

GRAZIELA TESCAROLLO

PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E PERFIL DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO RECENTE ATENDIDOS EM CENTROS DE TESTAGEM E ACONSELHAMENTO DA CIDADE DE SÃO PAULO.

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Co-orientador: Dra. Maria Cecilia Araripe Sucupira

São Paulo/SP
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TESCAROLLO, Graziela

Prevalência de resistência primária e perfil da diversidade genética do HIV-1 em indivíduos com infecção recente atendidos em Centros de Testagem e Aconselhamento da cidade de São Paulo./ Graziela Tescarollo. – São Paulo, 2005.

xii, 85f.

Tese (Mestrado) – Universidade\Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Título em Inglês: Prevalence of primary resistance and genetic diversity of HIV-1 in individuals with recent infection seen at the Counseling Testing Center of São Paulo.

1- HIV-1, 2- Infecção recente, 3- Resistência primária, 4- Diversidade genética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Sergio Barsanti Wey

Coordenador do curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo

Aos meus pais, Marlene e Sergio,
a minha irmã Antonela e ao Cássio

Agradecimentos

Ao Prof Dr Ricardo Sobhie Diaz, diretor do Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP, pela orientação e pelo apoio científico durante este projeto, pela imensa ajuda e carinho dedicados nestes três anos.

Ao Prof Dr. Reinaldo Salomão, chefe da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, por permitir que este trabalho fosse realizado com total apoio técnico, financeiro e administrativo.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo, coordenador do curso de Pós-graduação, pelos prazos estendidos e pela paciência.

A Dra. Maria Cecilia Araripe Sucupira, pela amizade, apoio e ajuda (e muita) em todos os sentidos que tenho recebido desde que nos conhecemos. Obrigada por ser sempre o meu porto seguro!

Ao Prof Dr Esper George Kallas, por ceder as amostras que foram estudadas nesta tese e pelo apoio prestado sempre que necessário.

Ao Prof. Dr. Luis Mario Ramos Janini, pelas correções e pelo incentivo científico.

Ao meu amigo Dercy, por me aturar com as constantes dúvidas sobre como realizar as análises filogenéticas aqui apresentadas.

A Sandra Mara, pela enorme amizade, risos e grande disposição não só na ajuda técnica, mas também nos conselhos profissionais.

A Patrícia Munerato, pelo convívio tão agradável e pela amizade demonstrada, a qual espero mantê-la por muito tempo.

A todos os colegas que foram e os que são do Laboratório de Retrovirologia, Ana Carolina, Carlos, Cristiano, Elizabeth, Érika, Daniela, Fábio, Gedson, Giana, Gildo,

Mario, Patrícia, Sandra, Shirley e Michele, por fazer da “retro” um lugar tão prazeroso de se trabalhar!

Aos meus amigos de carga viral, Sidmar e Daniela pelo curto tempo em que trabalhamos juntos, mas que foi suficiente para revelar uma enorme amizade.

Ao Charlys, pela colaboração e socorro em todos os momentos.

A FAPESP, pela bolsa de mestrado e pelo financiamento do projeto temático (Processo nº 98/14381-4) que possibilitaram o desenvolvimento desta tese.

A Simone, por permitir que eu usasse seu computador todas as noites, e ao Victor por me socorrer do abandono do Windows-Microsoft.

Ao Cássio, pela companhia, incentivo, ajuda, compreensão, crescimento e amor.

Aos meus pais, Sergio e Marlene, por se fazerem sempre perto, mesmo estando longe, pelo amor e apoio incondicional e pelos sacrifícios (que foram muitos) feitos por mim para que eu chegasse até aqui, a minha irmã, Antonela, por fazer parte de minha vida e deixá-la muito mais alegre.

A Deus por colocar pessoas tão especiais e iluminadas em minha vida e por nunca me deixar só.

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos.....	v
Listas	ix
Resumo	xi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Descoberta do HIV	2
1.2 A Partícula Viral	3
1.3 Ciclo Replicativo	3
1.4 Protease-P10.....	5
1.5 Transcriptase Reversa – P51/P66.....	6
1.6 Gp120 Do Enevelope Viral	6
1.7 Diversidade Genética	8
1.8 Recombinação.....	9
1.9 Resistência Genotípica	10
2 OBJETIVOS.....	13
3 MÉTODOS	14
3.1 População estudada.....	14
3.2 Identificação dos casos de infecção recente	15
3.3 Cálculos e interpretação	17
3.4 Grupo de amostras provenientes de pacientes com infecção estabelecida (IE).....	17
3.5 Extração do ácido nucléico do HIV-1.....	18
3.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	19
3.6.1 Região de gene <i>pol</i>	19
3.6.2 Região V3 da gp120 do <i>env</i>	21
3.7 Detecção dos produtos amplificados	23
3.8 Purificação dos produtos das PCRs	23
3.9 Reação de seqüenciamento	24
3.10 Detecção dos fragmentos seqüenciados.....	25
3.11 Análise do seqüenciamento.....	25

3.12	Análise filogenética.....	25
3.13	Análise da diversidade genética	25
3.14	Análise da resistência genotípica aos anti-retrovirais	26
3.15	Análise estatística.....	27
4	RESULTADOS	28
4.1	Amostras de indivíduos com infecção recente pelo HIV-1 – grupo IR	28
4.2	Confirmação do resultado Infecção Recente.....	28
4.3	Amostras de indivíduos com infecção estabelecida pelo HIV-1 – grupo IE	28
4.4	Amplificação das amostras.....	29
4.5	Subtipagem das amostras através da análise do sequenciamento genômico das regiões PRO, TR e V3	29
4.6	Análise da diversidade genética do gene <i>pol</i>	36
4.7	Análise da resistência genotípica aos anti-retrovirais	40
4.8	Diversidade genética da região V3.....	42
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	50
7	ANEXOS.....	52
8	REFERÊNCIAS	57
	Abstract	

Lista de Figuras

Figura 01: Fuxograma das etapas percorridas pelos indivíduos com infecção recente até a entrada neste estudo.	15
Figura 02: Níveis de resistência inferidos pelo programa HIVdb através da somatória de valores associados a cada mutação de resistência.	26
Figura 03: Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região da protease do gene <i>pol</i> inferida por Neighbor-Joining	33
Figura 04: Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região da transcriptase reversa do gene <i>pol</i> inferida por Neighbor-Joining.....	34
Figura 05: Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região V3 da gp120 do gene <i>env</i> inferida por Neighbor-Joining	35
Figura 06: Alinhamento de aminoácidos da região da protease do gene <i>pol</i>	37
Figura 07: Alinhamento de aminoácidos da região da transcriptase reversa do gene <i>pol</i>	39
Figura 08: Distribuição da resistência genotípica dos grupos com Infecção Recente e Infecção Estabelecida	41
Figura 09: Mutações encontradas no <i>pol</i> que ocasionam algum grau de resistência	41
Figura 10: Alinhamento de aminoácidos da região V3 da gp 120	43

Lista de Tabelas

Tabela 01: Relação das amostras dos indivíduos que constituem o Grupo de Infecção Recente com os dados sobre gênero, com contagem da Carga Viral plasmática em log, contagem das células TCD4 ⁺ por mm ³ e subtipos detectados nas regiões amplificadas. NA refere-se a fragmentos não amplificados pela PCR.	30
Tabela 02: Relação das amostras dos indivíduos que constituem o Grupo de Infecção Estabelecida com os dados sobre gênero, com contagem da Carga Viral plasmática em log, contagem das células TCD4 ⁺ por mm ³ , e subtipos detectados nas regiões amplificadas. NA refere-se a fragmentos não amplificados pela PCR.	31
Tabela 03: Padrões de subtipos encontrados nas seqüências da PRO, TR e V3 nas amostras dos indivíduos dos grupos IR e IE.....	32

Resumo

A identificação dos indivíduos com infecção recente (período de infecção < 6 meses) foi possível devido ao desenvolvimento da estratégia de dupla testagem sorológica – STARHS, que se utiliza da combinação de um ensaio imunoenzimático padrão de alta sensibilidade e um ensaio imunoenzimático menos sensível. A esta estratégia foram submetidas as 810 amostras de sangue dos indivíduos atendidos em quatro Centros de Testagem e Aconselhamento CTAs o município de São Paulo no período entre junho de 2002 a março de 2003. Destas amostras, 27 foram identificadas como infecção recente e formaram o grupo denominado infecção recente (IR). Para formar o grupo com infecção estabelecida (IE) (infecção > 6 meses) foram escolhidas aleatoriamente 28 amostras de indivíduos acompanhados pelo ambulatório do Centro de Controle de Doenças Infecciosas (CCDI) do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPA) da UNIFESP. Todos os indivíduos de ambos os grupos eram virgens de tratamento anti-retroviral. Todas as amostras (IR – n=26 e IE – n=28) foram submetidas a seqüenciamento genômico onde foram analisados os genes *pol* (regiões da protease ou PRO e da transcriptase reversa ou TR) e *env* (região V3 da gp120 ou V3). Através da análise filogenética das seqüências geradas, observamos que tanto no grupo com IR quanto no grupo com IE, o subtipo B foi o mais freqüente nas três regiões genômicas estudadas, seguido pelo subtipo F e por uma minoria de C. Nas amostras pertencentes ao subtipo B na região V3 da gp120, nos dois grupos, a seqüência mais prevalente na coroa da alça foi a GPGR (IR – 27,3%; IE – 36,9%), seguida da seqüência GWGR (IR – 27,3%; IE – 31,3%), característica da variante do subtipo B brasileira. Em relação aos inibidores da protease, detectamos no grupo com IR 8,3 % de resistência e no grupo IE 3,8%. Também detectamos altas taxas de resistência aos ITR. No grupo com IR, detectamos 20,8% de resistência, com amostras resistentes as duas classes de ITR (inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos - ITRN e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos ITRNN) e no grupo com IE encontramos 7,7% de resistência, porém, somente à classe dos ITRN. Estes achados demonstram índices elevados de resistência primária aos anti-retrovirais nesta população, o que confirma a transmissão de HIV-1 com mutações de resistência. Considerando-se a persistência das mutações de resistência primária por longos períodos como demonstrado estudos recentes, a transmissão de vírus resistentes têm importantes implicações clínicas e de saúde pública, já que a transmissão de vírus

resistentes potencialmente limitaria o desempenho do tratamento anti-retroviral inicial. Além disto, uma elevada diversidade genética com diversos subtipos de HIV-1 ou cepas antigenicamente distintas co-circulando em indivíduos com infecção recente poderia limitar o desempenho de futuros “candidatos vacinais”.

