexo feminino. Em 84 o Dr. Luc Montagnier, do Instituto Pasteur na França isolou e caracterizou o

vírus HIV, apesar de haver uma animosidade com o americano Robert Galo pela primazia da descoberta.

Desde 1984 o Brasil iniciou a estruturação de seus programas de saúde ao controle da Aids, começando por São Paulo. Em 86 foi criado o Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde.

A partir daí, aconteceram importantes marcos na história da Aids como os relatados abaixo:

1985 – O primeiro teste anti-HIV é disponibilizado para o diagnóstico da Aids. Por outro lado, ficou caracterizado o termo comportamento de risco em vez de grupos de risco.

1986 – Foi criado o Programa Nacional de DST e Aids (PN DST/Aids).

1987 – O medicamento AZT anteriormente utilizado em pacientes com câncer, passou a ter o seu emprego em pacientes com Aids reduzindo a multiplicação do HIV. Ficou estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) o dia 1º de dezembro como o Dia Mundial da Luta contra a Aids.

1988 – Criação do SUS (Sistema Único de Saúde).

1991 – Início da aquisição e distribuição gratuita dos antirretrovirais pelo Ministério da Saúde do Brasil.

1993 – Maior divulgação da transmissão heterossexual do HIV e o AZT passou a ser produzido no Brasil.

1994 – Estudo demonstra que o medicamento zidovudina (AZT) reduziu a transmissão de mãe para filho na gravidez e no parto e é definido o diagnóstico em crianças.

1995 – Descobrimto de outras drogas antirretrovirais, entre elas os inibidores de protease (PI).

1996 – Houve queda das taxas de mortalidade e o aumento do número de casos em mulheres.

1997 – Foi implantada a Rede Nacional de Laboratórios

1998 – O “coquetel” como ficou conhecido o TARV no Brasil, conseguiu que muitos pacientes atingissem carga viral indetectável no sangue durante o tratamento.

1999 – A mortalidade dos pacientes com Aids cai 50%.

2000 – A África é o continente mais afetado do mundo onde: Dezesete milhões morreram de Aids, 3,7 milhões eram crianças e 8,8% dos adultos estavam contaminados.

Na última década, a comunidade científica dedicou seus esforços na direção do desenvolvimento de novos medicamentos antirretrovirais, pesquisas de vacinas para o HIV e pesquisas sobre métodos e ações preventivas.

No Brasil, de 1980 a 2009 os casos acumulados notificados foram 544.846 pessoas infectadas pelo HIV, porém, a estimativa era de que 630.000

peças vivesses com HIV/Aids no país, 0,61% da população entre 15 e 49 anos de idade. Desde 1980 até 2008, 217.091 pessoas morreram em consequência da Aids (Haanwinckel, 2010).

1.2 MORFOLOGIA

Como observado na Figura 1, o HIV-1 apresenta forma esférica, envelope externo lipoproteico oriundo da membrana externa da célula hospedeira, possui diâmetro médio de cerca de 100 nanômetros (nm), com simetria icosaédrica; o genoma viral é constituído de ácido ribonucléico (RNA) com duas fitas simples, dependente de uma RNA polimerase a transcriptase reversa (Veronese *et al.*, 1985; Luciw, 1996) como observado na Figura 1.

Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 apresentam diferentes subtipos que se distinguem por suas seqüências nucleotídicas e relações filogenéticas (Hahn *et al.*, 2000).

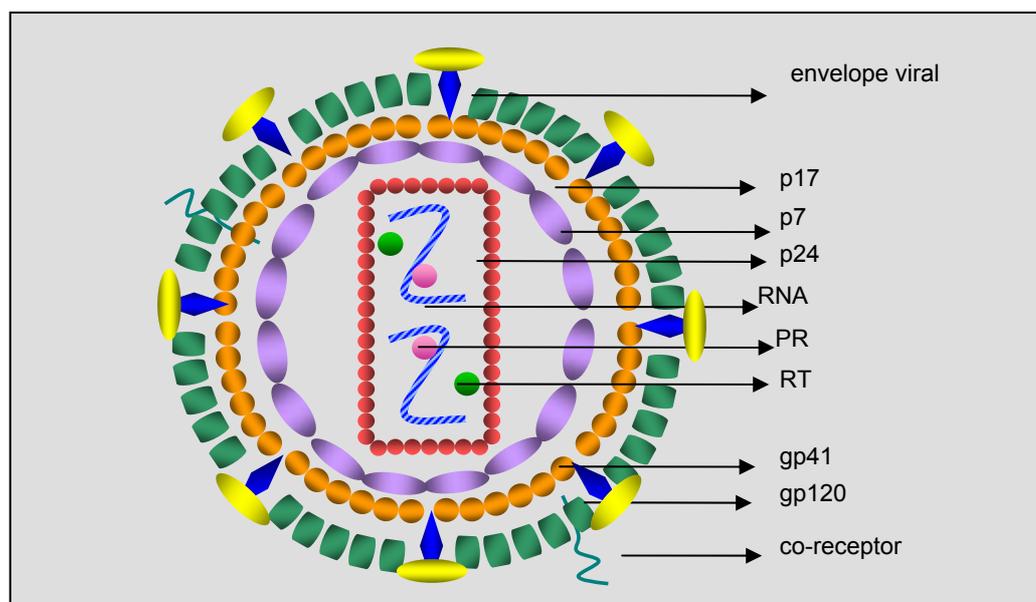


Figura 1 – Estrutura do HIV-1. (Adaptada de www.aids-india.org/images/avertp12.jpg)

1.2.1 Genoma

O genoma do HIV-1 apresenta 9,8 Kilobases (Kb), possui nove genes e duas regiões nas extremidades 5' e 3' denominadas sequências de repetição terminal (LTR), onde estão presentes elementos de controle para integração, transcrição e poliadenilação do RNA mensageiro (mRNA). Os genes dividem-se em dois grupos: os que codificam as proteínas estruturais conhecidos (*gag*, *pol* e *env*) e os que codificam as proteínas não estruturais (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu*, e *vpr*) conforme ilustrado na (Figura 2) (Muesing *et al.*, 1985).

A região *gag* codifica as proteínas da matriz p17 (MA), do capsídeo viral p24 (CA), núcleocapsídica p7 (NC) e p6; a região *pol* codifica a protease p10 (PR), (RT) transcriptase reversa p66/p51, e integrase p32 (IN); e, finalmente, a região *env* é responsável pela codificação das proteínas do envoltório, gp120 de superfície (SU) e gp41 transmembrana (TM). As proteínas acessórias (*tat* e *rev*) estão relacionadas à regulação da expressão gênica do HIV-1 (Vaishnav & Wong-Staal, 1991; Frankel & Young, 1998).

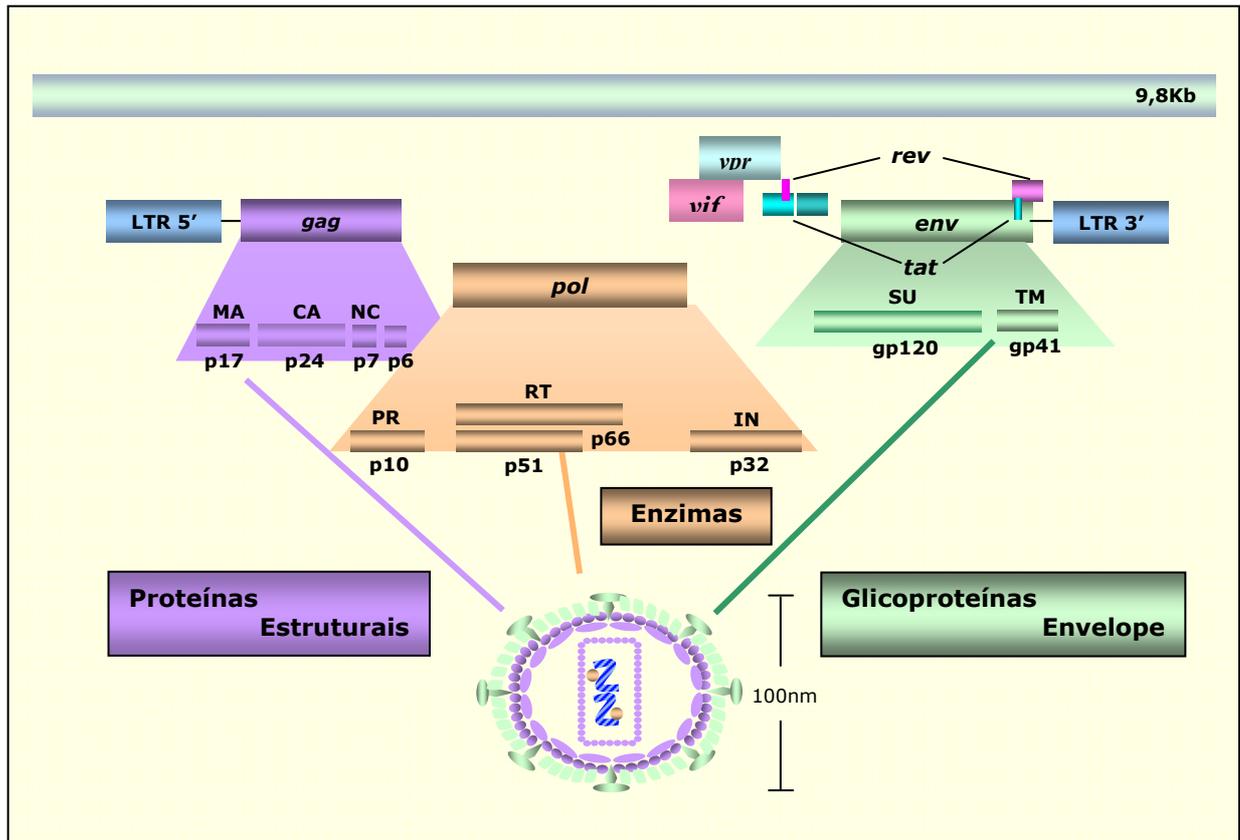


Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HIV-1 (Adaptada de www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html)

LTR – Sequência de repetição terminal,

gag, *pol* e *env* – genes que codificam as proteínas estruturais

tat, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, e *vpr* – genes que codificam as proteínas não estruturais

região *gag* – codifica as proteínas da MA p17, CA p24, NC p7 e p6

região *pol* – codifica a PR p10, RT p66/51 e IN p32

região *env* – codifica as glicoproteínas do envoltório, gp120 de superfície e gp41 transmembrana,

1.2.2 Ciclo de Replicação

O HIV-1, conforme demonstrado na Figura 3, inicia sua replicação com a adsorção das partículas do vírus às moléculas CD4⁺ encontradas na superfície de células suscetíveis. Embora a ligação de vírions ao CD4⁺ seja essencial para a infectividade do HIV, sua subsequente interação com co-receptores membros da subfamília de quimiocinas, formada por sete receptores de domínios transmembranares, tendo como os mais importantes o

CCR5 e o CXCR4, induz uma mudança conformacional na subunidade gp41, que resulta na inserção de um peptídeo de fusão na membrana celular e a ligação da região helical 1 e 2 da gp41, permitindo a fusão da membrana viral e celular (Furuta *et al.*, 1998). Dessa maneira, os co-receptores são requeridos para que haja a fusão da membrana e entrada da partícula viral na célula hospedeira (Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996).

Após a fusão, uma vez no interior da célula, há liberação do núcleocapsídeo viral contendo o genoma viral para o citoplasma da célula hospedeira, expondo seu material genético, constituído por duas fitas simples de RNA. O RNA viral é então convertido numa cadeia simples de ácido desoxirribonucléico (DNA) por ação da enzima Transcriptase Reversa (RT), e a outra fita de RNA é degradada pela ribonuclease H. Em seguida, a cadeia de DNA é duplicada e, sob esta forma, o material genético do vírus é integrado ao núcleo da célula hospedeira (Provírus), processo este catalisado pela enzima IN.

O Provírus então é integrado podendo permanecer latente/ou também pode fazer com que a célula sintetize mRNA viral. Uma parte deste pode ser traduzido pelos ribossomas da própria célula, para a produção de proteínas virais. Neste momento, a enzima PR desempenha um papel central, processando os precursores protéicos *gag* e *gag-pol* das proteínas do capsídeo, da RT e da PR.

Finalmente, ocorre a montagem das proteínas virais e do RNA do vírus para a formação de novas partículas, que se liberam da célula por

brotamento (Veronesi *et al.*, 2000), levando consigo parte do envoltório proveniente da membrana da célula hospedeira (Turner & Summers, 1999).

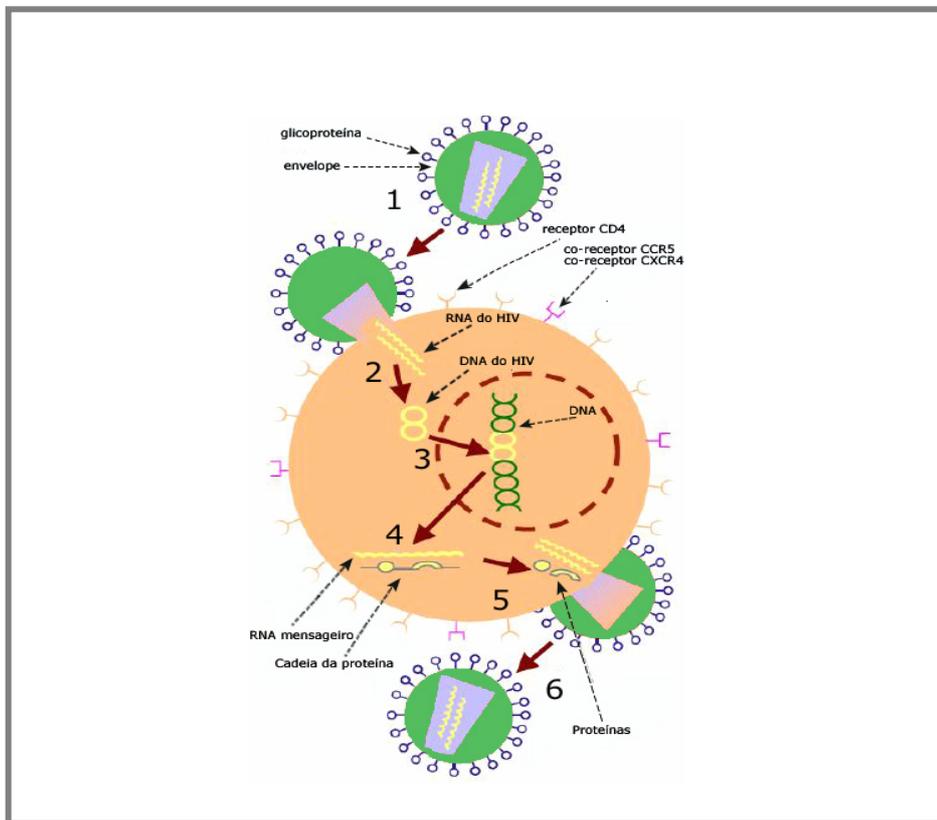


Figura 3 – Replicação do HIV-1 (Adaptado de <http://www.thebody.com>).

Estágios da replicação:

- 1 – Envelope viral com suas glicoproteínas;
- 2 – RNA do HIV-1
- 3 – DNA do HIV-1
- 4 – RNA mensageiro e cadeia de proteína
- 5 – Proteínas
- 6 – Novo vírus

1.3 PATOGENICIDADE

O HIV infecta e destrói células que são críticas para a resposta imune efetiva. Esse agente viral infecta principalmente células T com marcadores superficiais CD4⁺ (Perelson *et al.*, 1996; Ho, 1998).

A molécula CD4⁺ é uma glicoproteína que pode ser detectada na superfície de cerca de 60% dos linfócitos T, dos precursores das células T dentro da medula óssea e do timo, nos monócitos, macrófagos, células dendríticas e células da microglia do sistema nervoso central, cuja diminuição causa depleção física e funcional do sistema imune do organismo (Douek *et al.*, 2002).

A interação direta das glicoproteínas do envelope viral e seu receptor celular, com os receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 (Choe *et al.*, 1996; Choe, 1998), resulta na infecção viral das células-chave para a resposta imune adaptativa, resultando assim nas manifestações clínicas da doença e na profunda supressão imune (Berger *et al.*, 1999).

O curso da doença varia muito entre as pessoas infectadas, e o tempo da infecção aguda para o desenvolvimento da Aids é definido para pessoas assintomáticas, pela contagem das células T CD4⁺ entre 200 e 350/mm³ adotado e recomendado pelo Comitê Assessor, com o início mais precoce (Brasil 2008) do tratamento antirretroviral em relação ao documento anterior, cujo objetivo era evitar que a contagem de linfócitos se aproximasse de 200 células/mm³ e pelo aparecimento de infecções oportunistas (Miller, *et al.*, 2002; Ledergerber, *et al.*, 2004). São essas infecções, a exemplo do câncer, que definem a Aids e que determinam a evolução rápida para o óbito – em seis meses – enquanto que outros indivíduos permanecem infectados por mais de 25 anos, e mantêm o nível de linfócitos T CD4⁺ normal sem exibir evidência do declínio dessas células ou de imunodeficiência, muito embora nunca tenham feito uso de antirretrovirais (ARV). Uma explicação precisa para

essas diferenças e sobre os fatores associados com a progressão e desenvolvimento da doença permanece indefinida, mas o aumento de evidências sugere que eventos que ocorrem às vezes precocemente na infecção aguda, junto com a genética viral e do hospedeiro, atuam sinergicamente determinando o papel definitivo da evolução clínica da doença (Markowitz & Mohri, 2005).

Em pessoas assintomáticas com contagem de linfócitos T-CD4+ acima de $350/\text{mm}^3$ não é recomendado iniciar o tratamento, já que os benefícios não estão suficientemente claros para contrabalançar potenciais riscos da terapia antirretroviral (Brasil 2008).

A terapia antirretroviral deve ser iniciada antes que haja risco significativo de ocorrerem infecções oportunistas, isto é, antes que a contagem de linfócitos CD4⁺ atinja menos de $200 \text{ células}/\text{mm}^3$, condição a partir da qual infecções oportunistas graves tornam-se sucessivamente mais comuns e podem resultar em morte (Rachid & Schechter, 2003). Já foi claramente mostrado que o início da terapia com a contagem de células T CD4⁺ abaixo de $200 \text{ células}/\text{mm}^3$ está associado com um substancial risco de progressão de doença e morte, e este risco persiste por um período significativo após o início do tratamento (May *et al.*, 2007).

1.4 HETEROGENEIDADE GENÉTICA

No curso da infecção natural pelo HIV-1 ocorre um elevado índice de replicação do vírus com produção de cerca 10^{10} partículas virais ao dia e uma taxa de mutação em torno de $3,5 \times 10^{-5}$ nucleotídeos por ciclo, colaborando para

o surgimento das *quasispecies* virais, ou seja, variantes do vírus bastante relacionadas, porém geneticamente distintas entre si e que se encontram infectando uma mesma célula (Saag *et al.*, 1988; Boyer *et al.*, 1992; Bebenek *et al.*, 1993).

A maioria das amostras de HIV-1 analisadas são subtipadas. Entretanto, há algumas amostras de HIV-1 com regiões do genoma que representam partes de diferentes subtipos, recombinantes vistos nas áreas geográficas onde são encontrados mais de um subtipo circulando. Essas amostras híbridas são os produtos de eventos recombinantes que ocorrem no vírus. Se dois diferentes subtipos infectam uma única célula o que pode ocorrer é a formação de um mosaico compreendendo regiões de cada um dos dois subtipos

Os subtipos de HIV-1 foram classificados com base em análises filogenéticas e estão distribuídos nos grupos *main* (M), *outlier* (O) e o *non-M/non-O* (N). O mais prevalente é o grupo M, e que está subdividido em subtipos e sub-subtipos (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) e formas recombinantes circulantes (CRF) que são híbridas entre subtipos diferentes (Gurtle *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1998; Robertson *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2000).

A África Equatorial é a região onde há maior diversidade de variantes dos grupos N e O; todos os subtipos do grupo M e diversas CRF co-circulam nos Camarões, na Guiné Equatorial, no Gabão e na República Democrática do Congo (Overbaugh & Bangham, 2001).

1.5 EPIDEMIOLOGIA

1.5.1 Modos de transmissão

Os principais modos de transmissão do HIV tornaram-se conhecidos antes mesmo da identificação do agente etiológico (Guinan & Hardy, 1987; Ugen, *et al.*, 1997; Miotti, *et al.*, 1999), e são os seguintes:

1.5.1.1 Sexual

Em 1981, os pesquisadores do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), investigando os indivíduos afetados pela doença e seus parceiros sexuais – indivíduos sadios de comunidade homossexual – de Los Angeles, Nova York e São Francisco, concluíram tratar-se de uma doença infecciosa transmitida sexualmente.

1.5.1.2 Parenteral

A hipótese de que esta seria outra via de transmissão levou pouco tempo para ser esclarecida, com o aparecimento da doença em usuários de drogas intravenosas e em hemofílicos.

1.5.1.3 Vertical

Tornou-se evidente por casos de imunossupressão em crianças nascidas de mães usuárias de drogas e com Aids. Esse tipo de transmissão pode ocorrer durante a gestação, no momento do parto e durante o aleitamento.