1 - INTRODUÇÃO

Desde a primeira evidência clínica da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, (*aids [acquired immune deficiency syndrome]*) em 1983, mais de 60 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV por todo o mundo (UNAIDS/WHO, 2004). Hoje existem aproximadamente 39,4 milhões de pessoas infectadas no mundo, considerando adultos e crianças. No Brasil são 610 mil portadores do HIV (UNAIDS/WHO, 2004). No município de São Paulo, desde o início da epidemia até setembro de 2004, foram notificados 58540 casos de HIV/*aids*, entre adultos e crianças, o que corresponde a aproximadamente 20% do total de casos do Brasil. As principais categorias de exposição são a relação sexual heterossexual, a relação homossexual e o uso de drogas injetáveis (UDI), entre os homens, e a relação heterossexual e UDI entre as mulheres (Boletim Epidemiológico de *aids* do município de São Paulo, 2004).

A eficácia do tratamento anti-retroviral (ARV) corresponde a uma queda drástica na replicação do vírus em vivo, o que contribui para a queda da morbidade e mortalidade. Entretanto, o sucesso da terapia anti-retroviral torna-se ameaçado pela emergência de vírus resistentes aos ARV, fato que pode em parte ser explicado pela grande variabilidade genética do HIV-1 (Perelson, et al., 1996; Ho, et al., 1995). Fatores associados com desenvolvimento de resistência incluem o uso seqüencial de ARVs e a aderência irregular ao tratamento. A transmissão de vírus resistentes para indivíduo virgem de tratamento já foi bem documentada (Hecht et al. 1998; Cohen and Fauci, 1998). Caso este fenômeno se reproduza em maior escala, caracterizará um grande problema de saúde pública, visto que o indivíduo recém-infectado por vírus resistentes não alcança grande benefício com o uso dos ARV disponíveis, e representa, em curto prazo, maiores gastos com tratamento. Estudos sobre resistência genotípica aos ARV em amostras de indivíduos recém-infectados pelo HIV-1 são os mais adequados para este fim. Este tipo de informação é de grande valia para os programas de prevenção e saúde pública. A identificação dos indivíduos com infecção recente (período de infecção inferior a seis meses) foi possível devido ao desenvolvimento da estratégia de dupla testagem sorológica que se utiliza da combinação de um ensaio imunoenzimático padrão de alta sensibilidade e um ensaio imunoenzimático menos sensível (Janssen et al., 1998; Mcfarland et al., 1999; Rawal et al., 2000; Machado et al., 2002).

No município de São Paulo, os Centros de Testagem e Anconselhamento (CTA) oferecem a população exames sorológicos para a identificação da infecção ao HIV-1 gratuita e anonimamente. Indivíduos que procuram os CTAs formam uma casuística interessante, dada a alta probabilidade de se identificar infecções recentes, pois se supõe que grande parte dessa procura provenha de um possível contato com o vírus através de comportamentos de risco variados.

1.1 A DESCOBERTA DO HIV

A aids surgia no início da década de 80 em várias regiões do mundo como caracterizada por anormalidades imunológicas, como queda significativa no número de linfócitos (células $CD4^+$), acompanhada de infecções oportunistas, síndromes neurológicas e tumores, porém ainda não era conhecido o agente causador desta síndrome. A primeira indicação de que a aids era causada por um retrovírus veio em 1983, quando Barré-Sinoussi e colaboradores, reconheceram a atividade da enzima transcriptase reversa característica dos retrovírus em amostras estudadas (Barré-Sinoussi et al., 1983). Em 1986 foi proposto que os retrovírus associados à aids fossem denominados de HIV (*Human Immunodeficiency Viruses*) devido a similaridades estruturais e biológicas existentes entre os membros do grupo. São conhecidos atualmente dois tipos de HIV, HIV-1 e HIV-2, ambos pertencentes à família *Retroviridae*. Ambos causam a aids, porém indivíduos infectados pelo HIV-2 apresentam maior período de latência clínica e baixa morbidade enquanto que indivíduos infectados pelo HIV-1 podem progredir rapidamente para aids ou também podem permanecer assintomáticos por muitos anos (Rutherford et al., 1990; Lifson et al., 1991; Levy et al., 1993; Buchbinder et al., 1994). Estudos epidemiológicos nos anos de 1981 e 1982 identificaram o contato sexual e exposição ao sangue contaminado como as principais vias de transmissão da aids (Jafée et al., 1983). A síndrome foi descrita inicialmente em usuários de drogas injetáveis e em homens homossexuais e bissexuais (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981; Mildvan et al., 1982; Siegal et al., 1995), mas a transmissão do vírus também pela atividade heterossexual foi reconhecida logo após (Harry et al., 1983). O comportamento de risco sexual no início da epidemia causou o rápido aumento da transmissão do HIV ocasionado uma pandemia (Mccusker et al., 1988). Com a detecção da existência da transmissão materno-fetal (Ammann et al., 1983; Oleske et al., 1983) conseguiu-se identificar as

três principais vias de transmissão do HIV: sangue, contato sexual e transmissão vertical.

1.2 A PARTÍCULA VIRAL

A partícula viral possui formato esférico de 110nm de diâmetro e consiste de uma membrana fosfolipídica (envelope) que circunda o nucleocapsídeo. O envelope é derivado da membrana das células hospedeiras, onde encontram-se na superfície externa as glicoproteínas virais gp120 e inseridas na membrana a gp41 (McCune et al., 1988), além das proteínas de membrana das células hospedeiras, de antígeno de histocompatibilidade, de actina e de ubiquitina (Arthur et al., 1992). A gp120 contém os sítios de ligação aos receptores celulares e o principal domínio antigênico (a alça da região V3), enquanto a gp41 é a responsável pela entrada do vírus na célula, através de mudanças conformacionais que permitem a fusão das membranas. A porção interna do envelope é circundada pela matriz protéica formada por aproximadamente 2000 cópias da proteína p17 (Turner and Summers, 1999), e que envolve o capsídeo formado por 2000 cópias da proteína p24, que, por sua vez, possui em seu interior duas moléculas idênticas de RNA com polaridade positiva, proteínas nucleares (p7/9), as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase e também as proteínas Vif, Nef e Vpr. O RNA viral de aproximadamente 9,8 Kb possui várias fases de leitura (ORF) codificando genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), genes regulatórios (*tat*, *rev* e *nef*) e genes acessórios (*vpr*, *vpu* e *vif*) O transcrito primário do HIV-1 é um mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) único, representando todo o genoma viral, que será processado pelo mecanismo de corte e junção (*splicing*) durante a fase inicial do ciclo replicativo.

1.3 CICLO REPLICATIVO

Na fase inicial do ciclo replicativo ocorre o reconhecimento do sítio de ligação do receptor CD4 das células alvo (linfócitos, macrófagos, células da micróglia e células de Langerhans) pela gp120 do envelope viral. Estas interações são suficientes para a ligação, mas não para a infecção. Entretanto, a ligação entre o vírus e o CD4 induz

mudanças conformacionais na gp120 que contribuem para a exposição de seu domínio de ligação presente na região V3 aos correceptores celulares (CCR5 e CXCR4). Esta ligação induz novas mudanças conformacionais na gp120, que permitem a exposição do peptídeo de fusão presente na região N-terminal da gp41 para a membrana da célula alvo.