1.5.2 Cepas resistentes

As cepas de vírus resistentes podem ser transmitidas entre os indivíduos. A transmissão de variantes do HIV-1, com resistência aos inibidores da RT e da PR, foi amplamente caracterizada em países desenvolvidos. Com efeito, os níveis de transmissão do HIV-1 estudados em pacientes com infecção recente documentada e com outros cronicamente infectados mostraram que de 10 a 20% dos novos diagnósticos realizados na Europa e nos EUA correspondem a infecções com cepas de HIV-1 resistentes a pelo menos uma droga (Balotta *et al.*, 2000; Little, 2000; Briones *et al.*, 2001; Duwe *et al.*, 2001).

Outras investigações similares, conduzidas por Tamalet e colaboradores (2003), e Scott e colaboradores (2004), estimaram que em torno de 70% dos indivíduos, embora corretamente tratados, apresentavam carga viral detectável e carregavam consigo resistência, no mínimo, a um medicamento. A transmissão do HIV-1 resistente a drogas também foi documentada entre todos os grupos com comportamento de risco (Tang & Pillay, 2004).

Sabe-se que a supressão da infecção pelo HIV-1 com drogas antirretrovirais é notável. No entanto, se a infecção é ocasionada por um vírus resistente, pode ocorrer a redução da eficácia dos medicamentos empregados no regime de primeira linha (Johnson, *et al.*, 2008).

Em um estudo no sudoeste da França foi investigada a possibilidade de resistência genética do HIV ao Enfuvirtida (T20) em um grupo de pacientes

não experimentados com ARV recentemente infectados, e foram demonstrados os primeiros casos de resistência primária ao T20 nesses pacientes (Peuchant *et al.*, 2007).

A transmissão do HIV resistente aos ARV impacta negativamente na resposta terapêutica de indivíduos virgens de tratamento. Como a estratégia da terapia e utilização de drogas ARV evoluiu, os padrões de mutação transmitida podem mudar. De acordo com investigações envolvendo 40 cidades dos EUA, foi demonstrado que a alta prevalência de resistência a drogas ocorreu amplamente, sugerindo que genotipagem e/ou fenotipagem, na investigação desses indivíduos, deveria ser considerada, especialmente se a terapia incluir um inibidor não-nucleosídico da RT (NNRTI) (Ross *et al.*, 2007).

1.5.3 Distribuição geográfica

No Quadro 1, demonstra-se que o subtipo C é encontrado em mais de 56% de todas as infecções por HIV no mundo (Esparza & Bhamarapavati, 2000); é também o subtipo mais prevalente em países com altas taxas de infecção entre heterossexuais, tais como aqueles situados na África subsaariana (Novitsky *et al.*, 1999; Robbins *et al.*, 1999) e países populosos como Índia e China (YU *et al.*, 1998; Shankarappa *et al.*, 2001).

Nos países desenvolvidos como os da Europa Ocidental e nos Estados Unidos, onde as infecções por HIV estão concentradas em populações de alto risco, tais como homossexuais e usuários de drogas, o subtipo B é o mais prevalente (Wainberg, 2004). Na África, entretanto, estão presentes praticamente todos os subtipos (Apetrei *et al.*, 2004).

Montano e colaboradores, (2005), assim como Rios e colaboradores, (2005) e posteriormente Geretti (2006), descreveram os subtipos B e F do HIV-1 como sendo os mais prevalentes na América do Sul.

Já em 1995, Robertson e colaboradores relataram ser a recombinação um dos maiores mecanismos que mais contribui para a variabilidade dos retrovírus, incluindo o HIV-1, e que sua diversidade pode ser um obstáculo potencial para o desenvolvimento de vacina para a Aids. A recombinação ocorre durante a transcrição reversa pela troca alternada de nucleotídeos de ambas as partes das fitas de RNA genômico compactadas em cada partícula infectante (Coffin, 1979; Hu & Temin, 1990).

Dois estudos (Robertson *et al.* 2000; Thomson *et al.*, 2002b) demonstraram a endemicidade das CRF do HIV-1; enquanto Butler e colaboradores (2007) complementam que elas são capazes de se estabelecerem em uma população de indivíduos infectados, portanto apresentam características epidêmicas e, dessa maneira, podem influenciar a disseminação e evolução da epidemia.

Na América do Sul, a CRF12_BF, composta de fragmentos dos subtipos B e F, foi detectada na Argentina e Uruguai, e representou, o primeiro registro de CRF nas Américas (Thomson *et al.*, 2002a). Outro estudo na Argentina detectou a tripla recombinação entre os três subtipos mais circulantes na América do Sul: B, C e F (Pando *et al.*, 2006).

Quadro 1 – Distribuição geográfica dos Subtipos de HIV-1 mais prevalentes nos continentes americano, europeu, asiático e africano

| Local | Subtipos mais prevalentes | Referência |
|---|---|---|
| • África Subsaariana | C | - Novitsky <i>et al.</i> , 1999; - Robbins <i>et al.</i> , 1999. |
| • Índia • China | C | - YU <i>et al.</i> , 1998; - Shankarappa <i>et al.</i> , 2001. |
| • Europa Ocidental; • Estados Unidos | B | - Wainberg, 2004. |
| • América do Sul | B, F, C, CRF12_BF*, CRF02_AG*, CRF28_BF*, CRF29_BF*, CRF39_BF* | - Thomson <i>et al.</i> , 2002a ; - Montano <i>et al.</i> , 2005; - Rios <i>et al.</i> , 2005; - Geretti, 2006; - Pando <i>et al.</i> , 2006; - Pires <i>et al.</i> , 2004; - Couto-Fernandez <i>et al.</i> , 2005; - Sa Filho <i>et al.</i> , 2006; - De Souza <i>et al.</i> , 2008. |

Nota: * Circulantes no Brasil

1.5.4 Estudos relacionando os subtipos de HIV-1 com a progressão clínica da doença

Na Tanzânia foi realizado estudo que relacionou os subtipos A, C, e D e formas recombinantes com a progressão clínica em gestantes, sendo observada a heterogeneidade no avanço clínico para doença baseada nesses subtipos, e o subtipo D foi associado a uma mais rápida progressão para a doença, em comparação aos outros subtipos. Dessa maneira, a progressão

para a Aids seria mais afetada por esse subtipo (Vasan *et al.*, 2006). Este achado impactou decisões sobre quando iniciar a Terapia Antirretroviral de Alta Eficácia (HAART) e pode ter implicações para futura triagem de alvos vacinais e na diminuição da evolução para doença (Kiwanuka *et al.*, 2008).

Em Cuba, significantes diferenças na prevalência da resistência para os inibidores da Transcriptase reversa (RTI) e inibidores da Protease (PI) não foram detectadas entre as mais frequentes formas genéticas de pacientes tratados, sugerindo que a diversidade genética do HIV-1 não atua como principal papel no desenvolvimento da resistência a drogas (Pérez *et al.*, 2007).

1.5.4.1 Subtipos do HIV-1 no Brasil

A distribuição de subtipos de HIV-1 no Brasil é complexa se comparada a de outros países da América do Sul, conforme se observa pela prevalência da circulação dos vários subtipos: B – 75%; seguido pelo F – 10%. Além desses, apresentam maior prevalência outros subtipos, tais como C, e os recombinantes B/C, e B/F (Louwagie *et al.*, 1993; Tanuri *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2001).

Sa Filho e colaboradores (2006) relatam que, ao todo, existem no mundo 34 formas recombinantes circulantes do HIV-1 descritas, das quais duas estão presentes no Brasil: as CRF28_BF e CRF29_BF. Outros relatos confirmam a presença das duas citadas anteriormente e acrescentam ainda as CRF12_BF e CRF39_BF em São Paulo (De Souza *et al.*, 2008), e também a CRF02_AG no Rio de Janeiro (Pires *et al.*, 2004, Couto-Fernandez *et al.*, 2005).

Segundo Morgado e colaboradores (1998), foram identificados no Rio de Janeiro em 131 pacientes 80,9% de subtipo B, 15,3% de F e um subtipo D. Já em outro estudo naquela cidade, realizado um ano depois, envolvendo 43 amostras de “doadores de sangue”, foram encontrados dados semelhantes, com 76,7% de subtipo B, 14% do F e 9,3% de mosaicos dos subtipos B/F ou B/D (Tanuri *et al.*, 1999).

Na Amazônia brasileira, a prevalência do subtipo B foi superior ao F em Belém do Pará e Macapá. Por outro lado, a análise nos segmentos dos genes *env* e *pro* em Belém revelou os subtipos B, F, D e C para o primeiro, e B, F, D e CRF02_AG para o segundo (Machado, 2004) (Quadro 2).

Quadro 2 – Distribuição geográfica dos Subtipos de HIV-1 mais prevalentes nos estados brasileiros

| Estados brasileiros | Subtipos mais prevalentes | Referência |
|-----------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Rio de Janeiro | B, F, D, | Morgado <i>et al.</i> 1998 |
| | B/D | Tanuri <i>et al.</i> , 1999 |
| | B/C, B/F, | Louwagie <i>et al.</i> , 1993 |
| | | Tanuri <i>et al.</i> , 1999 |
| | Delgado <i>et al.</i> , 2001 | |
| São Paulo | CRF28_BF, | De Sa Filho <i>et al.</i> , 2006 |
| | CRF29_BF, | |
| | CRF39_BF | De Souza <i>et al.</i> , 2008 |
| | CRF12_BF | |
| Rio de Janeiro São Paulo | CRF02_AG | Pires <i>et al.</i> , 2004 |
| | | Couto-Fernandez <i>et al.</i> , 2005 |
| Pará | B, F, D, C e CRF02_AG | Machado (2004) |
| Amapá | B, F, D e C | |

1.6 MUTAÇÕES GENÉTICAS

As mutações genéticas do HIV podem ser primárias, secundárias ou decorrentes polimorfismos naturais. As primárias alteram a ligação de uma droga ao seu alvo específico, e necessitam de um aumento constante da quantidade de droga necessária para inibir a enzima-alvo – PR ou RT. As mutações secundárias, na ausência das primárias, não conferem resistência a drogas. Contudo, quando estão presentes, acabam por contribuir na reconstrução da capacidade replicativa do vírus ocasionada, anteriormente, pela alteração genômica primária (Hirsch, *et al.*, 2000).

Os polimorfismos naturais são variantes genéticas com capacidade de replicação semelhante à variante tipo selvagem, “*wild type*” logo, sem expressão fenotípica, e ocorrem com frequência em doentes não submetidos a qualquer esquema terapêutico (Wilson & Bean, 2000; Haubrich, 2004).

O estudo realizado por Naeger e colaboradores (2001) quanto à resistência dos ARV merece ser citado, pois, além do exemplo clássico das mutações que conferem resistência a determinadas drogas, há outras que estão associadas ao aumento da sensibilidade, como é o caso da M184V na RT, que confere resistência a Lamivudina (3TC) e Emtricitabina (FTC), assim como provoca hiper-suscetibilidade ao Tenofovir (TDF) e à Zidovudina (AZT).

Noutro estudo, Braun e colaboradores (2007) avaliaram o efeito da mutação L76V na protease sobre o Atazanavir (ATV) e o Saquinavir (SQV) que apresentaram um aumento significativo de 0,17% para 1,5% num período de seis anos (1998 – 2005). Entretanto, essa mutação é selecionada pelo

Lopinavir/ritonavir (LPV/r), Amprenavir (APV), e possivelmente pelo Darunavir (TMC114), e está associada com importante resistência a estes fármacos.

A Didanosina (ddl) seleciona mutações resistentes que rendem a inativação da droga contra o HIV-1; L74V e K65R que permanecem como as principais mutações relacionadas a este medicamento (Moreno *et al.*, 2007).

1.7 TRATAMENTO

A principal finalidade da terapia antirretroviral para indivíduos com infecção pelo HIV é impedir ou retardar a progressão da imunodeficiência, melhorar a sobrevida dos pacientes, diminuindo a ocorrência de infecções oportunistas, e melhorar a qualidade de vida dos infectados (Coffin, 1996; Little *et al.*, 1999; Brasil, 2006). A redução do vírus no sangue periférico e a reversão da imunodeficiência característica representam um ganho que pode trazer benefícios ao paciente, aumentando a sobrevida do indivíduo em pelo menos 13 a 14 anos (Vermund, 2006). O esquema terapêutico é composto por uma associação de drogas para obter a diminuição da carga viral plasmática e assim atingir níveis virais indetectáveis na circulação periférica usando as técnicas atualmente disponíveis (Perno *et al.*, 2001).

No Brasil, a distribuição gratuita e universal dos medicamentos ARV, pelo Ministério da Saúde, iniciou em 1996 com a introdução do esquema HAART, o qual modificou radicalmente a letalidade pela Aids (Brasil 1996; Marins *et al.*, 2003). Entretanto, Clavel & Hance (2004) descreveram que, com o uso em massa desses medicamentos, ocorreu um aumento do risco de

resistência aos antirretrovirais, havendo assim a necessidade de ser adotado um monitoramento intenso e contínuo dessa resistência.

O estudo *AntiretroVIRal ADAPTtation* (VIRADAPT) acompanhou pacientes tratados com o auxílio da genotipagem e outro grupo (controle) cujos pacientes foram tratados pela forma tradicional. Os resultados encontrados após três meses de acompanhamento indicaram que houve queda da média da carga viral de 1,04 log para o grupo genotipagem, e de 0,4 log para o grupo controle. Após seis meses, a queda da carga viral foi de 1,15 log para o primeiro grupo e de 0,67 log para o segundo (Durant *et al.*, 1999). Quanto ao tratamento, merece ser citado que o custo da terapia com genotipagem é equivalente ao tratamento convencional.

A história natural da infecção por HIV-1 em países industrializados foi modificada com a introdução de esquemas de terapias combinadas HAART, que resultaram em uma substancial melhora na qualidade de vida dos indivíduos infectados, assim como em uma importante redução da morbimortalidade associada com a infecção pelo HIV-1 (Palella *et al.*, 1998, Miners *et al.*, 2001; Nieuwkerk *et al.*, 2001).

1.7.1 Resistência a drogas antirretrovirais

A resistência do HIV-1 aos fármacos antirretrovirais é consequência da alta taxa de replicação e mutação deste vírus combinada com a sua capacidade de integração com o genoma do hospedeiro. O HIV-1 apresenta uma notável diversidade genética com implicações na patogênese,

desenvolvimento de vacina, diagnóstico e suscetibilidade aos ARV (Kanki *et al.*, 1999; Caride *et al.*, 2000, Kaleebu *et al.*, 2002).

O vírus possui distintos mecanismos que lhe permite escapar tanto da pressão do sistema imunológico como da pressão farmacológica. O surgimento das *quasispecies* é favorecido pelos seguintes fatores: escassa fidelidade da RT em seu trabalho de replicação do RNA viral; elevada população de vírus existentes – cerca de 10^{12} ; e extraordinária cinética de replicação viral com uma vida média plasmática inferior a seis horas (Eigen, 1993; Hellerstein & McCune, 1997). A contínua produção dessas variantes proporciona ao vírus uma grande capacidade de adaptação no ambiente. A resistência ARV é uma das razões primárias para que a HAART falhe com o uso prolongado do esquema (Shafer *et al.*, 1998; Vella & Palmisano, 2000).

Segundo Quinones-Mateu e colaboradores (2000) o *fitness* é a capacidade de adaptação replicativa do vírus a um ambiente determinado. Dentro da população viral, cada *quasispecies* apresenta uma característica representativa daqueles vírus, que se encontra em baixa seleção num ambiente em particular.

Quando existem alterações no ambiente, pela administração de drogas antivirais, por exemplo, a presença de um ou mais mutantes mais aptos a replicar nesse novo meio faz com que a população derivada desses mutantes ganhe força e aumente suas chances de sobreviver. Com o HIV-1, a pressão seletiva frequentemente exercida pelo sistema imune resulta na adaptação do vírus a novas células-alvo e na manutenção de uma infecção persistente (Overbaugh & Bangham, 2001).

1.8 DROGAS

A HAART conta com três classes de drogas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) com mecanismo de ação intracelular:

- a) inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTI);
- b) inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTI);
- c) inibidores da Protease (PI); e
- d) uma classe com mecanismo de ação extracelular, os inibidores de fusão (IF).

Há novas drogas em investigação com o mesmo mecanismo de ação intracelular que oferecem limitadas expectativas de melhora tanto na eficácia e no perfil de segurança a longo prazo, como na proteção contra a resistência. Quanto aos fármacos das novas classes com ação extracelular, eles apresentam alvos sobre diferentes etapas do ciclo de vida do HIV e perfis de resistência distintos em relação aos agentes com ação intracelular existentes. Aparecem também como alternativas interessantes para uso em pacientes já tratados, e com potencial para aqueles ainda virgens de tratamento. Portanto, as expectativas são boas com aumento das opções terapêuticas, o que permitirá substituir ou retardar o uso de agentes antirretrovirais mais tóxicos (Brasil, 2004; Yeni *et al.*, 2004; Cooper, 2007).

1.9 QUALIDADE DE VIDA

A luta inicial na questão do tratamento dos pacientes HIV positivos, que era a sobrevivência, passou a ser a qualidade de vida, e a discussão sobre essa melhoria passa pelo item adesão ao tratamento. Quando se reconstitui a condição imune, de fato se evita o desconforto das infecções oportunistas e dos cânceres, muito embora possam advir outros desconfortos (Castelo Filho, 2007).

A qualidade de vida do paciente sob terapia HAART envolve questões como: distúrbios morfo-metabólicos, riscos cardiovasculares, a recente e ampla discussão sobre o comprometimento renal e hepático, a resistência aos antirretrovirais, o acometimento de doenças neoplásicas, e outras que merecem e precisam ser discutidas (Mendonça, 2007).

A infecção por si só pode afetar lipídios. Evidências relativamente antigas mostram a interferência do HIV no metabolismo de lipídios, com quedas de HDL e LDL, aumento de triglicérides, e que o tratamento da infecção pode também intervir nesses parâmetros. O tratamento, na verdade, causa um impacto diferente dependendo da droga ou classes de drogas utilizadas. Com o sucesso da HAART, os pacientes permanecem sob contínua terapia por anos. O tratamento reduz o título do HIV no sangue periférico e reverte a imunodeficiência característica, como também aumenta a sobrevivência do indivíduo (Vermund, 2006). O risco de doença cardiovascular é mais provável de ocorrer em indivíduos infectados com o avanço da idade, com ou sem tratamento. Além desse, outros eventos contribuem para o aumento do risco, como é o caso da terapia com Abacavir (ABC) e ddI. Outras evidências

identificam marcadores imunes associados ao aumento de risco cardiovascular, como o aumento da carga viral e a interrupção do tratamento. Por outro lado, em estudos recentes como o realizado por Sanne (2008), ficou evidenciado que em indivíduos com contagem de $CD4^+ >350$ células/mm³ sem o emprego da HAART, ocorre o aumento de eventos clínicos.

1.10 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.10.1 Genotipagem

A genotipagem é um dos métodos designados para identificar genes mutantes ou crescimento viral característico que sugerem a redução da suscetibilidade a drogas antirretrovirais específicas de resistência ao HIV (Wilson, 2003).

Os testes de genotipagem baseiam-se na análise de mutações associadas à resistência que são determinadas pelo sequenciamento direto do genoma do vírus amplificado e determinam a sequência genômica da região que codifica as enzimas RT e PR do HIV-1. A genotipagem detecta apenas mutantes virais que compreendam pelo menos 20 a 30% do total da população viral fornecendo uma medida indireta da resistência a drogas (Gunthard *et al.*, 1998).

A genotipagem pelo *ViroSeqTM HIV-1 Genotyping System v2.0* (Celera Diagnostic, ABBOTT Laboratories, EUA), faz a detecção de mutações na população viral de um paciente por meio da identificação de mudanças nos códons que diferem da sequência genética padrão ou sequência do “tipo selvagem” do HIV-1, de forma que a sequência de nucleotídeos, após o

sequenciamento automatizado de DNA, é determinada e a tradução em aminoácido (aa) se dá de forma que cada trinca de nucleotídeos codificará um aa (Eshleman *et al.*, 2004).

O plasma é a principal fonte de vírus para os testes de genotipagem, envolvendo o HIV-1, por ser facilmente armazenado e processado, e por se considerar que a semi-vida dos vírus, no meio, persiste por cerca de seis horas; 10 bilhões de vírions são produzidos a cada dia num doente não tratado. Isto permite o isolamento do vírus em replicação ativa. As sequências virais presentes no plasma representam apenas as *quasispecies* mais recentemente selecionadas (Perelson *et al.*, 1996; Shafer, 2002).

O Instituto Evandro Chagas (IEC) desde 2002 tornou-se um dos pólos da Rede Nacional de Genotipagem do HIV-1 (RENAGENO), que tem por finalidade detectar a ocorrência de resistência genotípica do HIV-1 frente aos ARV e auxiliar o médico na escolha de uma terapia adequada de resgate dos pacientes com falha terapêutica atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e que faz parte do Projeto de Implantação da RENAGENO elaborado pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN/DST) do Ministério da Saúde (MS).

O presente estudo tem o propósito de avaliar o perfil de resistência em amostras de sangue colhidas de indivíduos com Aids, para melhorar as estratégias de terapia em pacientes que falharam nos regimes terapêuticos prévios, e também, verificar a prevalência de subtipos do HIV-1 nos indivíduos residentes nos estados do Pará e Amazonas da região Norte do Brasil, no período de 2002 a 2006.

1.11 OBJETIVOS

1.11.1 Objetivo Geral

Estudar a resistência do HIV-1 aos antirretrovirais em amostras de sangue de indivíduos com Aids; e determinar a prevalência de subtipos do HIV-1 nos estados do Amazonas e Pará, região Norte do Brasil, no período de 2002 a 2006.