Após a fusão do envelope viral com membrana da célula hospedeira, o capsídeo penetra no citoplasma celular, onde ocorre a síntese da molécula de cDNA pela ação da transcriptase reversa. A proteína Vif parece ser importante para um ou mais destes eventos iniciais talvez por facilitar o estágio inicial da transcrição. Uma vez sintetizado, o DNA viral é transportado para o núcleo como parte de um complexo de pré-integração formado pelas proteínas integrase, transcriptase, p17, p24 e Vpr bem como proteínas celulares da célula hospedeira (Miller et al., 1997). A localização nuclear deste complexo é direcionada pela proteína Vpr, que não contém um sinal de localização nuclear, mas parece conectar o complexo de pré-integração ao maquinário de importação do núcleo (Fouchier et al., 1998; Popov et al., 1998; Vodicka et. al, 1998). Depois do transporte para o núcleo o DNA viral é covalentemente integrado ao genoma hospedeiro pela ação catalítica da integrase, que reconhece os Terminais Longos de Repetição (LTR) presente nas extremidades 3' e 5' da recém sintetizada dupla fita de DNA viral e cliva 2, as vezes 3, bases da extremidade 3'. A extremidade 3' do DNA viral é então ligado ao DNA celular, preferencialmente em sítios altamente conservados. A incorporação ao DNA celular termina com as falhas sendo preenchidas pela síntese de DNA.

A etapa seguinte envolve o transporte de mRNA processados (que sofreram *splicing*) e também de mRNA não processados para fora do núcleo onde serão traduzidos. Inicialmente são sintetizados pequenos mRNAs processados que codificam as proteínas Tat, Rev e Nef. Tat é um ativador transcricional essencial que se liga ao transcrito nascente de RNA e recruta proteínas celulares a fim de aumentar a transcrição deste mRNA. Os mRNAs não processados que contém íntrons funcionais precisam estar no citoplasma para a síntese de Gag e Gag-Pol e empacotamento, este transporte é feito pela Rev que se liga no mRNA a ser transportado formando um complexo que com o auxílio de proteínas e fatores celulares é transportado pelo poro nuclear. Neste sentido, Rev é quem determina a mudança de fase inicial onde ocorre a alta síntese de mRNA processados (codificando as proteínas Tat, Rev e Nef) e a fase tardia onde são sintetizados os mRNAs não processados (codificando as proteínas

Gag e Gag-Pol) e um mRNA *single spliced* (codificando as proteínas Env, Vpu, Vif e Vpr).

A proteína precursora do envelope, gp160, é encaminhada ao retículo endoplasmático (RE) da célula hospedeira, onde será processada em gp120 e gp41 pelas enzimas celulares e transportada para a superfície celular. As moléculas de Env e CD4 são ambas sintetizadas no RE e ligação prematura de CD4 e ENV poderia inibir o transporte para a membrana (Hoxie et al., 1986), porém a proteína Vpu leva a degradação as moléculas de CD4 impedindo a ligação (Margottin et al, 1998; Schubert et al, 1998). Da mesma forma moléculas CD4 na superfície da célula são degradadas pela ligação com a proteína Nef.

As proteínas Gag e Gag-Pol sintetizadas nos ribossomos são então ligadas na membrana plasmática através do domínio da matriz (p17) (Bennett et al., 1993; Freed et al., 1996) e interagem com a parte citoplasmática da gp41 (Wang et al., 1993; Free and Martin 1996). Aproximadamente de 1200 a 2000 cópias de Gag formam a partícula viral imatura, com duas cópias do RNA viral sem serem processadas que são liberadas da célula hospedeira por brotamento. Após a liberação as poliproteínas são clivadas pela protease para produzir as enzimas (transcriptase reversa e integrase) bem como as proteínas de matriz (p17), capsídeo (p24) e proteínas nucleares (p7 e p9).

1.4 PROTEASE-p10

A protease é produzida através de uma clivagem autocatalítica da proteína gag/pol 160 que ocorre em *cis* (intramolecular) ou em *trans* (intermolecular) durante o processo de morfogênese do vírion (Debouck et al., 1987; Krausslich et al., 1988). Mutações sítio específicas demonstraram que a protease é uma enzima importante para a replicação já que partículas não infectantes contendo gag/pol não clivada, são produzidas quando esta enzima é inativada por uma mutação (Kohl et al., 1988; Loeb et al., 1989; Manchester et al., 1994). Possui 99 aa de comprimento com peso molecular 10K (Katz and Slalka, 1994). Através de análises sobre cristalografia, mutações sítio específicas e especificidade de substrato, ficou comprovado que sua forma funcional é um homodímero. Cada monômero é formado pela duplicação de quatro elementos estruturais: um grampo (que contém a primeira alça), uma grande alça, a qual contém o sítio catalítico, uma α hélice e um segundo grampo (*flaps*), que se move para permitir a entrada e saída de substrato ou inibidor, de até 7 aa de

comprimento (Wlodawer and Erickson, 1993). A protease é uma enzima relativamente conservada, principalmente em locais importantes para a manutenção de sua estrutura e função.

1.5 TRANSCRIPTASE REVERSA – p51/p66

A transcriptase reversa é produzida através de duas clivagens da proteína gag/pol pela protease. A primeira clivagem da origem a uma seqüência de peptídeos de 66 kDa (p66) que forma um homodímero, que então é novamente clivado perto da carboxila terminal dando origem agora a um heterodímero formado pela p66 e p51. As duas subunidades possuem a mesma seqüência de peptídeos, embora sua estrutura e função sejam diferentes. A subunidade p66 possui tanto atividade de polimerase como RNase H, enquanto a subunidade p55 possuem apenas atividade de polimerase. Essas duas subunidades se interagem assimetricamente para formar uma única polymerase cleft que se liga a um primer-template, a um dNTP, a um inibidor não competitivo e a um tRNA. As duas subunidades possuem os mesmos subdomínios, porém são orientados de forma diferente, o que resulta em uma p51 mais compacta, incapaz de se ligar isoladamente ao ácido nucleico, e uma p66 mais estendida. Os três subdomínios que formam a o sítio ativo da polimerase são chamados de “dedos”, “polegar” e “palma” por analogia desta estrutura à mão direita. O quarto subdomínio é chamado de “conecção” pois se situa entre o sítio da polimerase e o sítio ativo da RNase H na p66. Como os subdomínios de conexão são orientados identicamente, o diferente arranjo das interações são feitos pelos “dedos”, “polegar” e “palma” cada uma das duas subunidades (Kohlstaedt et al., 1992; Jacobo-Molina et al., 1993).

1.6 gp120 DO ENEVELOPE VIRAL

A gp120 é uma proteína hidrofílica encontrada na superfície externa da membrana plasmática de células infectadas altamente glicosilada, possui 24 sítios de glicosilação ligados ao N, sendo 13 conservados em vários isolados virais e 17 modificados por cadeias laterais de carboidratos, que irão influenciar na função e nas propriedades imunológicas da proteína madura (Doms et al., 1993). Possui 18 resíduos de cisteína altamente conservados que formam nove pontes de dissulfeto definindo várias regiões funcionais e influenciando na estrutura da proteína. Formada por cinco

rápida/ alta (para cinética e replicação) e trópica por células T ou NIS lenta/ baixa e trópica por macrófagos, sendo estes os “comportamentos” mais freqüentes das cepas virais. Atualmente com a descoberta da utilização dos receptores de quimiocinas como co-receptores de fusão e entrada do vírus na célula (D´Souza and Harden, 1996), passou-se a descrever o fenótipo viral de acordo com o co-receptor utilizado (Berger et al., 1998). Desse modo, cepas que se utilizam do co-receptor de quimiocina α CXCR4 quando infectam linfócitos T CD4, são classificadas como X4 e cepas que se utilizam do co-receptor de quimiocina β CCR5 quando infectam macrófagos são classificadas R5. Cepas X4 são conhecidas por serem T trópicas, rápida/ alta, indutoras de sincício ou MT-2 trópicas, enquanto cepas R5 são M trópicas, lenta/ baixa, não indutoras de sincício ou não MT-2 trópicas. Estas características biológicas *in vitro* são encontradas entre todos os subtipos do HIV-1.

1.7 DIVERSIDADE GENÉTICA

Uma das maiores características do HIV é a sua alta variabilidade genética. Esta extensa heterogeneidade é resultado de um pobre mecanismo de correção 3´- 5´ da transcriptase reversa (atividade de exonuclease), o que leva a uma taxa de incorporação de erros de $1,7 \times 10^4$ por base incorporada por ciclo de replicação com uma taxa de fixação de erro de aproximadamente $3,4 \times 10^5$, somado ao fato da existência de um rápido *turnover* com média de aproximadamente 10^9 vírions por dia em indivíduos não tratados (Birk et al., 1998), todas as possíveis mutações pontuais irão ocorrer em 10^5 vezes por dia. Além das mutações, ocorrem hipermutação, recombinação e deleção/inserção (Coffin, 1992), que levam ao aparecimento de cepas diferentes, porém relacionadas, já que evoluíram de um progene comum. Este grupo de cepas virais distintas relacionadas é denominado quase-espécie e sua principal vantagem esta relacionada ao fato de sofrerem rápida mudança e adaptação sob novas pressões seletivas (que pode ser exercida pelo sistema imune ou através drogas anti-retrovirais) o que contribui para uma rápida evolução.