1.11.2 Objetivos Específicos

- Detectar a frequência das mutações do gene *pol* do HIV-1 nas regiões das enzimas RT e PR, relacionadas com as três classes de medicamentos ARV (NRTI, NNRTI e PI);
- Identificar os subtipos dos HIV-1 circulantes nos estados do Amazonas e Pará;
- Determinar a frequência de resistência relacionada às diferentes classes de ARV;
- Identificar as mutações mais frequentes do HIV-1 em pacientes submetidos ao tratamento HAART nos estados do Amazonas e Pará.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Evandro Chagas (IEC) tendo sido registrado com o nº 0030/07 (Anexo A).

2.2 POPULAÇÃO ESTUDADA

A população estudada foi constituída por 127 pacientes sendo 95 do estado do Pará e 32 do estado do Amazonas, os quais foram acompanhados por médicos de referência em genotipagem (MRG) da RENAGENO. Foram utilizados os formulários próprios da rede (Anexo B) contendo os seguintes dados: informações pessoais, clínicas, laboratoriais e epidemiológicas; e, posteriormente, esse grupo foi submetido à seleção considerando os critérios da RENAGENO abaixo relacionados.

Os pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um documento contendo um termo de “Consentimento livre esclarecido” da CN de DST/Aids do MS, da Rede (Anexo C), e daqueles que preencheram os critérios de inclusão foram coletadas amostras de plasma (1 mL) para a realização do estudo.

2.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes que experimentaram a primeira falha virológica por esquema terapêutico triplo; contendo inibidor(es) da protease;
- Pacientes que exibiram falha virológica após seis meses de tratamento antirretroviral potente;

- Pacientes que apresentaram variações entre dois resultados de exame de carga viral maiores do que 0,5 log (ou três vezes, em relação ao valor anterior);
- Pacientes com carga viral maior ou igual a 5.000 cópias por mL;
- Pacientes que foram encaminhados ao IEC pelos MRG para coleta do plasma;
- Pacientes que foram selecionados para o exame de genotipagem deveriam apresentar evidências de uma adesão adequada à medicação ARV, a fim de evitar o uso desnecessário do exame.

2.2.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo todos os pacientes com:

- Carga viral maior do que 500 mil cópias/mL, já que valores acima desse nível sugerem alta probabilidade de presença da cepa selvagem e problemas de adesão terapêutica ou farmacocinéticos.

2.3 ANÁLISE MOLECULAR

Considerando tratar-se de um estudo retrospectivo realizado no período de 2002 a 2006, o material foi processado adotando os procedimentos a seguir.

Na determinação da resistência do HIV-1 pela genotipagem, foi empregado o *ViroSeqTM HIV-1 Genotyping System* (Celera Diagnostic, 2004) para identificar mutações associadas à resistência do gene da polimerase do HIV-1.

A metodologia incluiu o isolamento e purificação do RNA viral do plasma do paciente, seguido pela síntese do cDNA (transcrição reversa, RT) e amplificação genômica pela reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) do fragmento *pol* do HIV-1 RT-PCR e módulo PCR, estendendo o gene da PR e aproximadamente 2/3 do gene da RT, que resultou na obtenção de um fragmento nucleotídico de 1,8 kilobases (Kb). Os produtos amplificados da PCR foram sequenciados usando o *BigDye Terminator sequency chemistry (Sequencing Module-BigDye v2.0)*, sendo analisados no *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA)*, acoplado ao *software* de análise de sequenciamento do DNA. Os perfis de mutação resistente foram classificados em um consenso pela Sociedade Internacional de AIDS (D' Aquilla *et al.*, 2002).

Para determinar os subtipos genéticos do HIV-1, todas as sequências nucleotídicas foram analisadas usando o *Stanford Sequence Resistance database* (Stanford University, 2006) e o Algoritmo brasileiro do Programa Nacional de DST/AIDS da SVS/MS – Versão fev/2005.

Essa identificação tornou-se possível mediante a análise das sequências FASTA e GT com o auxílio da versão de fevereiro de 2004 do Algoritmo brasileiro do PN/DST/Aids da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do MS (Brasil, 2005).

A detecção da resistência primária e secundária aos ARV foi avaliada utilizando-se a lista proposta por Johnson e colaboradores (2005) para a classificação das mutações (Anexo D). No presente estudo um largo espectro de códons mutacionais associados a uma maior ou menor resistência aos ARV

foi observado durante o processo de análise conduzida em amostras de pacientes experimentados com os ARV.

2.3.1 Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada para todas as amostras a partir de 1000 microlitros (μL) de plasma segundo o método *ViroSeqTM HIV-1 Genotyping System* (Celera Diagnostic, 2004).

- a) Para cada amostra foi identificado um microtubo cônico com capacidade de 1,5 mililitro (mL) livre de RNase e DNase, sendo transferido 1000 μL de plasma de cada paciente;
- b) Os tubos foram colocados na centrífuga posicionando a alça no sentido contrário ao rotor;
- c) As amostras foram ultra-centrifugadas de 20.000 a 25.000 gravidades (g) por 60 minutos a 4° C;
- d) Após centrifugação foi retirado o sobrenadante, cuidadosamente, sem tocar no sedimento usando uma micropipeta de transferência automática com ponteiros de 1000 μL , com filtro;
- e) Foram adicionados 600 μL de tampão de lise em temperatura ambiente (TA) – $\pm 25^\circ \text{C}$ – em cada amostra. A TA foi considerada porque o tampão precisava estar límpido, livre de cristais, para não interferir na RT-PCR;
- f) Foi agitado em vórtex por 3 a 5 segundos;
- g) Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 min, em TA, e posteriormente agitadas pelo menos uma vez;

- h) Foram adicionados 600 μ L de isopropanol puro e gelado em cada amostra;
- i) As amostras foram agitadas em vórtex por três a cinco segundos;
- j) Posteriormente, as amostras voltaram a ser centrifugadas por 12.500 a 15.000 x g por 15 min a TA;
- k) O sobrenadante foi removido como em “d”;
- l) Em seguida, foi adicionado um ml de etanol a 70% preparado com água livre de RNase e DNase;
- m) Posteriormente, foi agitado em vórtex por três a cinco segundos;
- n) As amostras foram centrifugadas entre 12.500 a 15.000 x g por cinco min a TA;
- o) O etanol foi removido de acordo com a alínea “d”;
- p) Foi agitado em vórtex e com outra ponteira foi removido todo o etanol. Nesta etapa, os tubos foram abertos a TA para permitir a evaporação total do etanol e assim evitar a inibição da RT-PCR;
- q) Posteriormente, cada sedimento foi ressuspensão com 50 μ L de RNA *Diluent*, através de agitação e/ou maceração quando houve necessidade; e
- r) Finalmente, foi realizada nova agitação em vórtex para que o material fosse depositado no fundo do tubo.

2.3.2 Transcrição reversa

Após as etapas de extração do RNA, as amostras foram submetidas a RT-PCR, conforme as instruções do quadro 3:

Quadro 3 – Preparo da *master mix* para RT

| Reagente | Volume (μL por amostra) |
|------------------------|--|
| HIV RT Mix | 8 |
| RNAse <i>inhibitor</i> | 1 |
| MuLV RT | 1 |
| 100 mM DTT | 0,4 |
| Volume final | 10,4 |

- a) a *master mix* foi preparada no gelo
- b) o microtubo contendo a *master mix* foi agitado manualmente;
- c) posteriormente, agitou-se em vórtex em baixa velocidade 2000 rotações por minuto (rpm);
- d) foi pipetado 10 μL de RT *master mix*, em cada tubo de reação de 0,2 mL correspondente a cada amostra;
- e) foram adicionados aos 10 μL de RT *master mix*, 10 μL do RNA extraído;
- f) a seguir, foi homogeneizado com a ponteira; e
- g) posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de acordo com o programa do termociclador (*Applied Biosystems* 9700, EUA) (Quadro 4).

Quadro 4 – Programa de termociclagem da RT

| Temperatura (°C) | Tempo | Processo |
|---|-------------------------|---|
| 65 | 30 seg | Relaxar a estrutura secundária do RNA |
| 42 | 5 min | Temperatura ótima para a atividade enzimática |
| Interromper o passo para adicionar 10 µL da mistura principal | | |
| 42 | 60 min | Transcrição reversa |
| 99 | 5 min | Inativação da MuLV RT |
| 4 | Deixar no máximo 10 min | Retirada |

2.3.3 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)

Após a transcrição reversa procedeu-se a PCR da seguinte forma:

a) a *master mix* para PCR foi preparada conforme o Quadro 5;

Quadro 5 – Preparo da *master mix* para a PCR

| Reagente | Volume (µL por amostra) |
|----------------------|-------------------------|
| PCR Mix | 29,5 |
| AmpliTaq <i>Gold</i> | 0,5 |
| UNG | 1 |
| Volume final | 31 |

b) os tubos foram agitados manualmente;

c) foram adicionados 30 µL de *master mix* de PCR em cada tubo descrito na seção 2.2.2; e

d) as amostras foram colocadas no termociclador programado para preparação da PCR como no quadro 6 abaixo;

Quadro 6 – Programa de termociclagem da PCR

| Nº de ciclos | Temperatura (° C) | Tempo | Processo |
|--------------|-------------------|----------------------|---|
| 1 | 50 | 10 min. | Ativação da UNG |
| 1 | 93 | 12 min. | Desativação da UNG e ativação da AmpliTaq |
| 40 | 93 | 20 seg. | Denaturação do DNA |
| | 64 | 45 seg. | Anelamento do <i>primer</i> |
| | 66 | 3 min. | Extensão do <i>primer</i> |
| 1 | 72 | 10 min. | Extensão final |
| | 4 | Retirado do aparelho | |

2.3.3.1 Purificação do produto da PCR para reação de sequenciamento

- a) O produto da PCR foi purificado usando coluna microcon-100 (*Millipore Corporation*, EUA) dentro de um microtubo cônico de 1,5 mL para cada produto de PCR;
- b) foram adicionados 300 µL de água tipo 1 (livre de RNase e DNase) no topo da coluna, sem tocar a membrana;
- c) o produto da PCR – cerca de 50 µL – foi colocado no centro da coluna sem tocar a membrana;
- d) a seguir, foi centrifugado por 15 min a 450 – 550 x g a TA;
- e) os tubos foram abertos, sendo adicionados 35 µL de água tipo 1 no centro da coluna, sem tocar a membrana;

- f) posteriormente, as colunas foram invertidas num outro microtubo de 1,5 mL, limpo e estéril, e centrifugados por cinco min 450 – 550 x g a TA; e
- g) finalmente, foram removidas e descartadas as colunas, ficando o microtubo com 35 a 40 μ L de DNA purificados.

2.3.3.2 Quantificação do DNA

- a) um gel de agarose 1% foi preparado em um tampão Tris, Ácido bórico, EDTA (TBE) 1X concentrado, corado com brometo de etídeo a 0,5 μ g;
- b) em seguida, foi preenchida a cuba de eletroforese com o tampão 1X concentrado;
- c) posteriormente, foram misturados 5 μ L do produto purificado, com 5 μ L de agarose gel *loading buffer*;
- d) foram aplicados 6 μ L da solução DNA *mass ladder*, no primeiro canal e 3 μ L no último canal do gel;
- e) as amostras foram aplicadas (10 μ L por amostra) e corridas numa voltagem de 100 a 150 volts por 30 min;
- f) o gel foi analisado sob luz ultravioleta (UV) para quantificar os produtos da PCR seguindo o Quadro 7;

Quadro 7 – Quantificação do produto de PCR

| Banda do <i>Mass Ladder</i> (Kb) | Concentração de DNA por 6 μ L (ng) | Concentração de DNA por 3 μ L (ng) |
|----------------------------------|--|--|
| 2 | 100 | 50 |
| 1,2 | 60 | 30 |
| 0,8 | 40 | 20 |
| 0,4* | 20 | 10 |
| 0,2* | 10 | 5 |

Nota: * Bandas podem ser invisíveis no gel

g) o produto foi diluído para obtenção de 1,8 Kb, observando o Quadro 8; e

Quadro 8 – Diluição do produto de PCR

| Diluição | Intensidade (ng) |
|---|------------------|
| 1/10 | > 100 |
| 1/4 | Entre 60 e 100 |
| 1/2 | Entre 40 e 60 |
| Ajustar o volume para 60 μ L | Entre 20 e 40 |
| Não há DNA suficiente para sequenciamento | < que 20 |

h) as amostras foram armazenadas em temperatura de -15° C a -20° C para posterior utilização – em até uma semana.

2.3.4 Reação de sequenciamento

A partir dessa etapa, a reação passou a ser realizada em placas *MicroAmp optical* de 96 orifícios, sendo o protocolo como segue:

- a) foram adicionados 12 μ L de cada um dos sete HIV SEQ Mix denominados A, B, C, D, (*sense*) e F, G e H (*antisense*) para cada amostra;
- b) em seguida, foram adicionados 8 μ L do produto de PCR diluído, purificado e quantificado, nos respectivos orifícios para os sete *primers*; e
- c) a placa com as amostras foi colocada no termociclador (Quadro 9).

Quadro 9 – Programa de termociclagem da reação de sequenciamento

| Nº de ciclos | Temperatura (° C) | Tempo | Processo |
|--------------|-------------------|----------------------|-----------------------------|
| 25 | 96 | 10 seg | Denaturação |
| | 50 | 5 seg | Anelamento do <i>primer</i> |
| | 60 | 4 min | Extensão do <i>primer</i> |
| | 4 | Retirado do aparelho | - |

2.3.5 Purificação do produto de sequenciamento

- a) foi preparada solução de isopropanol 70% em água tipo 1 e mantida a TA;
- b) foram aplicados 80 μ L da solução referida na alínea “a” em cada orifício da placa contendo 20 μ L da reação de sequenciamento;
- c) em seguida, a placa foi selada e deixada em TA por 15 min e coberta para protegê-la da luz;
- d) a placa foi centrifugada por 45 min a 3 000 X g;

e) após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, invertendo a placa sobre um papel absorvente; e

f) posteriormente, a parte da centrífuga onde foi depositada a placa invertida foi coberta com papel absorvente para, então, ser centrifugada por 1 min.

2.3.6 Detecção automática e análise de sequências

As amostras foram sequenciadas empregando-se um sequenciador automático modelo ABI PRISM[®] 3100 DNA *Analyzer*, no qual estava acoplado o *Software – HIV-1 Genotyping System*, versão 2.6.

a) foram adicionados à placa 15 µL de *formamide* HiDi para ressuspender o sedimento; e

b) a seguir, a placa foi montada, sendo introduzida no sequenciador, para detecção automática de sequências.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos neste estudo foram organizados em planilhas no programa EXCEL. As medidas de frequência (média, desvio-padrão, qui-quadrado) foram analisadas usando o Programa BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007). As variáveis analisadas pelo teste de qui-quadrado que apresentaram valores de p menores que 5 % ($p < 0,05$) proporcionaram aderência ao nível de significância estatística.

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O estudo abrangeu um total de 32 (25,2%) pacientes procedentes do Amazonas, 19 (59,4%) dos quais pertenciam ao sexo masculino e 13 (40,6%) ao feminino. Já os provenientes do Pará foram 95 (74,8%) pacientes, 75 (78,9%) dos quais eram do sexo masculino e 20 (21,1%) do feminino (Tabela 1). Todos se encontravam sob uso da HAART e preenchiam os critérios de inclusão adotados para este estudo (item 2.2.1.).

A idade variou de 19 a 72 anos (média de 39) sendo que a maioria, 107 (84,3%), apresentou faixa etária entre 20 e 49 anos.

Na ocasião da genotipagem, 84 (66,1%) dos indivíduos de ambos os estados não apresentavam qualquer sintoma ou sinal clínico da doença, e o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 foi realizado em 63,7% no período de 1991 a 1999 (Tabela 1).

A detecção de carga viral entre 10.000 e 100.000 cópias de RNA/mL foi positiva em 58,3% dos pacientes com média de contagem em 43.474 cópias de RNA/mL. A contagem de linfócitos TCD4⁺ em 57,5% (média 99,6 células/mm³) dos pacientes no momento de inclusão no estudo encontrava-se abaixo de 200 células/mm³ (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos dados epidemiológicos gerais de 127 pacientes com falha terapêutica aos ARV nos estados do Amazonas e Pará de 2002 a 2006

| Variável | N | Medidas | % |
|--|-----|----------------|------|
| Procedência | | | |
| Amazonas | 32 | | 25,2 |
| Pará | 95 | | 74,8 |
| Sexo | | | |
| Feminino | 33 | | 26,0 |
| Masculino | 94 | | 74,0 |
| Faixa etária (em anos) | | | |
| Menor de 20 | 2 | | 1,6 |
| 20-49 | 107 | | 84,2 |
| ≥50 | 17 | | 13,4 |
| Ign | 1 | | 0,8 |
| Sintomatologia | | | |
| Sim | 43 | | 33,8 |
| Não | 84 | – | 66,1 |
| Ano do diagnóstico | | | |
| ≤1990 | 2 | | 1,6 |
| ≥1991<2000 | 81 | | 63,8 |
| ≥2000=2005 | 40 | – | 31,5 |
| Ign | 4 | | 3,1 |
| Carga Viral | | | |
| >100.000<500.000 cópias RNA/mL | 48 | | 37,8 |
| De 10.000 a 100.000 cópias RNA/mL (média= 43,4) | 74 | Média= 411,7 | 58,3 |
| <10.000 cópias RNA/mL | 4 | DP= 3.198,4 | 3,1 |
| Ign | 1 | Mediana= 69,5 | 0,8 |
| CD4 | | | |
| <200 células/mm ³ (média= 99,6) | 73 | | 57,5 |
| de 200-349 células/mm ³ | 34 | Média= 203 | 26,7 |
| ≥350 células/mm ³ | 17 | DP= 164,4 | 13,4 |
| Ign | 3 | Mediana= 171,5 | 2,4 |
| Total | 127 | | |

Baseado nos dados de genotipagem, 108 (85%) amostras virais do HIV-1 foram classificadas como subtipo B, seguidas por 6 (4,7%) do subtipo F1, 6 (4,7%) de recombinantes BF1 e 1 (0,8%) de recombinante CF1, afora 6 (4,7%) com genotipagem ignorada (Figura 4).

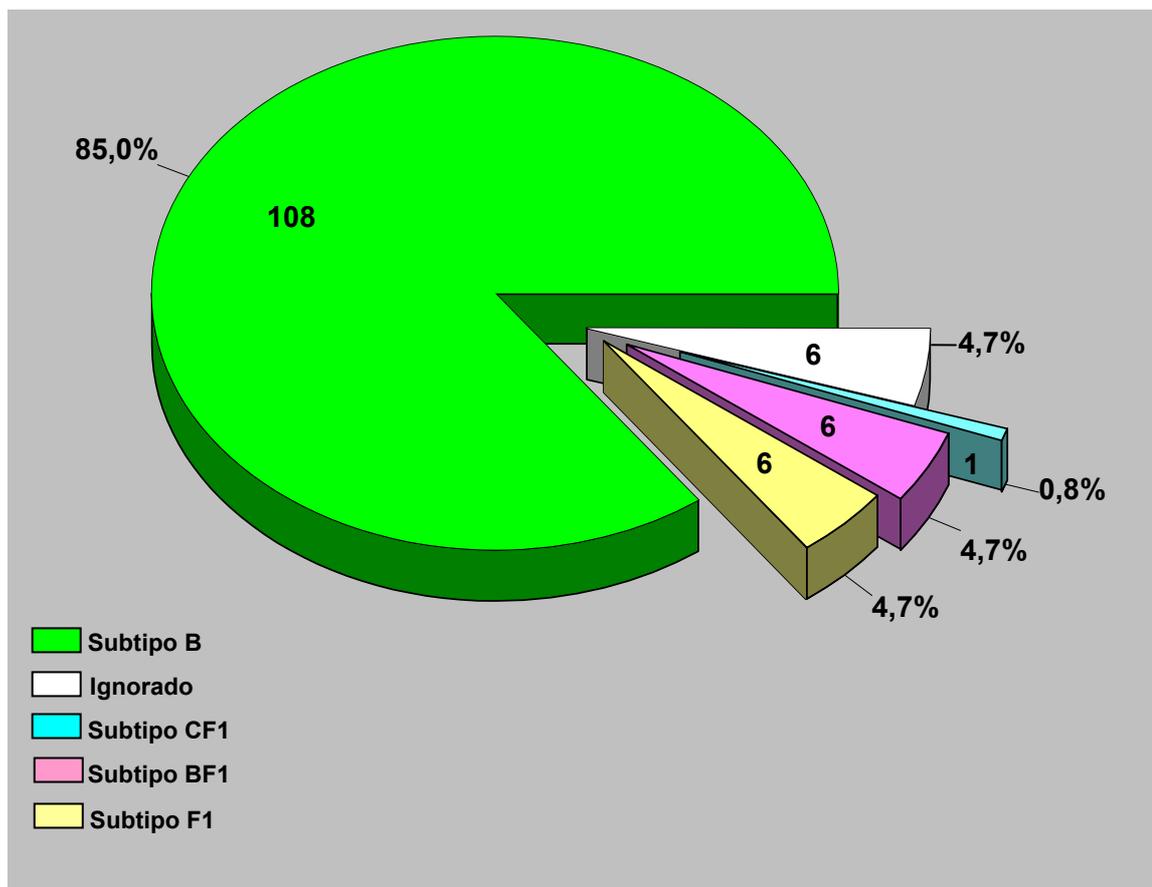


Figura 4 – Genotipagem dos subtipos de HIV-1 nos estados do Amazonas e Pará, 2002-2006.