Análises filogenéticas e caracterização genética de isolados de HIV-1 de diferentes localidades geográficas revelou que o HIV-1 pode ser dividido em 3 grupos distintos designados de M (*Major*), O (*Outlier*) e N (*New* ou *non M, non O*). O grupo M compreende a maioria das cepas de HIV-1 que são responsáveis pela pandemia de

aids e pode ser subdivido em 9 subtipos diferentes (A - D, F - H, J e K) (Carr et al., 1998; Triques et al., 2000). Os subtipos estão distribuídos de forma distinta em diversas áreas do mundo, provavelmente refletindo o subtipo que iniciou a infecção nestas regiões. Eventos de recombinação entre seqüências de diferentes subtipos do grupo M são freqüentemente identificados e são denominadas de formas recombinantes circulantes (do inglês *Circulating Recombinant Forms*, ou CRFs). Atualmente 14 CRFs já foram identificadas e estão distribuídas em várias regiões do mundo (Peeters and Sharp, 2000). O grupo O parece ser endêmico em Camarões, Gabão e países vizinhos no centro-oeste africano, sendo representado por uma minoria de cepas (Peeters et al., 1997). O grupo N foi recentemente identificado e é representado por um número limitado de isolados em pacientes de Camarões (Simom et al., 1998; Ayoub et al., 2000).

A epidemia brasileira é caracterizada pela presença de vários subtipos de HIV-1 do grupo M, sendo o subtipo B o mais prevalente, seguido pelo subtipo F e C, embora o número de infecções não B (subtipos F, C) e também de recombinantes B/F tenha aumentado (Morgado et al., 1994; Sabino et al., 1996).

1.8 RECOMBINAÇÃO

Além da alta diversidade genética do HIV, outra característica também relacionada a transcriptase reversa é a recombinação (Hu and Temin , 1990) entre genomas diferentes, o que pode produzir novas cepas de vírus com propriedades e patogenicidade diferentes, sua freqüência esta estimada em 2 a 3 eventos por genoma proviral gerado em cada ciclo replicativo (Jetzt et al., 2000). Para que este evento ocorra, há a necessidade da infecção simultânea de uma célula por dois vírus pertencentes a subtipos diferentes, seguido, durante o processo da transcrição reversa, de um "salto" da transcriptase reversa de uma das fitas de RNA (fita doadora) para a outra fita de RNA (fita receptora). Este salto pode ser devido a uma descontinuidade na fita de RNA doadora ou a presença de obstáculo na fita também na fita doadora, como por exemplo, a presença de estruturas secundárias. Este evento pode levar a produção de três tipos de descendência, dois tipos poderão ser homocigóticos, tendo as duas cadeias de RNA provenientes dos vírus parentais e um terceiro tipo de vírus heterocigótico, tendo as duas cadeias diferentes de RNA, uma proveniente de cada vírus parental. A infecção de uma nova célula por este vírus heterocigoto gera um

mosaico entre duas cadeias diferentes de RNA, a transcriptase reversa salta de uma cadeia de RNA para outra, produzindo um DNA completar formado por genes e fragmento de cada um dos RNAs parentais (Negroni and Buc, 2001; Jetzt et al., 2000; Robertson et al., 1995; Hu and Temin, 1990). A recombinação é mais óbvia entre membros de subtipos diferentes, porém também ocorre entre membros do mesmo subtipo, entretanto a identificação destes é um pouco mais difícil (Quinones-Mateu and Arts; 1999).

1.9 RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

Embora quase 20 anos tenham se passado desde o uso da primeira droga anti-retroviral (zidovudina), ainda não alcançamos a droga ideal a qual deveria combater a entrada do vírus e também eliminar a permanência destes nas células. O desenvolvimento desta droga torna-se muito difícil devido às características ligadas ao processo de replicação do HIV. Primeiro, a integração do provírus no genoma da célula permite que o HIV se comporte como um elemento próprio do genoma humano, sendo passado para a progênie celular onde pode entrar em latência ou ser expresso em níveis muito baixos; segundo, a existência de diferentes compartimentos e reservatórios celulares onde o vírus pode se alojar dificulta a disponibilização da droga, o que permite que a replicação continue acontecendo mesmo em níveis muito baixos; terceiro, a alta taxa de erros da transcriptase reversa, durante o processo de replicação, faz com que surjam novas variantes do genoma viral; quarto, a presença de duas moléculas de RNA permite a produção de vírus recombinantes. Desse modo, o desenvolvimento de uma droga ideal torna-se difícil, pois a geração de variantes que apresentem mutações que confirmam ao vírus resistência aos ARV é inevitável.

Atualmente, a maioria dos ARVs comercialmente disponíveis atuam em duas etapas do ciclo viral: transcrição reversa e maturação. A primeira classe de drogas desenvolvida tem como função inibir a enzima transcriptase reversa (inibidores da transcriptase reversa), a segunda classe inibi a enzima protease (inibidores da protease) Dentro dos inibidores da transcriptase reversa (ITR), temos os análogos nucleosídeos (ITRN) que funcionam como se fossem falsos nucleotídeos, sendo fosforilados por enzimas celulares tornando-se ativos e competidores com os nucleotídeos da célula em transcrição, porém ao serem incorporados na cadeia de DNA, não permitem a continuidade da transcrição, pois não possuem a hidroxila na

extremidade 3', necessária para a ligação com o grupo fosfato da extremidade 5' do outro nucleotídeo (Ahluwalia et al., 1987; Mitsuya et al., 1987); e também os não nucleosídeos (ITRNN), que são moléculas que entram no sítio ativo da transcriptase reversa mudando sua conformação e impedindo a elongação da cadeia de DNA (Kohlstaedt et al., 1992). Os inibidores da protease (IP) são moléculas que se ligam ao sítio ativo da protease impedindo a clivagem das poliproteínas, deixando desta forma, o vírus defeituoso (Roberts et al., 1990; Appelt et al., 1991; Reich et al., 1995). Os inibidores de fusão são peptídeos que se ligam à gp41 e impedem que ocorram mudanças conformacionais necessárias para a fusão das membranas celular e viral, e entrada do vírus na célula.

Em 1997, Hamer et al., provou a eficácia da terapia tripla na redução da mortalidade e indução da supressão viral dificultando a emergência de cepas mutantes. Entretanto a maioria dos pacientes não responde bem ao tratamento e muitos desenvolvem resistência às drogas usadas, sendo este um dos maiores obstáculos para a manutenção da supressão viral (Ledergerber et al., 1999; Ross et al., 2000; Vella et al., 2000). As mutações que acarretam a resistência aos ARVs ocorrem no gene *pol*; nas regiões da protease e transcriptase reversa, e conseqüentemente com mutações no gene *gag*, um dos sítios de clivagem pela protease (Chen et al., 1995; Lin et al., 1995; Jacobsen et al., 1996; Zhang et al., 1997). Estas mutações diminuem a capacidade de ligação das drogas ao sítio ativo da enzima, que leva a uma seleção de variantes resistentes que preexistiam em níveis baixos nas quase-espécies presentes em pacientes com terapia inadequada (Najera et al., 1995; Lech et al., 1996), o que permitiu o escape do vírus ao efeito da droga e mantendo parcialmente a replicação do mesmo, já que o *fitness* viral acaba por diminuir com o aparecimento destas mutações.

As mutações associadas à resistência podem ser classificadas como primárias (ou principais) ou secundárias (ou acessórias). As mutações principais, geralmente localizadas no sítio ativo da enzima, acarretam uma considerada queda de sensibilidade de uma ou mais drogas; mutações secundárias ou acessórias podem não resultar em uma significativa queda de sensibilidade, entretanto quando estas ocorrem no gene da protease podem acarretar na recuperação do *fitness* viral perdido em decorrência do aparecimento das mutações principais (Quiñones-Mateu et al., 2001, Hirsch et al., 1998). A resistência aos ARVs poder dividida em resistência primária, presente nos indivíduos que ainda não receberam tratamento anti-retroviral, ou seja, virgens de tratamento, que pode ter sido adquirida através da transmissão de cepas

resistentes ou ainda pela geração e fixação de mutantes resistentes decorrentes da alta taxa de replicação do HIV-1 e baixa fidelidade da transcriptase reversa; e em resistência secundária, presente nos indivíduos sob tratamento, onde mutantes resistentes são selecionados pela ação da droga.

O aumento no uso dos ARVs somado a baixa aderência ao tratamento pode levar a emergência de mutações que conferem resistência aos ARVs. Acredita-se que a presença destas mutações em indivíduos não tratados estaria relacionada a uma possível falência virológica depois de iniciado o tratamento anti-retroviral (Perno et al., 2002). Desta forma, a determinação da prevalência da resistência primária é de extrema importância para o monitoramento da epidemiologia molecular do HIV-1 e também na melhor escolha inicial da terapêutica numa dada região, já que a transmissão de vírus resistentes limita imediatamente as escolhas para a primeira linha de tratamento anti-retroviral (Deeks, 2001; Loveday, 2001, Miller, 2001; Soriano, 2001; Soriano et al., 2001).

2 - OBJETIVOS

- Descrever a prevalência e o padrão de resistência primária aos ARV (inibidores da transcriptase reversa e da protease) nos pacientes com infecção recente pelo HIV atendidos nos Centros de Testagem e Aconselhamento da cidade de São Paulo.

- Verificar a diversidade genética das regiões da protease, transcriptase reversa e V3 do HIV-1, em amostras de indivíduos recém infectados do município de São Paulo.

- Descrever o perfil de subtipos do HIV-1 nas diferentes regiões do genoma das amostras dos indivíduos pesquisados.

3 – MÉTODOS

3.1 População estudada

O presente estudo teve como alvo a população de indivíduos HIV-1 positivos da cidade de São Paulo. Indivíduos que procuraram os Centros de Testagem e Aconselhamento (CTA) da cidade de São Paulo, como os CTA Campos Elíseos, Henfil, Lapa e Pirituba, para verificar seu estado sorológico entre junho de 2002 a março de 2003 foram informados sobre esta pesquisa e convidados a participarem do estudo. Os pacientes que se dispuseram a participar foram informados em detalhes sobre o estudo, assinaram o Termo de Consentimento pós informação (anexo 01) e colheram amostras para os testes sorológicos. Após a realização do ensaio imunoenzimático – ELISA e o confirmatório por Western Blot e/ou imunofluorescência, as amostras HIV-1 positivas foram encaminhadas para o laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo para a realização do STARHS (Serologic Testing Algorithm for Recent HIV Seroconversion – Algoritmo de testagem sorológica para identificação de soroconvertedores recentes pelo HIV-1) (Centers for Disease Control and Preventions (CDC, 2001). Os pacientes que estavam dentro do período de infecção recente foram convidados ao recrutamento para seguimento, colhendo novas amostras de sangue total que foram encaminhadas para o laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, onde foram centrifugadas, separadas em plasma e células mononucleares de sangue periférico (buffy coat), aliquotadas estocadas em freezer – 80 °C). A figura abaixo ilustra melhor o fluxograma envolvendo as pessoas que fizeram parte do estudo.

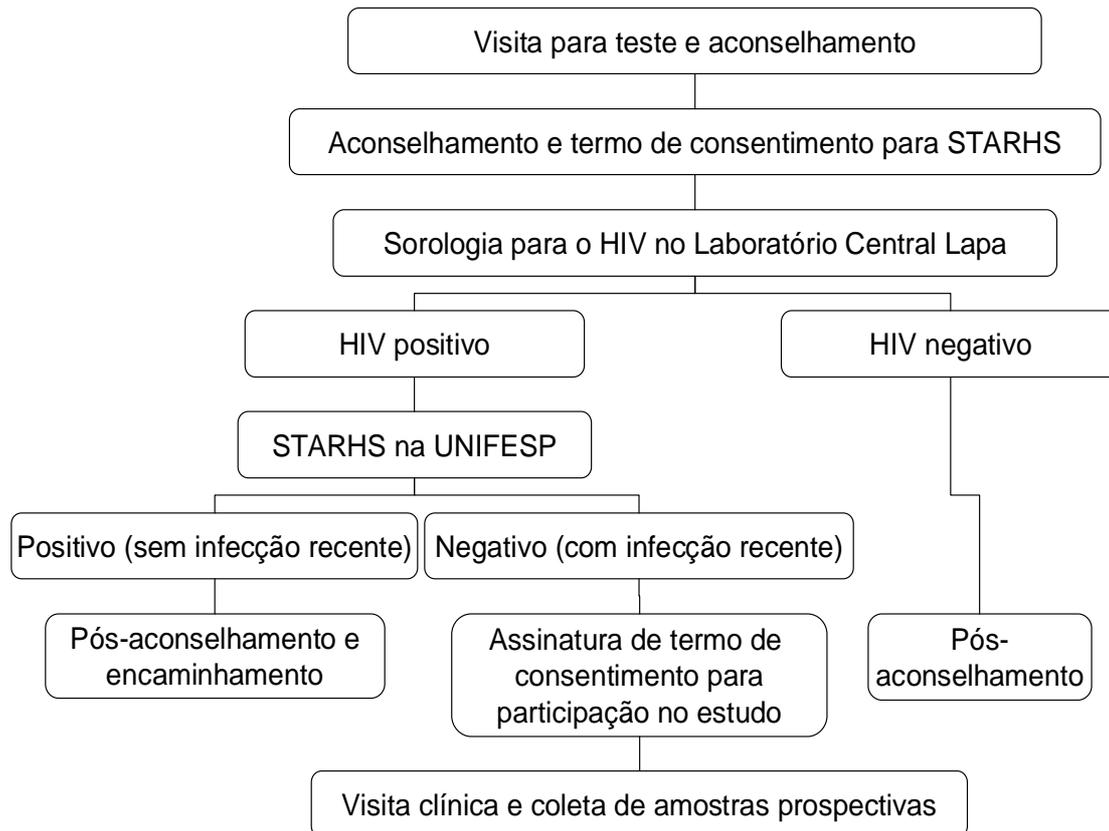


Figura 01 – Fluxograma das etapas percorridas pelos indivíduos com infecção recente até a entrada neste estudo.

3.2 Identificação dos casos de infecção recente

Foram encaminhadas ao nosso laboratório amostras de soro de 810 indivíduos, sendo 326 amostras do CTA de Campos Elíseos, 393 do Henfil, 66 de Pirituba e 25 da Lapa, identificadas como HIV-1 positivas para serem submetidas à estratégia sorológica dupla testagem – STARHS, que identifica amostras provenientes de pessoas com infecção recente. Este algoritmo utiliza um ensaio imunoenzimático modificado com sensibilidade reduzida. Neste trabalho utilizamos o kit Vironostika proveniente da bioMerriex, além dos calibradores e controles produzidos e fornecidos pelo CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA). Para obter um teste imunoenzimático menos sensível (Vironostika-LS), três elementos do procedimento normal do teste Vironostika foram modificados: a diluição da amostra, o tempo de incubação da amostra e o tempo de incubação do conjugado. Uma amostra reativa no teste imunoenzimático sensível e positiva no Western blot, mas não reativa no teste imunoenzimático menos sensível, caracteriza amostra proveniente de

indivíduo no período precoce da infecção, pois o nível de anticorpos já pode ser detectado pelos métodos mais sensíveis, porém ainda não se encontram no pico máximo de produção. O período entre a soroconversão do Vironostika e o Vironostika-LS foi estimado em 170 dias (IC95%: 162 - 183 dias), para o HIV-1 do subtipo B (Janssen et al., 1998; Rawal et al., 2000; CDC, 2001). Para interpretação e validação dos resultados, foi utilizado o *software* STARHS, também produzido e fornecido pelo CDC. Para a realização deste teste foi utilizado o seguinte protocolo:

As amostras foram primeiramente testadas no modo de triagem (*screening mode*), onde estas são testadas em uniplicata. Durante esta etapa as amostras que tiveram a SOD<2.000 foram selecionadas e submetidas ao modo confirmatório (*confirmatory mode*) onde as amostras foram testadas em triplicata, utilizando três diluições independentes para a mesma amostra.

Todas as amostras e reagentes estavam em temperatura ambiente (15-30°C) antes do início do ensaio e se mantiveram a temperatura ambiente até o fim do mesmo.

1. Foram pipetados 10 µl da amostra em 200 µl de diluente (diluição 1:20) e esta mistura homogenizada por aproximadamente 30 segundos.
2. Transferiu-se 10 µl da primeira diluição para 200µl de diluente (1:400) e esta mistura homogenizada por aproximadamente 30 segundos.
3. Foram transferidos 200 µl da última diluição de cada controle (calibrador, positivo, negativo) e amostras para a placa do ensaio.
4. A placa foi coberta com selante e incubada imediatamente a 37°C ± 2°C por 30 minutos.
5. Cada tira da placa foi lavada quatro vezes com solução de lavagem.
6. Pipetou-se 150µl em cada poço da solução reconstituída do EnzyAbody.
7. Foi repetido o passo 4.
8. Foi repetido o passo 5.
9. Após, foram pipetados 150µl do Substrato ABTS em cada poço, e a placa incubada no escuro a temperatura ambiente por 10 a 13 minutos.
10. Por fim foram pipetados 150 µl de ácido (*Stop solution*) em cada poço, afim de parar a reação.
11. A placa foi lida imediatamente em absorbância de 405nm.

3.3 Cálculos e interpretação

Cálculo da densidade óptica (DO) padrão (SOD - *standardized OD*)

$SOD = (\text{média da DO da amostra} - \text{média da DO do negativo}) / (\text{média da OD do CAL} - \text{média da OD do negativo})$

Modo triagem

Toda amostra testada em uniplicata com $SOD < 2.000$ foi selecionada para o teste confirmatório sendo uma possível infecção recente. Amostras com $SOD > 2.000$ não foram testadas pois provavelmente não eram infecção recente.

Modo confirmatório

Toda amostra testada em triplicata com:

SOD média < 1.000 , isto é, não reagente foi considerada uma provável soroconversão dentro de 6 meses. As amostras com SOD média ≥ 1.000 , reagentes não foram testadas neste modo, pois provavelmente a soroconversão ocorreu em um período maior que 6 meses.

As amostras provenientes de indivíduos com infecções recentes formaram o grupo denominado infecção recente.

3.4 Grupo de amostras provenientes de pacientes com infecção estabelecida

Foram escolhidas aleatoriamente amostras de indivíduos acompanhados pelo ambulatório do Centro de Controle de Doenças Infecciosas (CCDI) do Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIPA) da UNIFESP, que aceitaram participar do estudo, sendo eles virgens de tratamento e com infecção estabelecida confirmada pelo acompanhamento maior que 12 meses, para formar o grupo denominado infecção estabelecida. Estas amostras foram colhidas contemporaneamente às amostras de infecção recente e foram utilizadas para análise comparativa entre os grupos.