O perfil das mutações de resistência associado ao gene da RT de todos os indivíduos com falha terapêutica no estado do Pará (Figura 5) na classe dos NRTI foi: M184V 77/95 (81,1%), T215F/Y 53/95 (55,8%), M41L 38/95 (40%), D67N 29/95 (30,5%), K70R 25/95 (26,3%), L210W 22/95 (23,2%), K219E/Q 20/95 (21,1%), V118I 20/95 (21,1%), E44A/D 13/95 (13,7%), L74V 7/95 (7,4%), Q151M 6/95 (6,3%), V75I 5/95 (5,3%), K65R 2/95 (2,1%), Y115F

1/95 (1,1%), e ins69 1/95 (1,1%). Na classe dos NNRTI, esse perfil foi: K103N 32/95 (33,7%), G190A/S 11/95 (11,6%), Y181C/I 9/95 (9,5%), L100I 7/95 (7,4%), P225H 7/95 (7,4%), V108I 4/95 (4,2%), Y188L 2/95 (2,1%), e V106M 1/95 (1,1%).

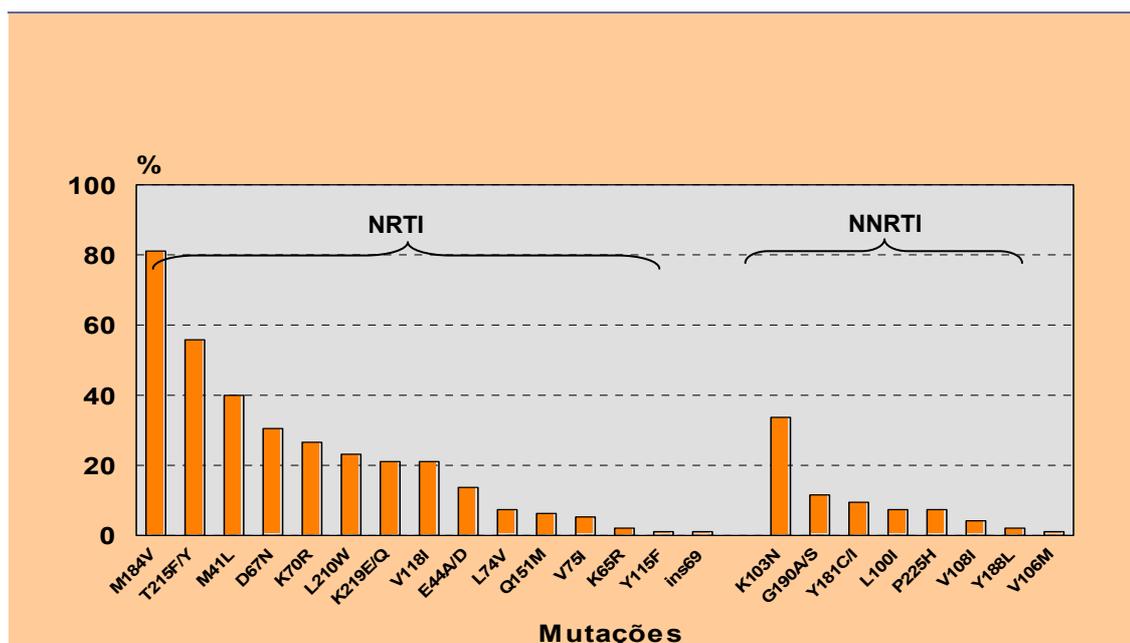


Figura 5 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da RT em pacientes com falha terapêutica, estado do Pará, 2002-2006.

A frequência de mutações resistentes aos ARV no estado do Pará do gene da protease (Figura 6) de mutações *minor* ou secundárias foi: L63P 62/95 (65,3%), L10F/I/R/V 49/95 (51,6%), A71I/T/V 46/95 (48,4%), M36I/V 39/95 (41,1%), I93L 32/95 (33,7%), I54L/M/V 31/95 (32,6%), I62V 30/95 (31,6%), V77I 27/95 (28,4%), K20I/R/M 26/95 (27,4%), I13V 13/95 (13,7%), G73A/C/S/T 10/95 (10,5%), L24I 10/95 (10,5%), N88D 9/95 (9,5%), L33F/I 8/95 (8,4%), D60E 9/95 (9,5%), F53L 6/95 (6,3%), K43T 4/95 (4,2%), Q58E 4/95 (4,2%) e E35G 1/95 (1,1%); e de mutações *major* ou principais encontradas foram: M46I/L 36/95 (37,9%), V82A/F/S/T 27/95 (28,4%), L90M 20/95 (21,1%),

D30N 11/95 (11,6%), I84V 9/95 (9,5%), V32I 6/95 (6,3%), I47V 5/95 (5,3%) e I50L 4/95 (4,2%).

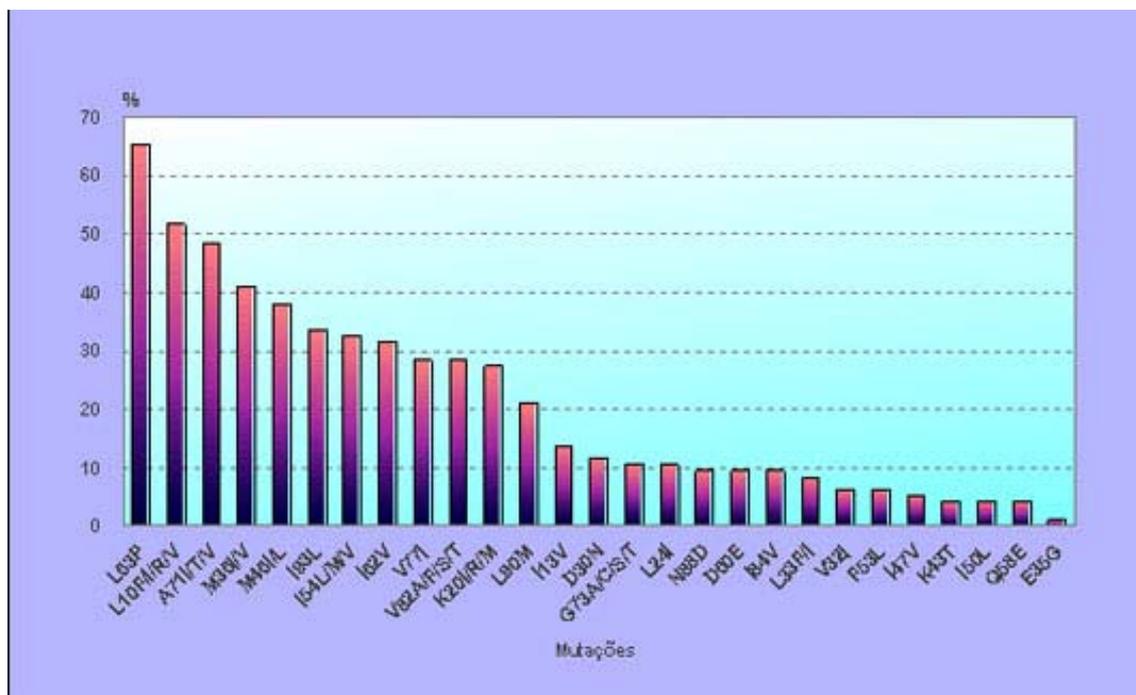


Figura 6 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da PR em pacientes com falha terapêutica, estado do Pará, 2002-2006.

O perfil de mutações de resistência associadas ao gene da RT (Figura 7) de indivíduos com falha terapêutica no Amazonas na classe dos NRTI foi: T215F/Y 18/32 (56,3%), M184V 17/32 (53,1%), K219E/Q 16/32 (50%), D67N 15/32 (46,9%), K70R 14/32 (43,9%), M41L 11/32 (34,4%), V118I 11/32 (34,4%), L210W 8/32 (25%), E44D 5/32 (15,6%), Q151M 5/32 (15,6%), V75I 3/32 (9,4%), K65R 2/32 (6,3%), 69ins 2/32 (6,3%) e L74V 1/32 (3,1%). As encontradas na classe NNRTI foram: K103N 11/32 (34,4%), Y181C 5/32 (15,6%), L100I 4/32 (12,5%), G190A/S 4/32 (12,5%), Y188L 2/32 (6,3%), V108I 1/32 (3,1%) e V106A 1/32 (3,1%).

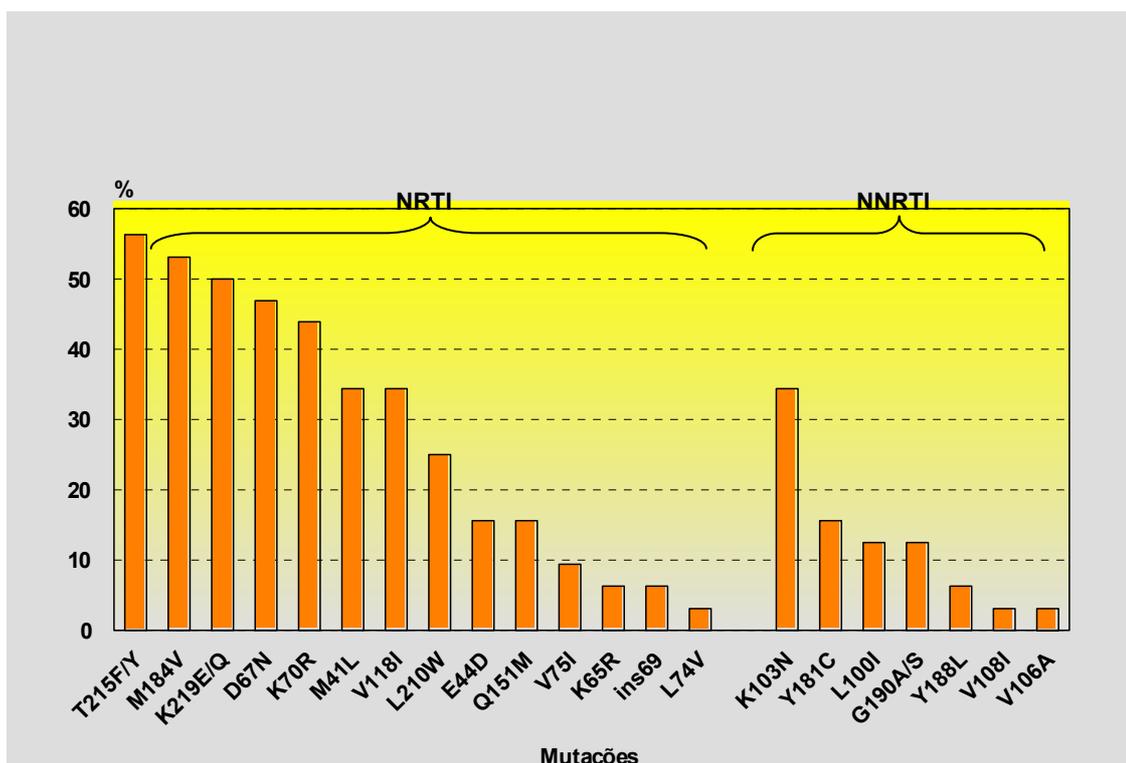


Figura 7 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da RT em pacientes com falha terapêutica no estado do Amazonas, 2005-2006.

A frequência de mutações aos ARV no estado do Amazonas do gene da protease (Figura 8) de mutações *minor* ou secundária foi: L63P 25/32 (78,1%), L10F/I/R/V 16/32 (50%), A71I/T/V 16/32 (50%), I62V 16/32 (50%), I93L 15/32 (46,9%), V77I 14/32 (43,8%), M36I/L 13/32 (40,6%), I54L/T/V 9/32 (28,1%), I13V 8/32 (25%), K20I/M/R 6/32 (18,8%), D60E 5/32 (15,6%), N88D 5/32 (15,6%), G73S 4/32 (12,5%), K43T 2/32 (6,3%) L24I 1/32 (3,1%), L33F 1/32 (3,1%), Q58E 1/32 (3,1%), E35G 1/32 (3,1%) e F53L 1/32 (3,1%). As mutações *major* ou principal encontradas foram: V82A/F/S/T 10/32 (31,3%), L90M 8/32 (25%), M46I/L 6/32 (18,8%), D30N 5/32 (15,6%), G48V 4/32 (12,5%), I47A/V 3/32 (9,4%) e I50L 2/32 (6,3%).

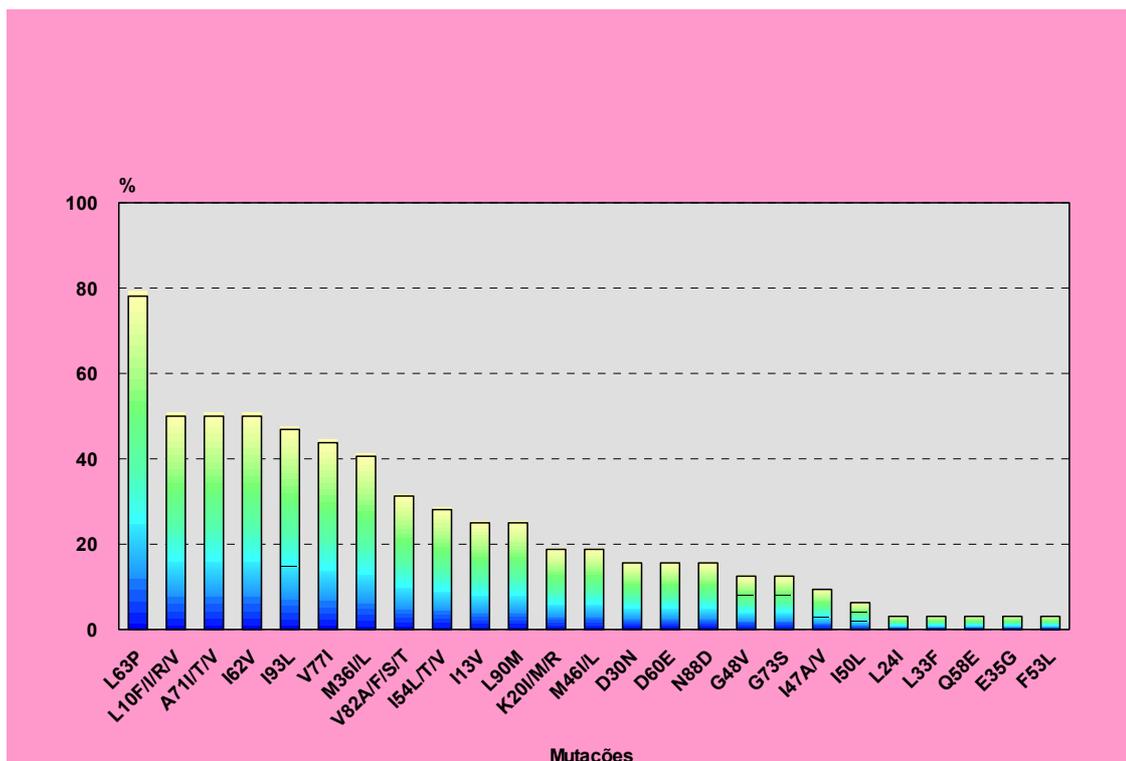


Figura 8 – Mutações associadas à resistência aos ARV no gene da PR em pacientes com falha terapêutica no estado do Amazonas, 2005-2006.

No período 2005 a 2006 (Figura 9), nos dois estados (Pará e Amazonas) o percentual de mutações resistentes aos ARV encontrado de acordo com os subtipos na classe dos NRTI para o subtipo B em 82 amostras foi: M184V 63/82 (76,8%), T215F/Y 45/82 (54,9%), M41L 30/82 (36,6%), D67N 24/82 (29,6%), V118I 22/32 (26,8%), K70R 21/32 (25,6%), K219Q/E 19/82 (23,2%), L210W 19/82 (23,2%), E44D 12/82 (14,6%) e L74V 2/82 (2,4%); na classe dos NNRTI foi: K103N 23/82 (28%), L100I 5/82 (6,1%), V108I 4/82 (4,9%) e Y188L 1/82 (1,2%). A frequência observada em 13 amostras nos subtipos não-B para a classe dos NRTI foi de: K70R 10/13 (76,9%), D67N 9/13 (69,2%), M184V 8/13 (61,5%), K219Q/E 8/13 (61,5%), T215Y/F 7/13 (53,8%), M41L 4/13 (30,8%), L210W 3/13 (23,1%), V118I 1/13 (7,7%), E44D 1/13 (7,7%)

e L74V 1/13 (7,7%); enquanto que nos NNRTI foi de: K103N 6/13 (46,2%), L100I 3/13 (23,1%), Y188L 2/13 (15,4%) e V108I 1/13 (7,7%).

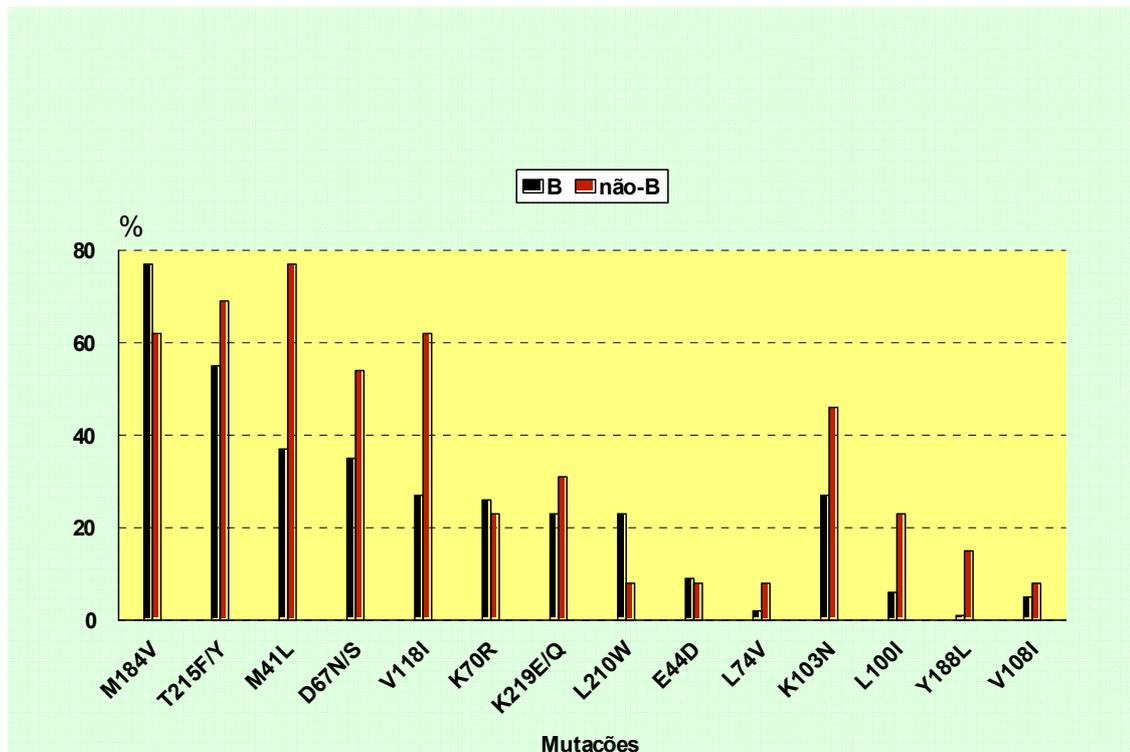


Figura 9 – Frequência das mutações comuns aos subtipos B e não-B no gene da RT nos estados do Amazonas e Pará, 2005-2006.

Considerando o gene da protease (Figura 10), as mutações resistentes encontradas nas amostras do subtipo B referentes a 82 amostras foram: L63P 63/82 (76,8%), L10I/V 37/82 (45,1%), I62V 34/82 (41,5%), V77I 33/82 (40,2%), A71V 32/82 (39%), I93L 32/82 (39%), M36I 26/82 (31,7%), I54V 25/82 (30,5%), V82A/S 21/82 (25,6%), I13V 19/82 (23,2%), M46I 17/82 (20,7%), K20R/M 14/82 (17,1%), D60E 13/82 (15,9%), L24I 7/82 (8,5%), K43T 4/82 (4,9%), F53L 4/82 (4,9%), G48V 3/82 (3,7%) e I50L 2/82 (2,4%); enquanto que nos subtipos não-B, as mutações referentes a 13 amostras apresentaram os seguintes percentuais: M36I 12/13 (92,3%), L10I/V 7/13 (53,8%), I62V 6/13

(46,2%), I93L 6/13 (46,2%), K20R/M 6/13 (46,2%), L63P 5/13 (38,5%), I50L 4/13 (30,8%), I54V 3/13 (23,1%), M46I 3/13 (23,1%), K43T 3/13 (23,1%), A71V 2/13 (15,4%), L24I 2/13 (15,4%), V82A/S 2/13 (15,4%), V77I 1/13 (7,7%), D60E 1/13 (7,7%), I13V 1/13 (7,7%), F53L 1/13 (7,7%) e G48V 1/13 (7,7%).