3.5 Extração do ácido nucléico do HIV-1

Das amostras de sangue foram extraídos o DNA proviral do HIV-1 utilizando-se

3.6 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

3.6.1 Região do gene *pol*

A PCR foi realizada em duas etapas (*nested*). A primeira etapa amplificou um fragmento do gene *pol* do HIV-1 de 1,2Kb (localizado na posição 2146-3337 do HXB2r) utilizando iniciadores (*primers*) descritos por Kozal et al., (1996) K1 – 3' CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA 5' – e K2 - 3' TTT CCC CAC TAA CTT CTG TAT GTC ATT GAC A.

As concentrações dos reagentes foram:

Tampão	MgCL ₂	dNTP	Primer K1	Primer K2	Taq DNA polimerase
1X	3,5 mM	0,4 mM	0,2 µM	0,2 µM	0,25 unidades

As condições de ciclagem foram:

	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
Tempo	10 minutos	1 minuto	1 minuto	2 minutos	10 minutos
Temperatura	94 ° C	94 ° C	55 ° C	74 ° C	74 ° C

Após o término desta fase, 5µL desta solução foi transferido para um outro tubo onde se amplificou o fragmento da região da protease, contendo aproximadamente 350 pb (localizado na posição 2198-2598 do HXB2r), utilizando os iniciadores descritos por Pianiazek et al. (1991) DP10 – 3' TAA CTC CCT CTC AGA AGC AGG AGC CG 5' e DP11 - 3' CCA TTC CTG GCT TTA ATT TTA CTG GTA 5'.

As concentrações dos reagentes foram:

Tampão	MgCL ₂	dNTP	Primer DP10	Primer DP11	Taq DNA polimerase
1X	2,0 mM	0,4 mM	0,2 µM	0,2 µM	0,25 unidades

As condições de ciclagem foram:

	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
Tempo	10 minutos	45 segundos	45 segundos	1 minuto	7 minutos
Temperatura	94 ° C	94 ° C	55 ° C	74 ° C	74 ° C

Para amplificar a região da transcriptase reversa, 5µl da mesma solução da primeira etapa foram transferidos para um outro tubo, onde se amplificou um fragmento de aproximadamente 700pb (localizado na posição 2518-3320 do HXB2r), Os iniciadores utilizados nesta PCR foram aqueles descritos por Frenkel et al. (1995) F1 - 3' GTT GAC TCA GAT TGG TTG CAC 5' e F2 - 3' GTA TGT CAT TGA CAG TCC AGC 5' .

As concentrações dos reagentes foram:

Tampão	MgCL₂	dNTP	Primer F1	Primer F2	Taq DNA polimerase
1X	2,0 mM	0,4 mM	0,3 µM	0,3 µM	0,25 unidades

As condições de ciclagem foram:

	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
Tempo	10 minutos	45 segundos	45 segundos	1 minuto	7 minutos
Temperatura	94 ° C	94 ° C	55 ° C	74 ° C	74 ° C

Nas amostras onde não foi possível a amplificação de uma ou outra região do gene *pol*, foi realizada uma PCR alternativa também realizada em duas etapas. A primeira etapa amplificou um fragmento do gene *pol* do HIV-1 de 1,7Kb (localizado na posição 1839-3558 do HXB2r) utilizando iniciadores (*primers*) descritos por Sá-Filho et al. (2004) Pol1 - 3' GGG AGT GGG GGG ACC CGG CCA TAA 5' - e Pol2 - 3' CAT TGG CCT TGC CCC TGC TTC TGT.

As concentrações dos reagentes foram:

Tampão	MgCL₂	dNTP	Primer F1	Primer F2	Taq DNA polimerase
1X	2,0 mM	0,4 mM	0,3 μM	0,3 μM	0,25 unidades

As condições de ciclagem foram:

	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
Tempo	10 minutos	45 segundos	45 segundos	2 minutos	10 minutos
Temperatura	94 ° C	94 ° C	55 ° C	72 ° C	72 ° C

Após o término desta fase, 5μL desta solução foram transferidos para um outro tubo onde se amplificou um fragmento contendo a região da protease e transcriptase reversa, contendo aproximadamente 1,5Kb (localizado na posição 2006-3490 do HXB2r), utilizando os iniciadores descritos por Sá-Filho et al., (2004) Pol3 – 3' GGG CCC CTA GGA AAA AGG GCT GTT 5' e Pol4 - 3' ACC GGT TCT TTT AGA ATC TCC CTG5'. Esta solução possuía a mesma composição da anterior com apenas a substituição dos “primers” exteriores pelos interiores Pol3 e Pol4, e foi submetida às mesmas condições físicas anteriormente descritas.

Nas amostras que mantiveram as PCRs negativas mesmo após esta PCR alternativa, foi realizada uma outra PCR, onde 5μL da mesma solução primária foram transferidos para um outro tubo onde se amplificou um fragmento do gene *pol* do HIV-1 de 1,2Kb (localizado na posição 2146-3337 do HXB2r) utilizando iniciadores descritos por Kozal et al., (1996), conforme descrito anteriormente.

3.6.2 Região V3 da gp120 do env

Para amplificar a região V3 da gp120, também foi feita uma PCR em duas etapas. A primeira etapa amplificou um fragmento da região V1 a V5 da gp120 do gene *env* do HIV-1 de cerca de 1,2Kb (localizado na posição 6556-7822 do HXB2r) usando iniciadores descritos por Delwart et al. (1993) ED5 - 5'ATG GGA TCA AAG CCT AAA GAA ATG TG 3' e ED12 - 5'AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CCC AAG 3' .

Após o término desta fase, 5 μ L desta solução foram transferidos para um outro tubo onde se amplificou um décimo do produto da primeira etapa de PCR, onde se amplificou um fragmento de cerca de 350pb (localizado na posição 6952-7391 do HXB2r) que contém a região C2V3C3, utilizando os iniciadores descritos por Wolfs et al. (1991) V3 outer5'-5' ATA AGC TTC AAT GTA CAC ATG GAA TT 3' e V3 outer3'-5'ATG AAT TCA TTA CAG TAG AAA AAT TCC C 3'. As condições em que foram realizadas as duas etapas foram iguais com apenas a substituição dos "primers".

As concentrações dos reagentes para as duas PCRs foram:

Tampão	MgCL₂	dNTP	Primer ED5	Primer ED12	Taq DNA polimerase
1X	2,0 mM	0,4 mM	0,2 μ M	0,2 μ M	0,25 unidades

As condições de ciclagem para as duas PCRs foram:

	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
Tempo	10 minutos	45 segundos	45 segundos	1 minuto	7 minutos
Temperatura	94 ° C	94 ° C	55 ° C	72 ° C	72 ° C

Nas amostras onde não foi possível a amplificação da região V3 da gp120, foi realizada uma PCR alternativa também realizada em duas etapas nas mesmas condições que as PCRs descritas anteriormente, substituindo apenas os "primers". A primeira etapa amplificou um fragmento de aproximadamente 800pb (localizado na posição 6957-7814 do HXB2r), utilizando os iniciadores descritos por Simmonds et al. (1990) LBouter5'- 5'TAC AAT GTA CAC ATG GAA TT3'e Lbouter3'- 5' CCATAGTGCTTCCTGCTGCT 3'. Após o término desta fase, 5 μ L desta solução foram transferidos para um outro tubo onde se amplificou um fragmento de cerca 600pb, (localizado na posição 7009-7665 do HXB2r), utilizando os iniciadores descritos por Simmonds et al. (1990) LBiner5'- 5' TGG CAG TCT AGC AGA AGA AG 3'e LBiner3'- 5' CTT CTC CAA TTG TCC CTC ATA 3'.

3.7 Detecção dos produtos amplificados

Após a PCR, as amostras de DNA amplificados foram separadas em gel de agarose 1,5 % peso/volume em Tris-borato/ EDTA (TBE) 0,5 X (0,89M Tris; 0,89 M ácido bórico e 0,02 M EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml). As corridas eletroforéticas foram efetuadas a 100 Volts (V), no tempo médio de 40 minutos, em tampão de TBE 0,5 X. O marcador padrão utilizado para a comparação de

9. Foi incubado durante 1 minuto em temperatura ambiente.
10. Após foi centrifugado por 2 minutos a 12000 rpm.
11. Foram descartados a coluna e o tubo; o produto purificado acondicionado à – 20° C

3.9 Reação de seqüenciamento

As amostras purificadas foram seqüenciadas utilizando-se o *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit - RPN 2436 (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Buckinghamshire, England)* com os iniciadores DP16 - 5' CCT CAA ATC ACT CTT TGG CAA C 3' (para seqüenciar a região da protease - Pianazek *et al.*, 1991), F3 - 5' TAT CAG GAT GGA GTT CAT AAC 3' e F4 - 5' GGA TGG CCC AAA AGT TAA AC 3' (para o seqüenciamento da transcriptase reversa - Frenkel *et al.*, 1995), e V3inner5' - 5' ATA AGC TTG CAG TCT AGC AGA AGA AGA 3' (para o seqüenciamento da região V3 - Wolfs *et al.*, 1991) marcados com CY5.5. O protocolo utilizado foi:

1. Foi adicionado em um tubo de 0,2 µl previamente marcado com o numero da amostra, 2,5 µl do tampão de seqüenciamento.
2. No mesmo, foi adicionado 5,0 µl dos iniciadores a 1,5 pmol/µl, que estavam de acordo com a região a ser seqüenciada.
3. Foram adicionados 4,0 µl da enzima diluída em 1:10.
4. Acrescentou-se também 5µl da amostra purificada.