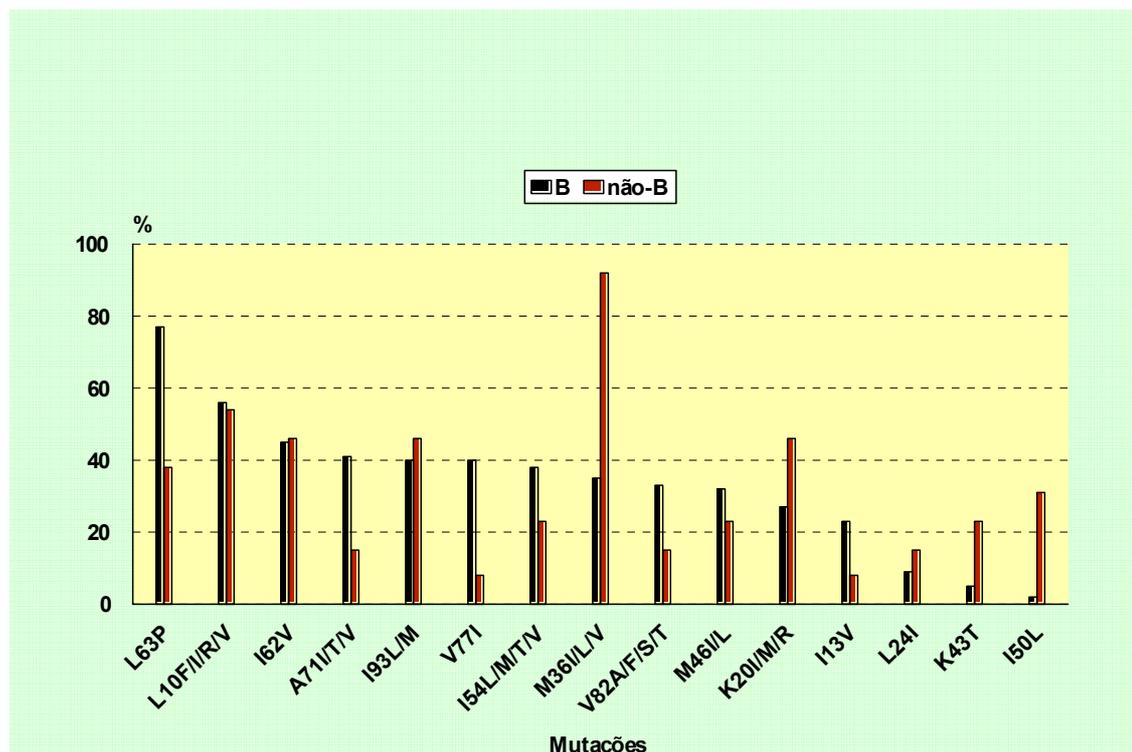


Figura 10 – Frequência das mutações comuns aos subtipos B e não-B no gene da PR nos estados do Amazonas e Pará, 2005-2006.

Considerando a presença de mutações principais relacionadas às três classes de ARV (Tabela 2), observou-se maior ocorrência na classe dos NRTI (96,9 %), PI (62,5%) e NNRTI (56,3%) no Amazonas, enquanto que no Pará os percentuais observados nas mesmas classes foram: NRTI (91,6%), PI (61,1%) e NNRTI (50,5%). Não foi observada significância estatística para os ARV com ($p=0,1188$) no Amazonas enquanto no Pará houve significância ($p=0,0017$).

Tabela 2 – Frequência de mutações principais segundo as classes de ARV nos pacientes dos estados do Amazonas e Pará, 2002-2006

| Classes de ARV | Nº de mutações principais (AM) | % | p (valor) | Nº de mutações principais (PA) | % | p (valor) |
|----------------|--------------------------------|------|-----------|--------------------------------|------|-----------|
| NRTI | 31/32 | 96,9 | | 87/95 | 91,6 | |
| NNRTI | 18/32 | 56,3 | 0,1188 | 48/95 | 50,5 | 0,0017 |
| PI | 20/32 | 62,5 | | 58/95 | 61,1 | |

Foi inferido o nível de resistência e de sensibilidade do HIV-1 das amostras do Pará aos medicamentos com alvo no gene da RT (Tabela 3). Em ordem decrescente, relacionamos aos fármacos mais comprometidos para utilização num próximo esquema pelos pacientes desta análise: (3TC, AZT, AZT+3TC, ddl (na classe dos NRTI) e EFV e NVP (na classe dos NNRTI). Foi observada significância estatística para a *R, **RI e ***S com p (valor) 0,0001 no Pará pelo teste qui-quadrado de aderência ao nível de significância 5% (0,05).

Tabela 3 – Nível de resistência e sensibilidade aos ARV no gene da RT em 95 amostras de pacientes do estado do Pará 2002-2006

| ARV | *R | p (valor) | (%) | **RI | p (valor) | (%) | ***S | (%) | p (valor) |
|-----|----|-----------|-----|------|-----------|-----|------|-----|-----------|
|-----|----|-----------|-----|------|-----------|-----|------|-----|-----------|

| | amostra | | amostra | | amostra | |
|---------|---------|------|---------|------|---------|------|
| | Nº abs | | nº abs | | nº abs | |
| ABC | 42 | 44,2 | 42 | 44,2 | 11 | 11,6 |
| ddl | 51 | 53,7 | 34 | 35,8 | 10 | 10,5 |
| 3TC | 79 | 83,2 | 1 | 1,1 | 15 | 15,8 |
| d4T | 37 | 38,9 | 26 | 27,4 | 32 | 33,7 |
| TDF | 31 | 32,6 | 6 | 6,3 | 58 | 61,1 |
| TDF+3TC | 7 | 7,4 | 26 | 27,4 | 62 | 65,3 |
| AZT | 58 | 61,1 | 14 | 14,7 | 23 | 24,2 |
| AZT+3TC | 51 | 53,7 | 10 | 10,5 | 34 | 35,8 |
| EFV | 52 | 54,7 | 0 | 0 | 43 | 45,3 |
| NVP | 52 | 54,7 | 0 | 0 | 43 | 45,3 |

Nota: Sinal convencional utilizado: *R- resistente; **RI- resistência intermediária; ***S- sensibilidade.

A mesma avaliação foi feita (Tabela 4) com os medicamentos utilizados no gene da PR e observamos os seguintes fármacos mais comprometidos: NFV, SQV, IDV, RTV, FPV e IDV/r. Foi observada significância estatística para a *R e ***S com p (valor) 0,0001 no estado do Pará pelo teste qui-quadrado de aderência ao nível de significância 5% (0,05) não sendo significativa para a variável **RI (p= 0,092).

Tabela 4 – Nível de resistência e sensibilidade aos ARV no gene da PR em 95 amostras de pacientes do estado do Pará 2002-2006

| ARV | *R | | | **RI | | | ***S | | |
|-------|-------------------|-----------|------|-------------------|-----------|------|-------------------|-----------|------|
| | amostra n° abs | p (valor) | (%) | amostra n° abs | p (valor) | (%) | amostra n° abs | p (valor) | (%) |
| FPV | 50 | | 52,6 | 11 | | 11,6 | 34 | | 35,8 |
| IDV | 55 | | 57,9 | 13 | | 13,7 | 27 | | 28,4 |
| LPV | 27 | | 28,4 | 10 | | 10,5 | 58 | | 61,1 |
| NFV | 63 | | 66,3 | 10 | | 10,5 | 22 | | 23,2 |
| RTV | 50 | | 52,6 | 11 | | 11,6 | 34 | | 35,8 |
| SQV | 57 | 0,0001 | 60 | 7 | 0,0924 | 7,4 | 31 | 0,0001 | 32,6 |
| ATV | 47 | | 49,5 | 6 | | 6,3 | 42 | | 44,2 |
| FPV/r | 35 | | 36,6 | 6 | | 6,3 | 54 | | 56,8 |
| SQV/r | 36 | | 37,9 | 9 | | 9,5 | 50 | | 52,6 |
| IDV/r | 49 | | 51,6 | 5 | | 5,3 | 41 | | 43,2 |
| ATV/r | 21 | | 22,1 | 19 | | 20 | 55 | | 57,9 |

Nota: Sinal convencional utilizado: *R- resistente; **RI- resistência intermediária e ***S- sensibilidade.

Foi inferido o nível de resistência e sensibilidade do HIV-1 das amostras do estado do Amazonas aos medicamentos com alvo no gene da RT (Tabela 5). Em ordem decrescente, relacionamos aqueles fármacos mais comprometidos para utilização num próximo esquema pelos pacientes desta análise: AZT, AZT+3TC, 3TC, d4T, ddl e ABC na classe dos NRTI e NVP e EFV na classe dos NNRTI. Foi observada significância estatística para a RI e S com $p = 0,0042$ e $p = 0,0001$ respectivamente no Amazonas pelo teste qui-quadrado de aderência ao nível de significância 5% ($p < 0,05$). Não sendo significativa para a variável R ($p = 0,2029$).

Tabela 5 – Nível de resistência e sensibilidade aos ARV no gene da RT em 32 amostras de pacientes do estado do Amazonas, 2005-2006

| ARV | *R | | **RI | | ***S | |
|---------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | amostra nº abs | p (valor) (%) | amostra nº abs | p (valor) (%) | amostra nº abs | p (valor) (%) |
| ABC | 18 | 56,3 | 12 | 37,5 | 2 | 6,3 |
| ddI | 21 | 65,6 | 10 | 31,3 | 1 | 3,1 |
| 3TC | 24 | 75 | 3 | 9,4 | 5 | 15,6 |
| d4T | 23 | 71,9 | 3 | 9,4 | 6 | 18,8 |
| TDF | 15 | 46,9 | 0 | 0 | 17 | 53,1 |
| TDF+3TC | 8 | 0,2029 25 | 7 | 0,0042 21,9 | 17 | 0,001 53,1 |
| AZT | 25 | 78,1 | 3 | 9,4 | 4 | 12,5 |
| AZT+3TC | 24 | 75 | 6 | 6,3 | 6 | 18,8 |
| EFV | 19 | 59,4 | 0 | 0 | 13 | 40,6 |
| NVP | 20 | 62,5 | 0 | 0 | 12 | 37,5 |

Nota: Sinal convencional utilizado: *R- resistente; **RI- resistência intermediária e ***S- sensibilidade

O mesmo acontece (Tabela 6) com os medicamentos utilizados no gene da PR e observamos os seguintes fármacos mais comprometidos no estado do Amazonas: NFV, SQV, IDV, RTV, FPV e IDV/r. Foi observado significância estatística para a R com p (valor) 0,0231 no Amazonas pelo teste qui-quadrado de aderência ao nível de significância 5% (0,05), não sendo significante para a variável RI e S p= 0,0521 e p= 0,100.

Tabela 6 – Nível de resistência e sensibilidade aos ARV no gene da PR em 32 amostras de pacientes do estado do Amazonas 2005-2006

| ARV | *R | | | **RI | | | ***S | | |
|-------|-------------------|---------|------|-------------------|---------|------|-------------------|---------|------|
| | amostra nº abs | p valor | (%) | amostra nº abs | p valor | (%) | amostra nº abs | p valor | (%) |
| FPV | 13 | | 40,6 | 6 | | 18,8 | 13 | | 40,2 |
| IDV | 19 | | 59,4 | 5 | | 15,6 | 8 | | 25 |
| LPV | 4 | | 12,5 | 7 | | 21,9 | 21 | | 65,6 |
| NFV | 23 | | 71,9 | 2 | | 6,3 | 7 | | 21,9 |
| RTV | 20 | | 62,5 | 2 | | 6,3 | 10 | | 31,3 |
| SQV | 18 | 0,0231 | 56,3 | 4 | 0,0521 | 12,5 | 10 | 0,100 | 31,3 |
| ATV | 15 | | 46,9 | 4 | | 12,5 | 13 | | 40,6 |
| FPV/r | 10 | | 31,3 | 2 | | 6,3 | 20 | | 62,5 |
| SQV/r | 15 | | 46,9 | 2 | | 6,3 | 15 | | 46,9 |
| IDV/r | 18 | | 56,3 | 2 | | 6,3 | 12 | | 37,5 |
| ATV/r | 9 | | 28,1 | 6 | | 18,8 | 17 | | 53,1 |

Nota: Sinal convencional utilizado: *R- resistente; **RI- resistência intermediária e ***S- sensibilidade

4 DISCUSSÃO

O emprego de terapias potentes frente ao HIV-1 tem permitido obter um excelente controle da carga viral em um percentual considerável de pacientes, associando a isto uma melhoria imunológica e uma importante redução da morbidade e mortalidade (Palella, *et al.*, 1998). Este estudo, assim como outros da RENAGENO, foi elaborado tendo como característica principal a investigação de pacientes adultos (mediana 39 anos de idade) cronicamente infectados pelo HIV-1 na vigência de tratamento antirretroviral, sendo o estudo realizado com pacientes procedentes dos estados do Amazonas e Pará, ambos situados na região Norte do Brasil.

Todas as 32 amostras procedentes de indivíduos do estado do Amazonas foram recebidas no biênio 2005-2006 e, a maioria dessas (87,5%), pertenciam a indivíduos sem nenhuma manifestação clínica, ou seja, eram assintomáticos. Entretanto, no estado do Pará, esse percentual foi menor (58,9%) e as amostras sorológicas foram colhidas durante o período de 2002 a 2006. Como em ambos os estados a maioria dos pacientes não apresentava sinais clínicos, as amostras séricas deles criaram oportunidade ótima para iniciar o tratamento antirretroviral.

Em ambos os estados, as amostras procedentes do sexo masculino foi superior ao do feminino, sendo que a maioria dos pacientes (64%) foi diagnosticada como portadora do vírus HIV-1 na década de 90, dos quais 18% foram diagnosticados somente no ano de 1997, ou seja, esses pacientes tinham mais de 10 anos de convívio com o HIV.

Todos os pacientes se encontravam em falência virológica e a mediana da carga viral encontrada foi de 69,5 cópias de RNA/mL. A carga viral, juntamente com a quantificação de células TCD4⁺, com mediana de 171,5 células/mm³, são os principais marcadores para monitorar o curso da Aids no paciente sob uso de antirretroviral. Ressalta-se entretanto, que pacientes apresentando menos de 200 células TCD4⁺/mm³ de sangue periférico, indica a existência de importante quadro de imunodeficiência que está diretamente associado ao aumento relevante da ocorrência de infecções oportunistas e, conseqüentemente, com possibilidade de apresentar resposta terapêutica menos duradoura (Brasil, 2003).

O Brasil se caracteriza pela circulação de um variado padrão de subtipos do HIV-1 e apresenta uma distribuição diferente desses subtipos entre as regiões geográficas do país; no entanto, em geral, o subtipo B é o mais prevalente no Brasil (Morgado *et al.*, 2002; Brindeiro *et al.*, 2003; Couto-Fernandez *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2007).

Diversos autores aprovaram os estudos com testes de resistência em países desenvolvidos, e no Brasil, por estes favorecerem na decisão sobre a ocasião de mudar o tratamento com ARV, visando aumentar a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes com Aids (Durant *et al.*, 1999; Baxter *et al.*, 2002; Tural *et al.*, 2002; Marins *et al.*, 2003). Contudo, o desenvolvimento de resistência às drogas, é a natural consequência das mutações virais nos alvos utilizados pelo tratamento com ARV, impedindo dessa maneira, que a manutenção da terapia HAART em períodos prolongados possa continuar

agindo na supressão da replicação do HIV nos pacientes (Clavel & Hance, 2004; Vella & Palmisano, 2005).

No presente estudo, a descrição da epidemiologia molecular do HIV-1 foi realizada em 127 amostras de pacientes infectados dos estados do Pará e Amazonas, sendo possível detectar alta prevalência de mutações relacionadas com resistência a drogas nos genes da RT e/ou protease, bem como estimar a prevalência de diferentes subtipos nesses estados. Nossos resultados são similares a estudos prévios realizados no Brasil (Tanuri *et al.*, 2002).

A proporção de infecções pelo subtipo B do HIV-1 observada nesses pacientes predominou sobre o subtipo F1, confirmando relato anterior de Machado (2004) para as cidades de Belém e Macapá. Esses resultados, no entanto, divergem de estudo prévio conduzido por Vicente *et al.*, (2000) sobre o subtipo F no Amazonas, pois, segundo esses autores, a prevalência do subtipo F praticamente se igualava à do subtipo B.

Neste estudo, encontramos percentuais de 85,3% (PA) e 87,5% (AM) de vírus HIV-1 do subtipo B circulando nesses estados, o que contrasta com os resultados anteriormente obtidos no estado do Amazonas (Vicente *et al.*, 2000). Tais resultados sustentam a maior prevalência do subtipo B, assim como indicam a introdução de outros subtipos não-B, mas confirmam os resultados obtidos por Machado (2004) para o estado do Pará. Entretanto, a prevalência do subtipo F1 foi baixa [PA (4,2%); AM (6,3%)], e até mesmo incluíram formas recombinantes B/F1 [PA (3,2%); AM 6,3%]] e CF1, este último isolado uma única vez, representando em torno de 1%. A detecção deste recombinante foi o primeiro no estado do Pará e na região amazônica, e

também descrito em um indivíduo recém-infectado em Curitiba, estado do Paraná, na região sul do Brasil (Ferreira *et al.*, 2008) .

As mutações principais, mais frequentemente encontradas nas localidades estudadas envolvendo os NRTI, foram a M184V, seguida dos códons 215, 41, 67, 70, 210 e 219, perfil este apresentado pelo HIV-1 nos pacientes do estado do Pará. Por outro lado, a mutação mais frequente nos pacientes do estado do Amazonas foi a T215F/Y. Em ordem decrescente, os outros códons encontrados foram os seguintes: 184, 70, 219, 67, 41 e 210. O padrão de mutações observadas no estado do Pará lembra o encontrado no sudeste e no nordeste brasileiro (Couto-Fernandez *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2007), enquanto que o encontrado no estado do Amazonas foi semelhante ao observado no Chile (Afani *et al.*, 2007), o que mostra que a origem das cepas entre esses dois estados amazônicos é, provavelmente diferente.

Entre as mutações de resistência aos NRTI observadas neste estudo, estão incluídas a M184V e os análogos de timidina (TAM). As TAM acumulam-se em dois distintos padrões de superposição no momento que existe a pressão seletiva exercida pela Zidovudina sobre o vírus no paciente: a via TAM (1) seleciona os códons 41, 210, e 215; e a via TAM (2), diferentemente, elege os códons 67, 70 e 219 (Cozzi-Lepri *et al.*, 2005). Vale ressaltar que essas vias apresentam repercussões nas quais TAM (1) confere resistência à Zidovudina e à Estavudina, e resistência cruzada a múltiplos NRTI, enquanto que a resistência conferida por TAM (2) está normalmente limitada à Zidovudina e à Estavudina (Marcelin *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004).

No presente estudo, o HIV-1 foi avaliado quanto aos padrões acima citados, adquiridos sob pressão seletiva antiviral e os padrões da mutação M184V acompanhada de pelo menos uma TAM foram M184V + TAM (1) + TAM (2) foi encontrado em 26,3% nos pacientes do estado do Pará, seguido pelo padrão M184V + TAM (1) em 24,6%; M184V sozinha em 17,9% e M184V + TAM (2) 8,4%. Nos pacientes do estado do Amazonas os padrões mutacionais encontrados foram M184V + TAM (1) + TAM (2) e M184V + TAM (1) e apresentaram o mesmo percentual (12,5%) e os padrões da mutação M184V sozinha e M184V + TAM (2), ambos com 6,3%. Esse tipo de apresentação das mutações onde a presença da mutação M184V, acompanhada com poucas TAM, parece estar relacionado com o retardo ou na prevenção da emergência dessas mutações Ait-Khaled e colaboradores (2002).

O ligeiro aumento da prevalência no códon 215, observado nas amostras dos pacientes do estado do Amazonas, comparado ao códon 184 anteriormente observado, possivelmente deveu-se ao fato do padrão da mutação M184V sozinha ser encontrada em apenas duas amostras dos 32 pacientes do estado do Amazonas. Medeiros e colaboradores (2007) observaram, em pacientes do Nordeste do Brasil, que as TAM apresentaram um aumento significativo quando compararam grupos de pacientes enfrentando falha terapêutica primária e falha terapêutica secundária com aqueles multifalhados e, associaram esse fato, ao maior número de terapias empregadas pelos pacientes multifalhados ocasionando, como consequência, o aumento das TAM.

Ainda na classe NRTI, foi encontrado que mais de um quinto das amostras de pacientes do estado do Pará apresentavam a frequência de 4 mutações nas posições 184, 41, 210 e 215, enquanto que no estado do Amazonas a frequência desses códons foi menor (18,8%). O padrão de mutação desses códons nos dois estados da região Norte brasileira lembra o que foi anteriormente observado para pacientes do Rio de Janeiro (Couto-Fernandez *et al.*, 2005)

Além das mutações citadas para a classe dos NRTI, outras mutações importantes também foram observadas, porém em menor proporção nos códons 74, 151, 75, 115, 65, e ins69, no estado do Pará. As amostras do estado do Amazonas apresentaram resistência para os mesmos códons, com exceção do 115, presente somente nas amostras do estado do Pará, o que está de acordo com a literatura para outras regiões do Brasil (Cavalcanti *et al.*, 2007).

Nosso estudo detectou a presença de mutação principal para os NRTI em 96,9% das amostras virais do estado do Amazonas e em 91,6% dos HIV-1 procedentes de amostras do estado do Pará. Em parte essa alta prevalência aos NRTI deveu-se à aprovação da zidovudina em 1987, que, se constituiu no primeiro agente inibidor da transcriptase reversa disponível para tratamento da infecção pelo HIV-1. Embora menos potente contra o HIV do que os NNRTI e os PI, os NRTI apresentam um papel central no TARV e permanecem como parte do tratamento padrão atual (Shen *et al.*, 2008; USA, 2010).

Por outro lado, o HIV-1 das amostras do estado do Amazonas mostrou nível de resistência acima de 50% aos seguintes medicamentos: AZT, AZT+3TC, 3TC, ddl e ABC, e o HIV-1 das amostras do estado do Pará apresentava o mesmo nível de resistência aos fármacos 3TC, AZT, AZT+3TC e ddl. A maior sensibilidade foi observada ao medicamento Tenofovir – acima de 50% em ambos os estados. Esses dados são semelhantes aos descritos para HIV-1 em pacientes procedentes do Nordeste do Brasil (Medeiros *et al.*, 2007).

Neste estudo foi detectada a mutação K103N na classe NNRTI como a mais prevalente tanto nas amostras dos pacientes do estado do Amazonas quanto nas do Pará, e os valores encontrados são similares ao de outros relatos no Brasil (Couto-Fenandez *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2007). Ressalte-se que ela ocorreu em mais de 50% dos pacientes desenvolvendo falha virológica sob uso do EFV, reduzindo sua suscetibilidade em aproximadamente 25 vezes (Ceccherini-Silberstein *et al.*, 2007).

Mutações nas posições 103, 181, 190, 188 e 106, foram as mais comuns nos vírus de pacientes com falência virológica, em regime de tratamento contendo NVP ou em dose profilática única (Casado *et al.*, 2000; Conway *et al.*, 2001; Grossman *et al.*, 2004; Kantor *et al.*, 2005a).

No presente estudo detectamos a presença de mutação principal para os NNRTI em 56,3% das amostras do estado do Amazonas e em 50,5% das amostras do Pará, refletindo no nível de resistência do HIV-1 em 59,4% amostras do Amazonas e 57,4% do estado do Pará, tanto ao Efavirenz quanto à Nevirapina, as únicas drogas pertencentes a essa classe de ARV avaliadas. Qualquer tipo de mutação detectada nesse grupo de drogas ocasiona

significativa resistência cruzada a todas as drogas, por se tratar de medicamentos que apresentam uma baixa barreira genética (Clavel & Hance, 2004). Esse fato foi também observado em diversos outros estudos brasileiros (Couto-Fernandez *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2007).

Entre os PI, a barreira genética para resistência é geralmente maior. Podemos citar, como exemplo, o regime ARV contendo um *boosted* de Ritonavir, que requer múltiplas mutações que variam entre os PI, e seu grau de resistência depende tanto do número quanto do tipo de mutação presente (Shafer & Schapiro, 2005; Von Wyl, *et al.*, 2007).

As mutações secundárias ou *minor* normalmente emergem antes das principais ou *major*, e elas por si só não apresentam um efeito significativo no fenótipo (Johnson *et al.*, 2005). Em alguns casos, seu efeito pode ser para compensar o *fitness* replicativo do vírus contendo mutações *major* e em outros que contribuem para a resistência (Condra, *et al.*, 1995; Mammano, *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2005).

No presente estudo, mutações específicas associadas com resistência aos PI foram encontradas nas amostras de pacientes com falha para estes inibidores. A mutação *minor* L63P foi mais frequentemente encontrada nas amostras do estado do Amazonas com 78,1%, assim como naquelas do estado do Pará (com percentual de 65,1%). Em seguida, os códons *minor* mais encontrados nas amostras dos dois estados foram 10 e 71, o que está de acordo com resultados obtidos no estudo realizado por Couto-Fernandez e colaboradores (2005).

Com relação às mutações *major*, a mais prevalente entre os PI, encontrada nas amostras do estado do Pará, foi a M46I/L e no Amazonas, a mutação V82A/F/S/T. Porém, outros códons de resistência comuns aos dois estados foram também encontrados nas amostras: 90, 30, 47 e 50. Ressalte-se, entretanto, que as amostras dos pacientes do estado do Pará apresentaram dois códons, 84 e 32, com mutações que não foram encontradas nas amostras virais do estado do Amazonas, porém apresentaram o códon 48 não detectado entre as amostras de HIV-1 do estado do Pará.

As amostras do presente estudo apresentaram mutação principal relacionada aos PI em percentuais muito semelhantes e bastante elevados para ambos os estados. Ao inferirmos o nível de resistência, o vírus HIV-1 apresentou resistência acima de 50% para seis dos onze medicamentos avaliados para esta classe (NFV, SQV, IDV, RTV, FPV e IDV/r). No entanto, ainda permanecia sensível em nível superior a 50% às drogas LPV, FPV/r e ATV/r em ambos os estados, acrescentando-se às amostras do Pará a sensibilidade ao medicamento SQV/r.

Dentre as amostras do estudo, 28,1% do Amazonas e 24,2% do Pará apresentaram pelo menos uma mutação principal para cada uma das três classes de ARV estudadas. Entretanto, essa prevalência obtida elevou-se quando relacionamos a presença de mutação principal com duas classes de ARV como os NRTI e PI, ficando o Amazonas com 62,5% e 61,5% para o Pará.

Nas regiões genômicas da PR e RT, as variantes do HIV mostram diferenças em polimorfismos que codificam para diferentes aa (Holguin. *et al.*, 2004; Kantor *et al.*, 2005b). Algumas mutações representam assinaturas de

certos vírus não-B quando ainda não expostos a drogas ARV, tais como a mutação na protease M36I para subtipos C, F e outros subtipos não-B (Soares *et al.*, 2003).

Finalmente, a análise de mutações associadas às drogas ARV (Figura 7) mostrou claramente a diferença entre vírus subtipo B e não-B no gene da protease relacionada à mutação M36I, polimorfismo presente em apenas 30% dos vírus B, mas que atinge 70-100% dos vírus não-B (Grossman *et al.*, 2004). Entretanto, não foi encontrada clara diferença em relação aos inibidores da RT entre as demais mutações comuns aos subtipos B e não-B.

5 CONCLUSÕES

1- O subtipo B do HIV-1 foi o mais prevalente nas amostras de pacientes com falha terapêutica nos estados do Amazonas e Pará, seguido do subtipo F1 e da forma recombinante BF1.

2- A detecção do recombinante CF1 neste estudo foi o primeiro registro desse recombinante no estado do Pará e na região Amazônica.

3- A mutação mais frequente na classe dos NRTI foi M184V para as amostras do estado do Pará enquanto para as do estado do Amazonas foi a T215F/Y. A mutação mais frequente para as amostras dos estados do Amazonas e Pará foi K103N na classe dos NNRTI, e, nos PI, foi a mutação L63P para ambos os estados.

4- Na classe dos NRTI foi encontrado percentual significativo de amostras de pacientes do estado do Pará apresentando a frequência de quatro mutações nas posições 184, 41, 210 e 215, sendo essa frequência um pouco menor nas amostras do estado do Amazonas.

5- O HIV-1 se encontrou mais resistente aos ARV da classe dos NRTI, seguido da classe dos PI e posteriormente aos NNRTI para as amostras de ambos os estados investigados.

6- Inferiu-se o nível de resistência do HIV-1 aos ARV no gene da RT e as amostras analisadas do estado do Amazonas apresentaram resistência acima de 50% para oito drogas, sendo sensíveis a somente duas. No gene da PR, estavam resistentes a cinco e sensíveis a três das drogas avaliadas.

7- Inferiu-se o nível de resistência do HIV-1 aos ARV no gene da RT, e as amostras analisadas do estado do Pará estavam com resistência acima de 50% para seis drogas e sensíveis para duas. No gene da PR, estavam resistentes a seis e sensíveis a quatro.

8- As diferenças nas mutações aos inibidores da RT detectadas nos subtipos B e no não-B não mostraram significância estatística. Entretanto, a diferença mais frequente nas mutações aos PI foi em relação à mutação M36I, polimorfismo largamente encontrado em alguns subtipos não-B.

9- As amostras do estado do Amazonas sugerem maior resistência a todas as classes de ARV analisadas em comparação com as amostras do estado do Pará.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFANI, S.A., ORELLANA, R.L., DUARTE, J.P., ACEVEDO, M.W., MORALES, B.O., WOLFF, R.M., VÁSQUEZ, P., BELTRÁN, C. Resistance to antiretroviral therapy in Chilean patients with HIV-1 from 2002 to 2005. **Revista Médica de Chile**, **135**: 1237-1244, 2007.
- AIT-KHALED, M., STONE, C., AMPHLETT, G., CLOTET, B., STASZEWSKI, S., KATLAMA, C., TISDALE, M., CNA3002 International Study Team. M184V is associated with a low incidence of thymidine analogue mutations and low phenotypic resistance to zidovudine and stavudine. **AIDS**, **16**:1686-9, 2002.
- APETREI, C., MARX, P.A., SMITH, S.M. The evolution of HIV and its consequences. **Infectious Disease Clinics of North America**, **18**: 369-94, 2004.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, 2007. 364p.
- BALOTTA, C., BERLUSCONI, A., PAN, A., VIOLIN, M., RIVA, C., COLOMBO, M.C., GORI, A., PAPAGNO, L., CORVASCE, S., MAZZUCHELLI, R., FACCHI, G., VELLECA, R., SAPORETTI, G., GALLI, M., RUSCONI, S., MORONI, M. Prevalence of transmitted nucleoside analogue-resistant HIV-1 strains and pre-existing mutations in pol reverse transcriptase and protease region: outcome after treatment in recently infected individuals. **Antiviral Therapy**, **5**: 7-14, 2000.

- BARRÉ-SINOUSI, F., CHERMANNM, J.C., REY, F., NUGEYRE, M.T., CHAMRET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINETE-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROSEBAUN, W., MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). **Science**, **220**: 868-871, 1983.
- BAXTER, J.D., MERIGAN, T.C., WENTWORTH, D.N., NEATON, J.D., HOOVER, M.L., HOETELMANS, R.M., PISCITELLI, S.C., VERBIEST, W.H., MAYERS, D.L.; CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. Both baseline HIV-1 drug resistance and antiretroviral drug levels are associated with short-term virologic responses to salvage therapy. **AIDS**, **16**: 1131-1138, 2002.
- BEBENEK, K., ABBOTTS, J., ROBERTS, J.D., WILSON, S.H., KUNKEL, T. A. Error-prone polymerization by HIV-1 reverse transcriptase. Contribution of template-primer misalignment, miscoding, and termination probability to mutational hot pots. **The Journal of Biological Chemistry**, **268**: 10324-10334, 1993.
- BERGER, E.A., MURPHY, P.M., FARBER, J.M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. **Annual Review of Immunology**, **17**: 657-700, 1999.
- BOYER, J.C., BEBENEK, K., KUNKEL, T.A. Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. **Proceedings of National Academy of Sciences of The United States of America**, **89**: 6919-6923, 1992.

BRASIL. Decreto Lei Federal número 9.313, de 13 de novembro de 1996.

Dispõe sobre a distribuição gratuita de medicamentos aos portadores do HIV e Doentes de AIDS. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 14 nov. 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Algoritmo brasileiro do Programa Nacional de DST/Aids**. Brasília, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Recomendações para a terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**. Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Recomendações para a terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Recomendações para a terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV**. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos Infectados pelo HIV**. Brasília, 2008.

BRAUN, P., WIESMANN, F., WALTER, H., DAUMER, M., EHRET, R., KORN, K., KAISER, R., THIELE, B., BERG, T., STURMER, M., KNECHTEN, H. HIV-1 protease mutation L⁶³V enhances susceptibility to atazanavir and saquinavir in multidrug-resistant HIV-1 infected patients. In: IAS CONFERENCE ON HIV PATHOGENESIS, TREATMENT AND PREVENTION, 4., 2007, Sidney. **Abstract...** TUPEB036, 2007. Disponível em: <<http://www.ias2007.org/PAG/Abstracts.aspx?SID=154&AID=4796>>. Acesso em: 3 mar. 2008.

BRINDEIRO, R.M., DIAZ, R.S., SABINO, E.C., MORGADO, M.G., PIRES, I.L., BRIGIDO, L., DANTAS, M.C., BARREIRA, D., TEIXEIRA, P.R., TANURI, A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals, **AIDS**, **17**:1063-1069, 2003.

BRIONES, C., PÉREZ-OLMEDA, M., RODRÍGUEZ, C., DEL ROMERO, J., HERTOGS, K., SORIANO, V. Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, **26**: 145-150, 2001.

BUTLER, I.F., PANDREA, I., MARX, P.A., APETREI, C. HIV genetic diversity: biological and public health consequences. **Current HIV Research**, **5**: 23-45, 2007.

CARIDE, E., BRINDEIRO, R., HERTOGS, K., LADER, B., DEHERTOGH, P., MACHADO, E. MOARAES-DE-SÁ, C.A., EYER-SILVA, W.A., SION, F.S., PASSIONI, L.F., MENEZES, J.A., CALAZANS, A.R., TANURI, A. Drug-resistance reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**, **15**: 107-153, 2000.

CASADO, J.L., HERTOGS, K., RUIZ, L., DRONDA, F., VAN CAUWENBERGE, A., ARNÓ, A., GARCIA-ARATA, I., BLOOR, S., BONJOCH, A., BLAZQUEZ, J., CLOTET, B., LARDER, B. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance among patients failing a nevirapine plus protease inhibitor-containing regimen. **AIDS**, **14**: 1-7, 2000.

CASTELO FILHO, A. Qualidade de vida na era HAART. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA, 15., 2007. Curitiba, 2007. **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Infectologia, 2007. p. 12-13.

CAVALCANTI, A.M.S., LACERDA, H.R., BRITO, A.M., PEREIRA, S., MEDEIROS, D., OLIVEIRA, S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **102**: 785-792, 2007.

CECCHERINI-SILBERSTEIN, F., SVICHER, V., SING, T., ARTESE, A., SANTORO, M.M., FORBICI, F., BERTOLI, A., ALCARO, S., PALAMARA, G., D'ARMINIO MONFORTE, A., BALZARINI, J., ANTINORI, A., LENGAUER, T., PERNO, C.F. Characterization and structural analysis of novel mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase involved in the regulation of resistance to nonnucleoside inhibitors. **Journal of Virology**, **81**: 11507-11519, 2007.

CELERA DIAGNOSTIC. **ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System v2.0**: instruções de utilização. ABBOTT, 2004.

CHOE, H. Chemokine receptors in HIV-1 and SIV infection. **Archives of Pharmacal Research**, **21**: 634-639, 1998.

CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P.D., WU, L., MACKAY, C.R., LAROSA, G., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C., SODROSKI, J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. **Cell Press**, **85**: 1135-1148, 1996.

CLAVEL, F., GUETARD, D., BRUN-VEZINET, F., CHAMARET, S., REY, M. A., SANTOS-FERREIRA, M.O., LAURENT, A.G., DAUGUET, C., KATLAMA, C., ROUZIOUX, C. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, **233**: 343-346, 1986.

CLAVEL, F., HANCE, A.J. HIV Drug resistance. **The New England Journal of Medicine**, **350**: 1023-1035, 2004.

COFFIN, J.M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. **Science**, **267**: 583-589, 1995.

- COFFIN, J.M. Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: Some unifying hypotheses. **The Journal of General Virology**, **42**: 1-26, 1979.
- CONDRA, J.H., SCHLEIF, W.A., BLAHY, O.M., GABRYELSKI, L.J., GRAHAM, D.J., QUINTERO, J.C., RHODES, A, ROBBINS, H.L., ROTH, E., SHIVAPRAKASH, M, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. **Nature**, **374**: 569-571, 1995.
- CONWAY, B., WAINBERG, M.A., HALL, D., HARRIS, M., REISS, P., COOPER, D., VELLA, S., CURRY, R., ROBINSON, P., LANGE, J.M., MONTANER, J.S. Development of drug resistance in patients receiving combinations of zidovudine, didanosine and nevirapine. **AIDS**, **15**: 1269-1274, 2001.
- COOPER, D. Surge uma nova classe para a terapia contra o HIV. In: IAS CONFERENCE ON HIV PATHOGENESIS, TREATMENT AND PREVENTION, 4., 2007, Sidney. **Resumos...** Sidney: Europa Press, 2007. p. 3-4.
- COUTO-FERNANDEZ, J.C., SILVA-DE-JESUS, C., VELOSO, V.G., RACHID, M., GRACIE, R.S., CHEQUER-FERNANDEZ, S.L., OLIVEIRA, S.M., ARAKAKI-SANCHEZ, D., CHEQUER, P.J., MORGADO, M.G. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **100**: 73-78, 2005.

- COZZI-LEPRI, A., RUIZ, L., LOVEDAY, C., PHILLIPS, A.N., CLOTET, B., REISS, P., LEDERGERBER, B., HOLKMANN, C., STASZEWSKI, S., LUNDGREN, J.D. Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. EuroSIDA Study Group. **Antiviral Therapy**, **10**: 791-802, 2005.
- D'AQUILA, R.T., SCHAPIRO, J.M., BRUN-VÉZINET, F., CLOTER, B., CONWAY, B., DEMETER, L.M., GRANT, R.M., JOHNSON, V.A., KURITZKES, D.R., LOVEDAY, C., SHAFER, R.W., RICHMAN, D.D., International Aids Society-USA. Drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in HIV Medicine**, **10**: 21-25, 2002.
- DE SOUZA, A.C., DE OLIVEIRA, C.M., RODRIGUES, C.L., SILVA, S.A., LEVI, J.E. Short communication: Molecular characterization of HIV type 1 BF pol recombinants from São Paulo, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **24**: 1521-1552, 2008.
- DELGADO, E., LEÓN-PONTE, M., VILLAHERMOSA, M.L., CUEVAS, M.T., DEIBIS, L., ECHEVERRÍA, G., THOMSON, M.M., PÉREZ-ALVAREZ, L., OSMANOV, S., NÁJERA, R. Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: a UNAIDS study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **17**: 753-758, 2001.

- DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., DI MARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R.E., HILL, C.M., DAVIS, C.B., PEIPER, S.C., SCHALL, T.J., LITTMAN, D.R., LANDAU, N.R., CHUN, S.H., FLORIAN, P., GRANDINETTI, P.J., SHORE S.G. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, **381**: 661-666, 1996.
- DORANZ, B.J., RUCKER, J.Y.I.Y., SMYTH R.J., SAMSON M., PEIPER S.C., PARMENTIER M., COLLMAN R.G., DOMS R.W. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. **Cell Press**, **85**: 1149-1158, 1996.
- DOUEK, D.C., BRENCHLEY, J.M., BETTS, M.R., AMBROZAK, D.R., HILL, B.J., OKAMOTO, Y., CASAZZA, J.P., KURUPPU, J., KUNSTMAN, K., WOLINSKY, S., GROSSMAN, Z., DYBUL, M., OXENIUS, A., PRICE, D.A., CONNORS, M., KOUP, R.A. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. **Nature**, **417**: 95-8, 2002.
- DURANT, J., CLEVENBERGH, P., HALFON, P., DELGIUDICE, P., PORSIN, S., SIMONET, P., MONTAGNE, N., BOUBCHER, C.A., SCHAPIRO, J.M., DELLAMONICA, P. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomized controlled trial. **Lancet**, **353**: 2195-2199, 1999.
- DUWE, S., BRUNN, M., ALTMANN, D., HAMOUDA, O., SCHMIDT, B., WALTER, H., PAULI, G., KÜCHERER, C. Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverters Study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, **26**: 266-273, 2001.

EIGEN, M. Viral quasispecies. **Scientific American**, **269**: 42-49, 1993.

ESHLEMAN, S.H., HACKETT, J.JR., SWANSON, P., CUNNINGHAM, S.P., DREWS, B., BRENNAN, C., DEVARE, S.G., ZEKENG, L., KAPTUÉ, L., MARLOWE, N. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 2711-2717, 2004.

ESPARZA, J., BHAMARAPRAVATI, N. Accelerating the development and future availability of HIV-1 vaccines: why, when, where, and how? **Lancet**, **355**: 2061-2066, 2000.

FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., BERGER, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science**, **272**: 872-877, 1996.

FERREIRA, J.L., THOMAZ, M., RODRIGUES, R., HARRAD, D., OLIVEIRA, C.M., OLIVEIRA, C.A., BATISTA, J.P., ITO, T.S., BRIGIDO, L.F. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **103**: 800-808, 2008.

FRANKEL, A.D., YOUNG, J.A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annual Reviews Biochemistry**, **67**: 1-25, 1998.

FURUTA, R.A., WILD, C.T., WENG, Y., WEISS, C.D. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. **Nature Structural Biology**, **5**: 276-279, 1998.

- GERETTI, A.M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **19**: 1-7, 2006.
- GROSSMAN, Z., ISTOMIN, V., AVERBUCH, D., LORBER, M., RISENBERG, K., LEVI, I., CHOWERS, M., BURKE, M., BAR YAACOV, N., SCHAPIRO, J.M. Israel AIDS Multi-Center Study Group. Genetic variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. **AIDS**, **18**: 909-915, 2004.
- GUINAN, M.E., HARDY, A. Epidemiology of AIDS in women in the United States, 1981 through 1986. **The Journal of The American Medical Association**, **257**: 2039-2076, 1987.
- GÜNTHARD, H.F., WONG, J.K., IGNACIO, C.C., GUATELLI, J.C., RIGGS, N.L., HAVLIR, D.V., RICHMAN, D.D. Human Immunodeficiency Virus Replication and Genotypic Resistance in Blood and Lymph Nodes after a Year of Potent Antiretroviral Therapy. **Journal of Virology**, **72**: 2422–2428, 1998.
- GURTLE, L.G., HAUSER, P.H., ECBERLE, J., VON BRUNN, A., KNAPP, S. ZEKENG, L., TSAGUE, J.M., KAPTUE, L.A. New subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameron. **Journal of Virology**, **68**: 1581-1585, 1994.
- HAANWINCKEL, R.Z. Infectologia em foco: informações e notícias em Infectologia. Disponível em: <http://i9projetos.com.br/infectologiaemfoco_blog/?p=24>. Acesso em: 16 jun 2010.