Desta mistura, retirou-se 5,0 µl que foi adicionado em um outro tubo que continha 3,0 µl do terminador específico (A,C,G ou T), totalizando um volume final de reação de 8,0 µl.

3.10 Detecção dos fragmentos seqüenciados

Após a reação de seqüenciamento as amostras foram submetidas à corrida eletroforética em um seqüenciador automático de DNA – LONG-READER TOWER (Visible Genetics Inc – Toronto, Ont, Canada), em gel de poliacrilamida Rapid Gel XL 6% cartridge (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA) utilizando-se placa MicroCel™ 300 Cassettes (Visible Genetics, Toronto, Ont, Canadá), em TBE 1X (0,89M Tris; 0,89M ácido Bórico e 0,02M EDTA pH 8,0), durante 45 minutos para o fragmento da transcriptase reversa e durante 35 minutos para o fragmento da protease e do env. Todas as corridas foram efetuadas na temperatura de 54°C, 1300V, com o laser na potência de 25%.

3.11 Análise do seqüenciamento

As edições e análise do fragmento seqüenciado foram realizadas com o programa OpenGene (Gene Objects - Visible Genetics, Toronto, Ont, Canadá).

3.12 Análise filogenética

As seqüências dos nucleotídeos, obtidas pelo seqüenciamento das regiões do gene da protease, transcriptase reversa e da região V3 do gene *env*, foram alinhadas com seqüências referência de subtipos do HIV-1 (adquiridas no sítio <http://hiv-web.lanl.gov>) através do programa ClustalX (Thompson et al., 1997). As seqüências foram submetidas à análise filogenética usando o método de neighbor-joining (Saitou et al., 1987). Devido ao pequeno tamanho dos fragmentos gerados das três regiões do estudo, os valores de bootstrap foram ignorados por não serem representativos.

3.13 Análise da diversidade genética

As seqüências dos nucleotídeos, obtidas pelo seqüenciamento das regiões do gene da protease, transcriptase reversa e da região V3 do gene *env*, foram alinhadas através do programa ClustalX (Thompson et al., 1997). As seqüências foram submetidas à análise da diversidade usando a matriz de distância baseada no cálculo

de Kimura dois parâmetros (Kimura, 1980). As mesmas seqüências foram enviadas ao sítio <http://hiv-web.lanl.gov>, para o cálculo do DN/DS através do programa SNAP baseado no método de Nei and Gojobori.

3.14 Análise da resistência genotípica aos anti-retrovirais

As seqüências geradas da protease e da transcriptase reversa do gene *pol* do HIV-1 foram enviadas para sítio <http://hivdb.stanford.edu> para as análises de resistência genotípica aos ARV. A interpretação desta resistência foi feita pelo programa HIVdb, produzido pela Universidade de Stanford, o qual se baseia na seqüência de nucleotídeos e na análise desta, feita por um algoritmo (Beta Test) que infere os níveis de resistência para cada uma das 16 drogas ARV aprovadas pelo FDA. Para tanto o programa se utiliza da somatória de valores associados a cada mutação de resistência, o total desta somatória está relacionado com o nível de resistência apresentado .

VALOR DA SOMATÓRIA	NÍVEL DE RESISTÊNCIA	IMPLICAÇÕES
0-9	Susceptível	Isolados virais deste tipo não mostram redução de susceptibilidade a droga
10-14	Potencial De Resistência Baixa	Isolados virais deste tipo podem não causar resistência, porém indicam a possibilidade de prévia drug selection
15-29	Resistência Baixa	Isolados virais deste tipo reduzem in vitro a susceptibilidade da droga
30-59	Resistência Intermediária	O genótipo sugere grau de resistência maior que o nível baixo e menor que o nível alto
>60	Alta Resistência	Isolados virais deste tipo possuem alto níveis re resistência em vitro

Figura 02 – Níveis de resistência inferidos pelo programa HIVdb através da somatória de valores associados a cada mutação de resistência.

3.15 Análise Estatística

Para análise da frequência de resistência genotípica encontrada nos grupos com IR e IE foi utilizado o teste exato de Fisher. Os valores abaixo de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 – RESULTADOS

4.1 Amostras de indivíduos com infecção recente pelo HIV-1 – grupo IR

Foram testadas 810 amostras. Destas, 74 (9,1%) foram identificadas como infecção recente, porém apenas 27 amostras (provenientes dos indivíduos que concordaram em participar do estudo) foram incluídas no estudo. Das 27 amostras, apenas duas eram de indivíduos do gênero feminino (7,4%). O restante, 25 amostras (92,6%), eram de indivíduos do gênero masculino.

4.2 Confirmação do resultado Infecção Recente

Para confirmar se os 27 indivíduos eram realmente pertencentes ao grupo de infecção recente e não decorrentes de falhas da metodologia, novas amostras destes indivíduos foram coletadas a cada três meses e submetidas novamente à estratégia sorológica dupla – STARHS. Destes 27 indivíduos, 6 abandonaram o estudo e portanto não conseguimos obter amostras seqüenciais para a confirmação do resultado. Dezoito amostras, antes não reativas no teste, tornaram-se reativas, enquanto uma amostra mostrou-se negativa no teste, mesmo com tempo maior do que aquele previsto para a soroconversão. Dois indivíduos entraram em tratamento anti-retroviral e, portanto, não tiveram o teste mais sensível positivo. Embora a amostra de alguns indivíduos não tenham se tornado reativas no teste no decorrer do tempo, todos os 27 foram incluídos no estudo.

4.3 Amostras de indivíduos com infecção estabelecida pelo HIV-1 – grupo IE

Para formar este grupo foram escolhidas ao acaso, 28 amostras de indivíduos com infecção estabelecida com diagnóstico positivo para o HIV-1 a mais de um ano e com sinais de progressão da doença, como inferido pelos baixos níveis de células CD4 na maioria dos casos (Tabela 02). Desta amostragem, 12 amostras eram de indivíduos do gênero feminino (42,8%), e 16 amostras (57,2%), eram de indivíduos do gênero masculino.

4.4 Amplificação das amostras

Das 27 amostras com IR, 20 tiveram as três regiões amplificadas: protease (PRO), transcriptase reversa (TR) e V3 da gp 120 do env (V3), 5 tiveram duas regiões amplificadas e uma somente uma região. No total foram geradas 26 seqüências da PRO, 24 da TR e 21 da V3 (Tabela 1).

Das 28 amostras com IE, 19 tiveram as três regiões amplificadas e 6 duas regiões. No total foram geradas 28 seqüências da PRO, 26 da TR e 19 da V3. (Tabela 2)

4.5 Subtipagem das amostras através da análise do seqüenciamento genômico das regiões PRO, TR e V3

Através do uso de análises filogenéticas pudemos subtipar as três regiões amplificadas do HIV-1. As tabelas 1 e 2 apresentam os subtipos encontrados nas amostras do grupo IR e IE, e as figuras 2, 3 e 4 apresentam as árvores filogenéticas geradas onde as amostras do grupo IR e IE foram alinhadas com seqüências referência de subtipos do HIV-1 freqüentemente encontradas no Brasil.

Tabela 01 – Relação das amostras dos indivíduos que constituem o Grupo de Infecção Recente com os dados sobre gênero, com contagem da Carga Viral plasmática em log, contagem das células TCD4⁺ por mm³ e subtipos detectados nas regiões amplificadas. NA refere-se a fragmentos não amplificados pela PCR.

Amostra	Gênero	CD4	CV	PRO	TR	V3
IR-1001	M	372	4,77	B	B	B
IR-1002	M	619	4,16	B	B	B
IR-1004	F	489	4,99	B	B	B
IR-1005	M	424	2,53	B	B	NA
IR-1006	F	362	3,28	F	F	F
IR-1007	M	788	3,00	B	B	B
IR-1008	M	349	3,64	F	F	F
IR-1009	M	837	4,69	B	B	B
IR-1011	M	698	5,30	B	B	NA
IR-1012	M	910	3,80	B	B	NA
IR-1013	M	776	5,01	B	NA	NA
IR-1015	M	130	5,63	B	B	B
IR-1016	M	372	5,63	B	B	B
IR-1017	M	306	5,27	B	B	B
IR-1018	M	776	5,01	C	C	NA
IR-1019	M	542	4,68	F	B	B
IR-1020	M	239	4,80	B	NA	B
IR-1021	M	496	4,60	B	B	B
IR-1022	M	529	2,60	B	B	B
IR-2002	M	558	4,20	B	B	NA
IR-2003	M	969	4,04	B	B	B
IR-2004	M	709	3,83	B	B	B
IR-2005	M	726	3,54	B	B	B
IR-2006	M	215	5,39	B	B	B
IR-2008	M	228	5,19	B	B	B
IR-2009	M	361	4,88	B	B	B
IR-2010	M	603	3,63	NA	NA	B
Total				26	24	21

Tabela 02 – Relação das amostras dos indivíduos que constituem o Grupo de Infecção Estabelecida com os dados sobre gênero, com contagem da Carga Viral plasmática em log, contagem das células TCD4⁺ por mm³, e subtipos detectados nas regiões amplificadas. NA refere-se a fragmentos não amplificados pela PCR.