- HAHN, B.H., SHAW, G.M., DE COCK, K.M., SHARP, P.M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, **287**: 607-614, 2000.
- HAUBRICH, R.H. Resistance and replication capacity assays: clinical utility and interpretation. **Topics in HIV Medicine**, **12**: 52-56, 2004.
- HELLERSTEIN, M.K., MCCUNE, J.M. T cell turnover in HIV-1 disease, **Immunity**, **7**: 583-589, 1997.
- HIRSCH, M.S., BRUN-VÉZINET, F., D'AQUILA, R.T., HAMMER, S.M., JOHNSON, V.A., KURITZKES, D.R., LOVEDAY, C., MELLORS, J.W., CLOTET, B., CONWAY, B., DEMETER, L.M., VELLA, S., JACOBSEN, D.M., RICHMAN, D.D. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. **The Journal of The American Medical Association**, **283**: 2417-2426, 2000.
- HO, D.D. Toward HIV eradication or Remission: tasks ahead. **Science**, **280**: 1866-1867, 1998.
- HOLGUÍN, A., PAXINOS, E., HERTOGS, K., WOMAC, C., SORIANO, V. Impact of frequent natural polymorphisms at the protease gene on the in vitro susceptibility to protease inhibitors in HIV-1 non-B subtypes. **Journal of Clinical Virology**, **31**: 215-220, 2004.
- HU, W.S., TEMIN, H.M. Retroviral recombination and reverse transcription. **Science**, **250**: 1227-1233, 1990.

JOHNSON, V.A., BRUN-VEZINET, F., CLOTET, B., CONWAY, B., KURITZKES, D.R., PILLAY, D., SCHAPIRO, J.M., TELENTI, A., RICHMAN, D.D. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2005. **Topics in HIV Medicine**, **13**: 125-131, 2005.

JOHNSON, J.A., LI, J-F., WEI, X., LIPSCOMB, J., IRLBECK, D., L. CRAIG, C., SMITH, A., BENNETT, D.E., MONSOUR, M., SANDSTROM, P., LANIER, E.R., HENEINE, W. Minority HIV-1 Drug Resistance Mutations Are Present in Antiretroviral Treatment–Naive Populations and Associate with Reduced Treatment Efficacy. **PLoS Medicine**, **5**: 158, 2008.

KALEEBU, P., FRENCH, N., MAHE, C., YIRRELL, D., WATERA, C., LYAGOBA, F., NAKIYINGI, J., RITEBEMBERWA, A., MORGAN, D., WEBER, J., GILKS, C., WHITWORTH, J. Effect of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 envelope subtypes A and D on disease progression in a large cohort of HIV-1-positive persons in Uganda. **The Journal of Infectious Diseases**, **185**: 1244-1250, 2002.

KANKI, P.J., HAMEL, D.J., SANKALE, J.L., HSIEH, C.C., THIOR, I., BARIN, F., WOODCOK, A.S., GUEYE-NDIAYE, A., ZHANG, E., MONTANO, M., SIBY, T., MARLINK, R., NDOYE, I., ESSEX, M.E., MBOUP, S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. **The Journal of Infectious Diseases**, **179**: 68-73, 1999.

- KANTOR, R., KATZENSTEIN, D.A., EFRON, B., CARVALHO, A.P., WYNHOVEN, B., CANE, P., CLARKE, J., SIRIVICHAYAKUL, S., SOARES, M.A., SNOECK, J., PILLAY, C., RUDICH, H., RODRIGUES, R., HOLGUIN, A., ARIYOSHI, K., BOUZAS, M.B., CAHN, P., SUGIURA, W., SORIANO, V., BRIGIDO, L.F., GROSSMAN, Z., MORRIS, L., VANDAMME, A.M., TANURI, A., PHANUPHAK, P., WEBER, J.N., PILLAY, D., HARRIGAN, P.R., CAMACHO, R., SCHAPIRO, J.M., SHAFER, R.W. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. **PLoS Medicine**, **2**: 112, 2005a.
- KANTOR, R., SHAFER, R.W., KATZENSTEIN, D. The HIV-1 Non-subtype B Workgroup: an international collaboration for the collection and analysis of HIV-1 non-subtype B data. **Medscape General Medicine**, **7**: 71, 2005b.
- KIWANUKA, N., LAEYENDECKER, O., ROBB, M., KIGOZI, G., ARROYO, M., MCCUTCHAN, F., ELLER, L.A., ELLER, M., MAKUMBI, F., BIRX, D., WABWIRE-MANGEN, F., SERWADDA, D., SEWANKAMBO, N.K., QUINN, T.C., WAWER, M., GRAY, R. Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Subtype on Disease Progression in Persons from Rakai, Uganda, with Incident HIV-1 Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, **197**: 707-713, 2008.
- LEDERGERBER, B., LUNDGREN, J.D., WALKER, A.S., SABIN, C., JUSTICE, A., REISS, P., MUSSINI, C., WIT, F., D'ARMINIO MONFORTE, A., WEBER, R., FUSCO, G., STASZEWSKI, S., LAW, M., HOGG, R., LAMPE, F., GILL, M.J., CASTELLI, F., PHILLIPS, A.N. Predictors of trend in CD4-positive T-cell count and mortality among HIV-1-infected individuals with virological failure to all three antiretroviral-drug classes. **Lancet**, **364**: 51-62, 2004.

- LITTLE, S.J. Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naive subjects. **Antiviral Therapy**, **5**: 33-40, 2000.
- LITTLE, S.J., DAAR, E.S., D'AQUILA, R.T., KEISER, P.H., CONNICK, E., WHITCOMB, J.M., HELLMANN, N.S., PETROPOULOS, C.J., SUTTON, L., PITT, J.A., ROSENBERG, E.S., KOUP, R.A., WALKER, B.D., RICHMAN, D.D. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. **The Journal of The American Medical Association**, **282**: 1142-1149, 1999.
- LOUWAGIE, J., McCUTCHAN, F.E., PEETERS, M., BRENNAN, T.P., SANDERS-BUELL, E., EDDY, G.A., VAN DER GREN, G., FRANSEN, K., GERSHY-DAMET, G.M., DELEYS, R. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. **AIDS Research Human Retroviruses**, **7**: 769-780, 1993.
- LUCIW, P.A. Human immunodeficiency viruses and their replication. In: **Fields Virology**. Fields, B.N, Knipe, D.M, Howley, P.M (eds). 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. v. 2.
- MACHADO, L.F.A. **Epidemiologia Molecular do Vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) nas cidades de Belém (Pará) e de Macapá (Amapá), Brasil**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Belém, Universidade Federal do Pará, 2004, 180p.
- MAMMANO, F., TROUPLIN, V., ZENNOU, V., CLAVEL, F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. **Journal of Virology**, **74**: 8524-8531, 2000.

MARCELIN, A.G., DELAUGERRE, C., WIRDEN, M., VIEGAS, P., SIMON, A., KATLAMA, C., CALVEZ, V. Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. **Journal of Medical Virology**, **72**: 162-165, 2004.

MARINS, J.R.P., JAMAL, L.F., CHEN, S.Y., BARROS, M.B., HUDES, E.S., BARBOSA, A.A., CHEQUER, P., TEIXEIRA, P.R., HEARST, N. Dramatic improvement in survival among Brazilian AIDS Patients. **AIDS Research Human Retroviruses**, **17**: 1675-1682, 2003.

MARKOWITZ, M., MOHRI, H. Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report. **Lancet**, **365**:1031-1038, 2005.

MAY, M., STERNE, J.A., SABIN, C., COSTAGLIOLA, D., JUSTICE, A.C., THIÉBAUT, R., GILL, J., PHILLIPS, A., REISS, P., HOGG, R., LEDERGERBER, B., D'ARMINIO MONFORTE, A., SCHMEISSER, N., STASZEWSKI, S., EGGER, M. Antiretroviral Therapy (ART) Cohort Collaboration. Prognosis of HIV-1-infected patients up to 5 years after initiation of HAART: collaborative analysis of prospective studies. **AIDS**, **21**: 1185-1197, 2007.

MEDEIROS, M.S., ARRUDA, E.A., GUERRANT, R.L., BROWN, C., HAMMARSKJOLD, M.L., REKOSH, D., LIMA, A.A. Genotype testing and antiretroviral resistance profiles from HIV-1 patients experiencing therapeutic failure in northeast Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **11**: 528-529, 2007.

MENDONÇA, J.S. HIV/AIDS nos dias atuais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA, 15., 2007. Curitiba, 2007. **Anais...** Curitiba: Sociedade Brasileira de Infectologia, 2007. p. 1-2.

MILLER, M.D., MARGOT, N., LU, B., ZHONG, L., CHEN, S.S., CHENG, A., WULFSOHN, M. Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. **The Journal of Infectious Diseases**, **189**: 837-46, 2004.

MILLER, V., PHILLIPS, A.N., CLOTET, B., MOCROFT, A., LEDERGERBER, B., KIRK, O., ORMAASEN, V., GARGALIANOS-KAKOLYRIS, P., VELLA, S., LUNDGREN, J.D. Association of virus load, CD4 cell count, and treatment with clinical progression in human immunodeficiency virus-infected patients with very low CD4 cell counts. **The Journal of Infectious Diseases**, **186**: 189-197, 2002.

MINERS, A.H., SABIN, C.A., MOCROFT, A., YOULE, M., FISHER, M., JOHNSON, M. Health-Related quality of life in individuals infected with HIV in the era of HAART. **HIV Clinical Trials**, **2**: 484-492, 2001.

MIOTTI, P.G., TAHA, T.E., KUMWENDA, N.I., BROADHEAD, R., MTIMAVALYE, L.A., VAN DER HOEVEN, L., CHIPHANGWI, J.D., LIOMBA, G., BIGGAR, R.J. HIV transmission through breastfeeding: a study in Malawi. **The Journal of The American Medical Association**, **282**: 744-749, 1999.

MONTANO, S.M., SANCHEZ, J.L., LAGUNA-TORRES, A., CUCHI, P., AVILA, M.M., WEISSENBACHER, M., SERRA, M., VIÑALES, J., RUSSI, J.C., AGUAYO, N., GALEANO, A.H., GIANELLA, A., ANDRADE, R., ARREDONDO, A., RAMIREZ, E., ACOSTA, M.E., ALAVA, A., MONTOYA, O., GUEVARA, A., MANRIQUE, H., SANCHEZ, J.L., LAMA, J.R., DE LA HOZ, F., SANCHEZ, G.I., AYALA, C., PEREZ, J.J., NEGRETE, M., RUSSELL, K.L., BAUTISTA, C.T., OLSON, J.G., WATTS, D.M., BIRX, D.L., CARR, J.K. Prevalences, genotypes, and risk factors for HIV transmission in South America. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **40**: 57-64, 2005.

MORENO, S., HERNÁNDEZ, B., DRONDA, F. Didanosine enteric-coated capsule: current role in patients with HIV-1 infection. **Drugs**, **67**: 1441-1462, 2007.

MORGADO, M.G., GUIMARÃES, M.L., GALVÃO-CASTRO, B. Hiv-1 Polymorphism: A Challenge for Vaccine Development - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97**: 143-150, 2002.

- MORGADO, M.G., GUIMARAES, M.L., GRIPP, C.B., COSTA, C.I., NEVES, I. JR., VELOSO, V.G., LINHARES-CARVALHO, M.I., CASTELLO-BRANCO, L.R., BASTOS, F.I., KUIKEN, C., CASTILHO, E.A., GALVAO-CASTRO, B., BONGERTZ, V. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **18**: 488-494, 1998.
- MUESING, M.A., SMITH, D.H., CABRADILLA, C.D., BENTON, C.V., LASKY, L.A., CAPON, D.J. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. **Nature**, **313**: 450-458, 1985.
- NAEGER, L.K., MARGOT, N.A., MILLER, M.D. Increased drug susceptibility of HIV-1 reverse transcriptase mutants containing M184V and zidovudine-associated mutations: analysis of enzyme processivity, chain-terminator removal and viral replication. **Antiviral Therapy**, **6**: 115-126, 2001.
- NIEUWKERK, P.T., GISOLF, E.H., REIJERS, M.H., LANGE, J.M., DANNER, S.A., SPRANGERS, M.A.; NATIVE STUDY GROUP; PROMETHEUS STUDY GROUP; ADAM STUDY GROUP. Long-term quality of life outcomes in three antiretroviral treatment strategies for HIV-1 infection. **AIDS Research Human Retroviruses**, **15**: 1985-1991, 2001.

NOVITSKY, V.A., MONTANO, M.A., MCLANE, M.F., RENJIFO, B., VANNBERG, F., FOLEY, B.T., NDUNG'U, T.P., RAHMAN, M., MAKHEMA, M. J., MARLINK, R., ESSEX, M. Molecular cloning and phylogenetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C: a set of 23 full-length clones from Botswana. **Journal of Virology**, **73**: 4427-4432, 1999.

OVERBAUGH, J., BANGHAM, C.R.M. Selection forces and constraints on retroviral sequence variation. **Science**, **292**: 1106-1109, 2001.

PALELLA, F.J.JR, DELANEY, K.M., MOORMAN, A.C., LOVELESS, M.O., FUHRER, J., SATTEN, G.A., ASCHMAN, D.J., HOLMBERG, S.D. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **The New England Journal of Medicine**, **338**: 853-860, 1998.

PANDO, M.A., EYZAGUIRRE, L.M., SEGURA, M., BAUTISTA, C.T., MARONE, R., CEBALLOS, A., MONTANO, S.M., SÁNCHEZ, J.L., WEISSENBACHER, M., AVILA, M.M., CARR, J.K. First report of an HIV-1 triple recombinant of subtypes B, C and F in Buenos Aires, Argentina. **Retrovirology**, **3**: 59, 2006.

PERELSON, A.S., NEUMANN, A.U., MARKOWITZ, M., LEONARD, J.M., HO, D.D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science**, **271**: 1582- 1586, 1996.

PERNO, C.F., COZZI-LEPRI, A., BALOTTA, C., FORBICI, F., VIOLIN, M., BERTOLI, A., FACCHI, G., PEZZOTTI, P., ANGARANO, G., ARICI, C., NARCISO, P., ORANI, A., RAISE, E., SCALZINI, A., POGGIO, A., IPPOLITO, G., MORONI, M., MONFORTE, A.D.; ICONA Study Group. Impact of mutations conferring reduced susceptibility to lamivudine on the response to antiretroviral therapy. **Antiviral Therapy**, **6**: 195-198, 2001.

PÉREZ, L., ALVAREZ, L.P., CARMONA, R., ARAGONÉS, C., DELGADO, E., THOMSON, M.M., GONZÁLEZ, Z., CONTRERAS, G., PÉREZ, J., NÁJERA, R. Genotypic resistance to antiretroviral drugs in patients infected with several HIV type 1 genetic forms in Cuba. **AIDS Research Human Retroviruses**, **23**: 407-414, 2007.

PEUCHANT, O., CAPDEPONT, S., RAGNAUD, J.M., AURILLAC-LAVIGNOLLE, V., THIÉBAUT, R., FLEURY, H., MASQUELIER, B.; ANRS CO3 AQUITAINE COHORT. Primary resistance to enfuvirtide (T20) in recently HIV-1 infected, antiretroviral-naive patients from the ANRS Aquitaine Cohort. **Antiviral Therapy**, **12**: 559-562, 2007.

PIRES, I.L., SOARES, M.A., SPERANZA, F.A., ISHII, S.K., VIEIRA, M.C., GOUVÊA, M.I., GUIMARÃES, M.A., DE OLIVEIRA, F.E., MAGNANINI, M.M., BRINDEIRO, R.M., TANURI, A. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 426-430, 2004.

QUINONES-MATEU, M.E., BALL, S.C., MAROZSAN, A.J., TORRE, V.S., ALBRIGHT, J.L., VANHAM, G., VAN DER GROEN, G., COLEBUNDERS, R.L., ARTS, E.J. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. **Journal Virology**, **74**: 9222-9233, 2000.

RACHID, M., SCHECHTER, M. **Manual de HIV/AIDS**. 7.ed. 2003. p. 19.

RIOS, M., FERNANDEZ, J., JARAMILLO, P., PAREDES, V., SANCHEZ, J.L., LAGUNA-TORRES, V.A., CARR, J.K., RAMIREZ, E. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Chile: differential geographic and transmission route distribution of B and F subtypes. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **21**: 835-840, 2005.

ROBBINS, K.E., KOSTRIKIS, L.G., BROWN, T.M., ANZALA, O., SHIN, S., PLUMMER, F.A., KALISH, M.L. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains in Kenya: a comparison using phylogenetic analysis and a combinatorial melting assay. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **15**: 329-335, 1999.

ROBERTSON, D.L., SHARP, P.M., McCUTCHAN, F.E., HAHN, B.H.: Recombination in HIV-1. **Nature**, **374**: 124-126, 1995.

ROBERTSON, D.L., ANDERSON, J.P., BRADAC, J.A., CARR, J.K., FOLEY, B., FUNKHOUSER, R.K., GAO, F., HAHN, B.H., KALISH, M.L., KUIKEN, C., LEARN, G.H., LEITNER, T., McUTCHAN, F., OSMANOV, S., PEETERS, M., PIENIAZEK, D., SALMINEN, M., SHARP, P.M., WOLINSKY, S., KORBER, B. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, **288**: 55-56, 2000.

- ROSS, L., LIM, M.L., LIAO, Q., WINE, B., RODRIGUEZ, A.E., WEINBERG, W., SHAEFER, M. Prevalence of antiretroviral drug resistance and resistance-associated mutations in antiretroviral therapy-naïve HIV-infected individuals from 40 United States cities. **HIV Clinical Trials**, **8**: 1-8, 2007.
- SA FILHO, D.J., SUCUPIRA, M.C., CASEIRO, M.M., SABINO, E.C., DIAZ, R.S., JANINI, L.M. Identification of two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **22**: 1-13, 2006.
- SAAG, M.S., HAHN, B.H., GIBBONS, J., LI, Y., PARKS, E.S., PARKS, W.P., SHAW, G.M. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. **Nature**, **334**: 440-444, 1988.
- SANNE, I.M. Cardiovascular risk in HIV-1 patients on and off antiretroviral Therapy. In: CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS (CROI), 15., 2008. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/570829>>. Acesso em: 11 mar. 2008.
- SCOTT, P., ARNOLD, E., EVANS, B., POZNIAK, A., MOYLE, G., SHAHMENESH, M., WHITE, D., SHIRLEY, J., CANE, P., PILLAY, D. Surveillance of HIV antiretroviral drug resistance in treated individuals in England: 1998-2000. **The Journal Antimicrobial Chemotherapy**, **53**: 469-473, 2004.
- SHAFER, R.H. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**: 247-277, 2002.

- SHAFER, R.W., SCHAPIRO, J.M. Drug resistance and antiretroviral drug development. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **55**: 817-820, 2005.
- SHAFER, R.W., WINTERS, M.A., PALMER, S., MERIGAN, T.C. Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. **Annals of Internal Medicine**, **128**: 906-911, 1998.
- SHANKARAPPA, R., CHATTERJEE, R., LEARN, G.H., NEOGI, D., DING, M., ROY, P., GHOSH, A., KINGSLEY, L., HARRISON, L., MULLINS, J.I., GUPTA, P. Human immunodeficiency virus type 1 env sequences from Calcutta in eastern India: identification of features that distinguish subtype C sequences in India from other subtype C sequences. **Journal of Virology**, **75**: 10479-10487, 2001.
- SHEN, L., PETERSON, S., SEDAGHAT, A.R., MCMAHON, M.A., CALLENDER, M., ZHANG, H., ZHOU, Y., PITT, E., ANDERSON, K.S., ACOSTA, E.P., SILICIANO, R.F. Dose-response curve slope sets class-specific limits on inhibitory potential of anti-HIV drugs. **Nature Medicine**, **14**:762-766, 2008.
- SIMON, F., MAUCLERE, P., ROQUES, P., LOUSSERT-AJAKA, I., MULLER-TRUTWIN, M.C., SARAGOSTI, S., GEORGES-COURBOT, M.C., BARRE-SINOUSI, F., BRUN-VEZINET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Medicine**, **4**: 1032-1037, 1998.

SOARES, M.A., DE OLIVEIRA, T., BRINDEIRO, R.M., DIAZ, R.S., SABINO, E.C., BRIGIDO, L., PIRES, I.L., MORGADO, M.G., DANTAS, M.C., BARREIRA, D., TEIXEIRA, P.R., CASSOL, S., TANURI, A. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. **AIDS**, **17**: 11-21, 2003.

STANFORD UNIVERSITY. **HIV drug resistance database**. Disponível em: <<http://hivdb.stanford.edu/index.html>>. Acesso em: 20 jul. 2006.

TAMALET, C., FANTINI, J., TOURRES, C., YAHY, N. Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **17**: 2383-2388, 2003.

TANG, J.W., PILLAY, D. Transmission of HIV-1 drug resistance. **Journal of Clinical Virology**, **30**: 1-10, 2004.

TANURI, A., SWANSON, P., DEVARE, S., BERRO, O.J., SAVEDRA, A., COSTA, L.J., TELLES, J.G., BRINDEIRO, R., SCHABLE, C., PIENIAZEK, D., RAYFIELD, M. HIV-1 subtypes among blood from Rio de Janeiro Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **20**: 60-66, 1999.

- TANURI, A., CARIDEA, E., DANTAS, M.C., MORGADO, M.G., MELLO, D.L., BORGES, S., TAVARES, M., FERREIRA, S.B., SANTORO-LOPES, G., MARTINS, C.R., ESTEVES, A.L., DIAZ, R.S., ANDREO, S.M., FERREIRA, L.A., RODRIGUES, R., REUTER, T., CAVALCANTI, A.M., DE OLIVEIRA, S.M., DE BARBOSA, H.B., TEIXEIRA, P.R., CHEQUER, P.N. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. **Journal of Clinical Virology**, **25**: 39-46, 2002.
- THOMSON, M.M., DELGADO, E., HERRERO, I., VILLAHERMOSA, M.L., VÁZQUEZ-DE PARGA, E., CUEVAS, M.T., CARMONA, R., MEDRANO, L., PÉREZ-ALVAREZ, L., CUEVAS, L., NÁJERA, R. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. **The Journal of General Virology**, **83**: 107-119, 2002a.
- THOMSON, M.M., PÉREZ-ALVAREZ, L., NÁJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **The Lancet Infectious Diseases**, **2**: 461-471, 2002b.
- TURAL, C., RUIZ, L., HOLTZER, C., SCHAPIRO, J., VICIANA, P., GONZÁLEZ, J., DOMINGO, P., BOUCHER, C., REY-JOLY, C., CLOTET, B.; Havana Study. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial.Group. **AIDS**, **16**: 209-218, 2002.
- TURNER, B.G., SUMMERS, M.F. Structural biology of HIV. **Journal of Molecular Biology**, **285**: 1-32, 1999.

- UGEN, K.E., SRIKANTAN, V., GOEDERT, J.J., NELSON, R.P.JR., WILLIAMS, W.V., WEINER, D.B. Vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1: seroreactivity by maternal antibodies to the carboxy region of gp41 envelope glycoprotein. **The Journal of Infectious disease**, **175**: 63-69, 1997.
- USA. Department of Health and Human Services. **Panel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents**: Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. 2009. Available at www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf. Accessed April 30, 2010.
- VAISHNAV, Y.N., WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. **Annual Reviews Biochemistry**, **60**: 577-630, 1991.
- VASAN, A., RENJIFO, B., HERTZMARK, E., CHAPLIN, B., MSAMANGA, G., ESSEX, M., FAWZI, W., HUNTER, D. Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype. **Clinical Infectious Diseases**, **42**: 853-854, 2006.
- VELLA, S., PALMISANO, L. Antiviral therapy: state of the HAART. **Antiviral Research**, **45**: 1-7, 2000.
- VELLA, S., PALMISANO, L. Antiviral therapy: state of the HAART. **Clinical Infectious Diseases**, **41**: 239-246, 2005.
- VERMUND, S.H. Millions of life-years saved with potent antiretroviral drugs in the United States: a celebration, with challenges. **The Journal of Infectious Diseases**, **194**: 1-5, 2006.

- VERONESE, F.D., DE VICO, A.L., COPELAND, T.H., OROSZLAN, S., GALLO, R.C., SAMGADHARAN, M.G. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. **Science**, **229**: 1402-1405, 1985.
- VERONESI, R., FOCACCIA, R., LOMAR, A.V. **Retroviroses Humanas HIV/AIDS**. São Paulo: Atheneu, 2000. p.1-12. cap.1.
- VICENTE, A.C., OTSUKI, K., SILVA, N.B., CASTILHO, M.C., BARROS, F.S., PIENIAZEK, D., HU, D., RAYFIELD, M.A., BRETAS, G., TANURI, A. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **23**: 327-331, 2000.
- VIDAL, N., PEETERS, M., MULANGA-KABEYA, C., NZILAMBI, N., ROBERTSON, D., ILUNGA, W., SEMA, H., TSHIMANGA, K., BONGO, B., DELAPORTE, E. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. **Journal Virology**, **74**: 10498-10507, 2000.
- VON WYL, V., YERLY, S., BÖNI, J., BÜRGISSER, P., KLIMKAIT, T., BATTEGAY, M., FURRER, H., TELENTI, A., HIRSCHHEL, B., VERNAZZA, P.L., BERNASCONI, E., RICKENBACH, M., PERRIN, L., LEDERGERBER, B., GÜNTHARD, H.F.; for the Swiss HIV Cohort Study. Emergence of HIV-1 drug resistance in previously untreated patients initiating combination antiretroviral treatment: a comparison of different regimen types. **Archives of Internal Medicine**, **167**: 1782-1790, 2007.

- WAINBERG, M.A. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. **Aids Research and Human Retroviruses**. **18(Suppl 3)**: S63-68, 2004.
- WILSON, J.W. Update on antiretroviral drug resistance testing: combining laboratory technology with patient care. **The AIDS Reader**, **13**: 25-38, 2003.
- WILSON, J.W., BEAN, P. A Physician's Primer to Antiretroviral Drug Resistance Testing. **The AIDS Reader**, **10**: 469-478, 2000.
- YENI, P.G., HAMMER, S.M., HIRSCH, M.S., SAAG, M.S., SCHECHTER, M., CARPENTER, C.C., FISCHL, M.A., GATELL, J.M., GAZZARD, B.G., JACOBSEN DM, KATZENSTEIN DA, MONTANER JS, RICHMAN DD, SCHOOLEY, R.T., THOMPSON, M.A., VELLA, S., VOLBERDING, P.A. Treatment for adult HIV infection: 2004 recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. **The Journal of The American Medical Association**, **292**: 251-265, 2004.
- YU, X.F., CHEN, J., SHAO, Y., BEYRER, C., LAI, S. Two subtypes of HIV-1 among injection-drug users in southern China. **Lancet**, **351**: 1250, 1998.

ANEXOS

ANEXO A – DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS



Carta de nº 0032/2007
 Protocolo CEP/IEC - Nº 0030/07
 CAAE: 0027.0.072.000-07

Ananindeua/PA, 19 de dezembro de 2007.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Caracterização molecular da resistência secundária aos anti-retrovirais em pacientes com AIDS e prevalência de subtipos do HIV-1 nos Estados do Pará e Amazonas. Brasil: 2002 a 2006”.

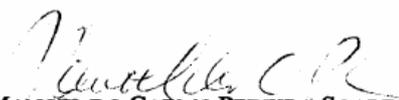
Pesquisador Responsável: OLINDA MACÊDO

Conforme tramitação junto ao CEP/IEC, o projeto em questão foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

ANEXO B – FORMULÁRIOS PARA EXAME DE GENOTIPAGEM

| | | |
|---|--|--|
| Ministério da Saúde | Formulário de Solicitação para Exame de Genotipagem * | Formulário A |
| CN-DST/Aids Secretaria de Políticas de Saúde | | Nº do parecer _____ |
| 1. Unidade de Saúde onde realiza o tratamento | | |
| 2. CNPJ da Unidade de Saúde | | |
| 3. Telefones de contato da Unidade de Saúde (DDD + número dos telefones) | | |
| DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE | | |
| 4. Nome (por extenso sem abreviações) | | |
| 5. Número do cartão CN-DST/AIDS | 6. Número de documento | 7. Tipo de documento |
| 8. Data de nascimento | 9. Sexo <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino | 10. Prontuário |
| | | 11. Gestante <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não |
| 12. Cidade de nascimento | | 13. UF |
| 14. Nome da mãe (por extenso sem abreviações) | | |
| 15. Cidade de residência atual | | 16. UF |
| 17. Tempo de permanência na cidade de residência atual Residência atual: _____ ano(s) _____ mês(es) | | 18. CPF do responsável (se paciente menor de idade) |
| 19. Nome do responsável (se paciente menor de idade) | | |
| DADOS CLÍNICOS | | |
| 20. Diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV (mês/ano) _____/_____/_____ <input type="checkbox"/> IG/N | 21. Paciente compareceu às últimas 3 consultas médicas de retorno agendadas? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> IG/N | 22. História patológica progressiva. Doença definidora de Aids? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não |
| 23. Estado clínico atual <input type="checkbox"/> Assintomático <input type="checkbox"/> Sintomático. Especificar: _____ | | |
| 24. As condições clínicas do paciente ou uso de medicamentos contra-indicam a utilização de algum medicamento a ser utilizado em esquema ARV futuro? Quais? _____ | | |
| 25. Resultado de Linfócitos T CD4+ (cél/s/mm ³) e (%) (Mês) / (Ano) Último: _____ (_____%) Penúltimo: _____ (_____%) Mais baixo: _____ (_____%) | 26. Resultado de Carga Viral (cópias/ml e log) (Método: N – NASBA; P – PCR; b – b-DNA) (Mês) (Ano) Carga Viral imediatamente antes do esquema ARV atual: _____ Log _____ Método: _____ Coleta: _____ Primeira Carga Viral após o esquema ARV atual: _____ Log _____ Método: _____ Coleta: _____ Segunda Carga Viral após o esquema ARV atual: _____ Log _____ Método: _____ Coleta: _____ Carga Viral mais baixa durante o esquema ARV atual: _____ Log _____ Método: _____ Coleta: _____ Última Carga Viral realizada: _____ Log _____ Método: _____ Coleta: _____ | |
| 27. Maior Carga Viral já apresentada pelo paciente Cópias: _____ Log: _____ Método: _____ Coleta: _____ | | |
| 28. MEDICAÇÕES ANTI-RETROVIRAIS JÁ UTILIZADAS E ATUALMENTE EM USO PELO PACIENTE | | |
| Esquema ARV | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
| 1º. _____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ |
| | | <input type="checkbox"/> FT <input type="checkbox"/> INT <input type="checkbox"/> Outros: _____ |
| 2º. _____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ |
| | | <input type="checkbox"/> FT <input type="checkbox"/> INT <input type="checkbox"/> Outros: _____ |
| 3º. _____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ |
| | | <input type="checkbox"/> FT <input type="checkbox"/> INT <input type="checkbox"/> Outros: _____ |
| 4º. _____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ |
| | | <input type="checkbox"/> FT <input type="checkbox"/> INT <input type="checkbox"/> Outros: _____ |
| 5º. _____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ | _____/_____/_____/_____/_____/_____ |
| | | <input type="checkbox"/> FT <input type="checkbox"/> INT <input type="checkbox"/> Outros: _____ |
| <small>Zidovudina (ZDV) Zalcitabina (dC) Abacavir (ABC) Delavirdina (DLV) Efavirenz (EFZ) Ritonavir (RTV) Nelfinavir (NFV) Lopinavir/Ritonavir (LPVr) Indinavir/Ritonavir (IDV/RTV 800/200) Didanosina (ddI) Lamivudina (3TC) Estavudina (d4T) Nevirapina (NVP) Saquinavir (SQV) Indinavir (IDV) Amprenavir (APV) Indinavir/Ritonavir (IDV/RTV 800/100)</small> | | |
| 29. Nome do médico solicitante | | |
| 30. Data do preenchimento Data: ____/____/____ | 31. CRM do médico solicitante CRM/UF: ____/____ | 32. Médico solicitante _____ Carimbo e assinatura |

* Preencher todos os campos de forma legível para não inviabilizar a análise do formulário de solicitação.

Versão 6.0 página 1/1

| | | |
|---|---|--|
| 1. Unidade de Saúde onde realiza o tratamento | | |
| | | |
| 2. CNPJ da Unidade de Saúde | | 3. Telefones de contato |
| | | |
| DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE | | |
| 4. Nome (por extenso sem abreviações) | | |
| | | |
| 5. Número do cartão CN-DST/AIDS | 6. Número de identidade | 7. Tipo de documento |
| | | |
| 8. Data de nascimento | 9. Sexo Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> | 10. Prontuário |
| | | |
| 11. Gestante Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | |
| 12. Data do recebimento da solicitação Data: ____/____/____ | 13. CRM do médico solicitante CRM/UF: ____/____ | 14. Nome do médico solicitante |
| | | |
| 15. Deferimento Pedido Indeferido <input type="checkbox"/> Pedido Deferido <input type="checkbox"/> | 16. Motivo(s) | |
| | | |
| 17. Nome do Médico de Referência em Genotipagem | | |
| | | |
| 18. Telefone de contato | 19. Fax de contato | 20. E-mail de contato |
| | | |
| 21. Data do parecer Data: ____/____/____ | 23. Médico de Referência em Genotipagem | |
| | | |
| 22. CRM do Médico de Referência em Genotipagem CRM/UF: ____/____ | Carimbo e assinatura | |
| | | |
| PARA PREENCHIMENTO PELO LOCAL DE COLETA | | |
| 24. Nome da instituição | 25. Data da coleta | 26. Hora coleta |
| | | |
| PARA PREENCHIMENTO PELO LABORATÓRIO EXECUTOR DO EXAME | | |
| 27. Nome da instituição | 28. Data do recebimento | 29. Hora |
| | | |
| Genotipagem | 30. Identificador da amostra no laboratório | 31. Condições de chegada da amostra <input type="checkbox"/> 1-Amostra adequada / 2-Amostra hemolisada / 3-Amostra em frasco inadequado / 4-Amostra mal identificada / 5-Amostra mal acondicionada / 7-Outros _____ |
| | | |
| | 32. Responsável pelo preenchimento | |
| | | |

Ministério
da
Saúde

Sugestão Clínica do Médico de Referência em Genotipagem

Formulário C

CN-DST/Aids Secretaria de Políticas de Saúde

Nº do parecer _____

| | | | |
|---|--|---|----------------------|
| 1. Unidade de Saúde onde realiza o tratamento | | | |
| | | | |
| 2. CNPJ da Unidade de Saúde | | 3. Telefones de contato | |
| | | | |
| DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE | | | |
| 4. Nome (por extenso sem abreviações) | | | |
| | | | |
| 5. Número do cartão CN-DST/AIDS | | 6. Número de identidade | 7. Tipo de documento |
| | | | |
| 8. Data de nascimento | 9. Sexo | | 10. Prontuário |
| | Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> | | |
| 11. Gestante | | | |
| Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> | | | |
| 12. Data do recebimento da solicitação | 13. CRM do médico solicitante | 14. Nome do médico solicitante | |
| Data: ____/____/____ | CRM/UF: ____/____ | | |
| | | | |
| 15. Interpretação clínica do resultado | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| 16. Esquema anti-retroviral sugerido | | | |
| A) _____ | | | |
| B) _____ | | | |
| C) _____ | | | |
| D) _____ | | | |
| | | | |
| 17. Observações | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| 18. Nome do Médico de Referência em Genotipagem | | | |
| | | | |
| | | | |
| 19. Telefone de contato | 20. Fax de contato | 21. E-mail de contato | |
| | | | |
| 22. Data da sugestão clínica | | 24. Médico de Referência em Genotipagem | |
| Data: ____/____/____ | | | |
| 23. CRM do Médico de Referência em Genotipagem | | | |
| CRM/UF: ____/____ | | Carimbo e assinatura | |

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST/AIDS – MINISTÉRIO DA SAÚDE REDE NACIONAL DE GENOTIPAGEM (RENAGENO)

Consentimento Livre Esclarecido

O Ministério da Saúde e a Coordenação Nacional de DST e AIDS, em conjunto com outras instituições públicas, procurando detectar a ocorrência de resistência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em indivíduos que estejam utilizando medicamentos anti-retrovirais, vem procurando implantar uma rede nacional de laboratórios aptos a executar o exame conhecido como genotipagem. A realização desse exame, além de possibilitar a obtenção de informações ligadas à capacidade desse vírus de resistir aos medicamentos anti-retrovirais disponíveis, também poderá contribuir nas ações de combate à aids. A resistência do HIV aos medicamentos pode comprometer a capacidade dessas drogas beneficiar as pessoas infectadas.

Para a realização desse estudo, é necessário que seja colhido 10 ml do seu sangue. Uma ou mais coletas posteriores podem ser solicitadas a você, mas a autorização a essa coleta atual não obriga a aceitar coletas posteriores. O sangue por você doado, além de permitir o isolamento e a caracterização do HIV, também deverá ter uma parte preservada para análises posteriores em instituições ligadas ao Ministério da Saúde ou à Organização Mundial da Saúde porém, sempre dentro dos objetivos descritos acima. Caso alguma metodologia nova venha usar o material por você doado e isso traga informações que possa beneficiá-lo, essas informações estarão a sua disposição, sendo repassadas à unidade de saúde onde você está sendo acompanhado, após aprovação de um comitê de bioética. Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para esse ou outro estudo, e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico. A eventual concordância agora não implica em nenhuma obrigação de coletas futuras. Se você concordar em participar dessa pesquisa, acontecerá o seguinte:

- um dos pesquisadores, seu médico ou alguém da equipe de saúde poderá fazer uma breve entrevista e, após consulta ao seu prontuário, deverá constar o seu nome, dados de identificação, entre outras informações. Todas essas informações serão anotadas de forma confidencial. Mesmo participando do estudo, você poderá se recusar a fornecer algumas das informações solicitadas, desde que isso não comprometa a avaliação do exame. Em momento algum seu nome será associado à entrevista em publicações do estudo. O resultado dessa pesquisa, se divulgado, irá garantir o total anonimato e a confidencialidade dos pacientes participantes.
- será coletado 10 ml de sangue do seu braço. Como em qualquer coleta de sangue, costuma haver desconforto local e risco da formação de hematomas leves. Todas as medidas habituais serão tomadas para que isso não aconteça. Sempre que possível, essa coleta será realizada junto aos exames de rotina, evitando-se assim, coletas extras.
- os resultados dos exames de genotipagem serão encaminhados para a unidade de saúde onde você é acompanhado.

Obs.: Mesmo após a assinatura desse documento, o seu exame poderá não ser colhido se as suas condições não preencherem os critérios de inclusão na RENAGENO.

Qualquer dúvida, favor contatar seu médico em sua unidade de saúde ou a Unidade de Assistência, Diagnóstico e tratamento (UDAT) de CN DST/Aids pelos telefones 0XX-61-448 8008 ou 448 8009.

Eu, abaixo assinado, responsabilizo-me pelo cumprimento das condições aqui expostas.

Maria Candida de Souza Dantas – Coordenação Nacional de DST e Aids (UDAT)

Assinatura:

Nome do médico responsável pelo paciente na unidade de saúde: _____

Assinatura:

Após leitura do texto acima, afirmo ter compreendido o propósito do estudo e concordo em participar dessa pesquisa:

Nome:

Assinatura:

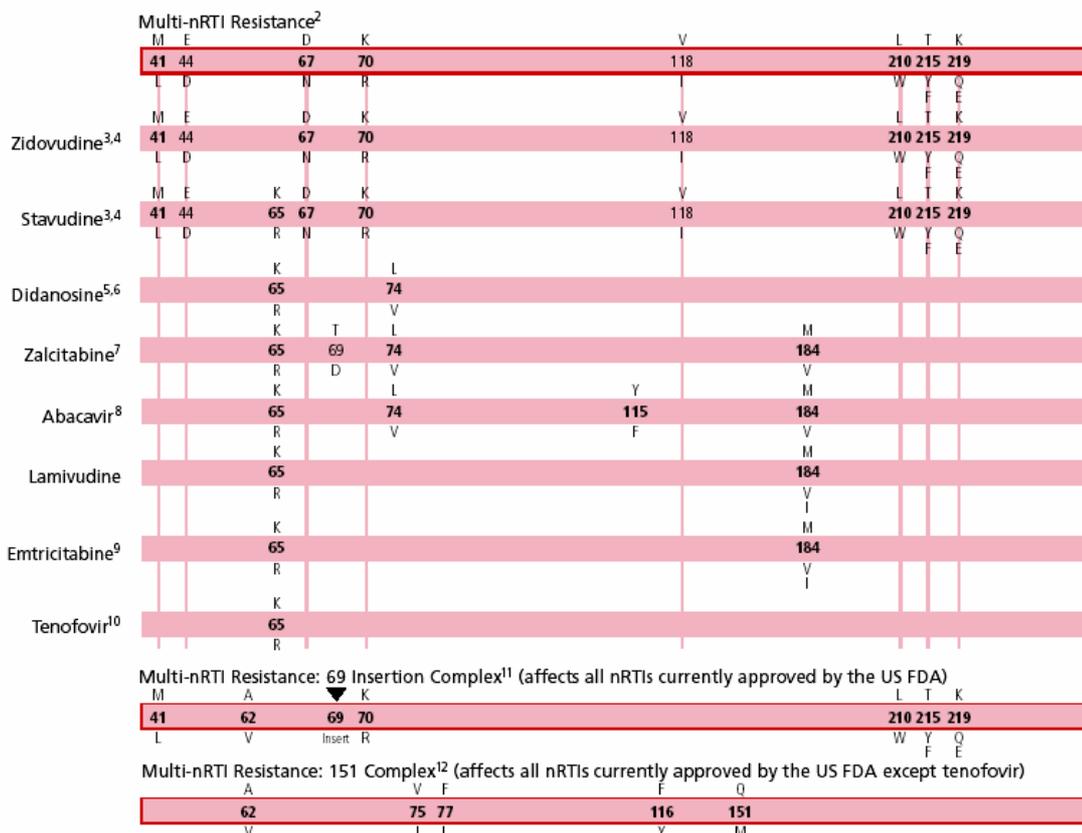
Local (Cidade/Estado)

Data: / / 200

ANEXO D – MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA PROPOSTAS POR JOHNSON (2005)

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

Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors (nRTIs)¹



Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{1,13}