Amostra	Gênero	CD4	C.V	PRO	TR	V3
IE-0602001	M	17	5,34	B	B	NA
IE-0602003	F	157	4,09	B	B	B
IE-0602004	F	56	5,55	F	F	NA
IE-0602006	M	4	5,81	B	B	B
IE-0602008	M	54	5,51	B	B	NA
IE-0602009	M	21	5,88	B	B	B
IE-0602011	F	285	4,74	B	B	NA
IE-0602012	M	219	6,02	F	F	NA
IE-0602013	M	10	6,23	B	B	B
IE-0603005	F	71	5,10	B	B	B
IE-0603007	M	37	5,30	B	B	NA
IE-0603008	M	228	5,19	B	B	F
IE-0603009	F	229	2,59	B	B	B
IE-0603010	M	172	5,56	F	NA	NA
IE-0603011	F	395	5,54	F	F	B
IE-0603012	F	132	5,64	B	B	B
IE-0603013	F	602	4,77	B	NA	NA
IE-0603014	M	168	5,09	B	B	B
IE-0603033	M	175	2,84	F	B	B
IE-0603034	F	204	2,78	B	B	B
IE-0603035	M	175	5,19	B	B	B
IE-0603036	M	10	4,87	B	B	B
IE-0603037	M	151	4,80	B	B	B
IE-0603038	F	10	5,88	B	B	B
IE-0603039	F	121	6,47	B	B	NA
IE-0603040	F	38	3,69	C	C	C
IE-0603041	F	258	5,74	F	F	F
IE-0603042	M	477	2,59	B	B	B
Total				28	26	19

Quando analisamos os subtipos encontrados nos fragmentos gerados das três regiões, observamos que no grupo IR, 84,6% (22/26) das seqüências da PRO foram identificadas como pertencentes ao subtipo B, 11,5% ao subtipo F (3/26) e 3,9% (1/26) ao subtipo C. Na região da TR, observamos que 87,5% (21/24) das seqüências foram

identificadas como subtipo B, 8,3% (2/24) do subtipo F e 4,1% (1/24) do subtipo C. Em relação à V3, ainda no mesmo grupo, 90,9% das seqüências foram identificadas como subtipo B e 9,09% subtipo F, não foi encontrada nenhuma seqüência do subtipo C.

Em relação ao grupo IE, observamos que 75,0% (21/28) das seqüências da PRO foram B, 21,4% (6/28) F e 3,6% (1/28) C. Na região da TR, observamos que 80,7% (21/26) das seqüências foram identificadas como B, 15,4% (4/26) F e 3,9% (1/24) C. Na região V3 da gp120 do grupo IE, 84,1% (16/19) das seqüências foram classificadas como B, 10,6% (2/19) F e 5,3% (1/19) C.

Quando analisamos os subtipos encontrados nas três regiões de uma mesma amostra, observamos que dentro do grupo IR, 89,4% das amostras apresentavam as três regiões do subtipo B; 10,5% apresentavam as três regiões do subtipo F e 5,2% das amostras apresentavam PRO do subtipo F, TR e V3 do subtipo B. No grupo IE observamos que 73,7 % das amostras apresentaram PRO, TR e V3 do subtipo B; 5,2% PRO, TR e V3 do subtipo F; 5,2% C PRO, TR e V3 do subtipo C; 5,2% das amostras apresentavam PRO e TR do subtipo F e V3 do subtipo B e 5,2% apresentaram PRO e TR do subtipo B e V3 do subtipo F. A tabela 03 apresenta todos os perfis de subtipos encontrados nos dois grupos assim como os fragmentos que por motivos técnicos não foram amplificados.

Tabela 03- Padrões de subtipos encontrados nas seqüências da PRO, TR e V3 nas amostras dos indivíduos dos grupos IR e IE.

PRO	REGIÃO		IR % (N)	IE % (N)
	TR	V3		
B	B	B	89,4,0% (17/19)	73,7% (14/19)
F	F	F	10,5% (2/19)	5,2% (1/19)
C	C	C	-	5,2% (1/19)
F	F	B	-	5,2% (1/19)
B	B	F	-	5,2% (1/19)
F	B	B	5,2% (1/19)	5,2% (1/19)
B	B	NA	14,3% (3/24)	15,4%(4/26)
F	F	NA	-	7,7% (2/26)
C	C	NA	4,2% (1/24)	-
B	NA	NA	3,8% (1/26)	3,6% (1/28)
F	NA	NA	-	3,6% (1/28)
B	NA	B	4,7% (1/21)	-
NA	NA	B	5,0% (1/20)	-

IR- grupo de indivíduos com infecção recente; IE - grupo de indivíduos com infecção estabelecida; PRO – região da protease; TR- região da transcriptase reversa; % (N) – porcentagem (número de amostras com o perfil descrito / número de amostras com as mesmas regiões amplificadas);V3 – região v3 da gp 120; B – subtipo B; F – subtipo F; C- subtipo C; NA – não amplificado .

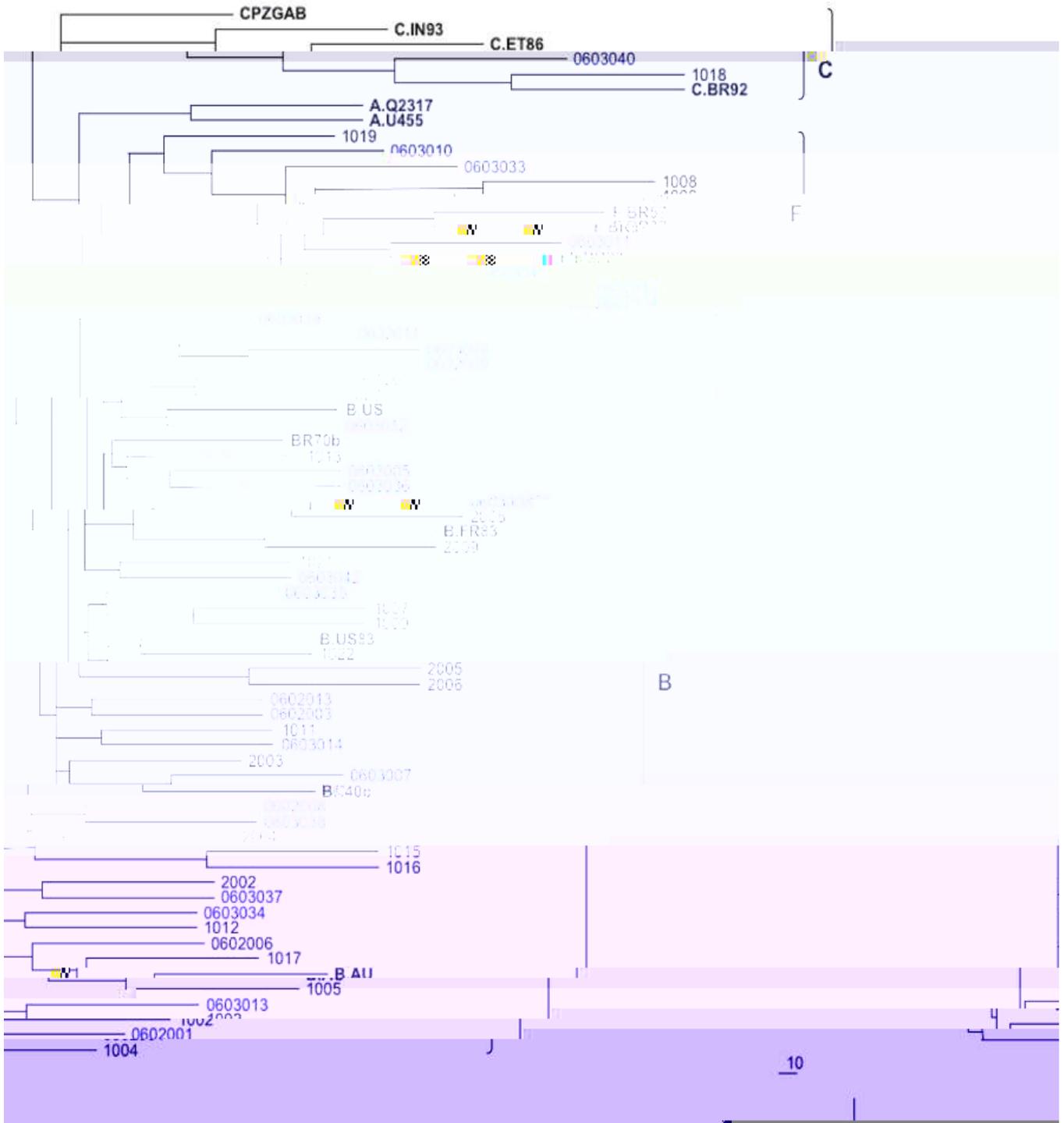


Figura 03 - Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região da protease do gene *pol* inferida por *Neighbor-Joining*. A árvore foi enraizada com a seqüência de nucleotídeos CPZ do Gabão. As amostras pertencentes ao grupo IR estão em preto, e as pertencentes ao grupo IE estão em azul. Em negrito estão as seqüências referências dos subtipos do HIV-1.

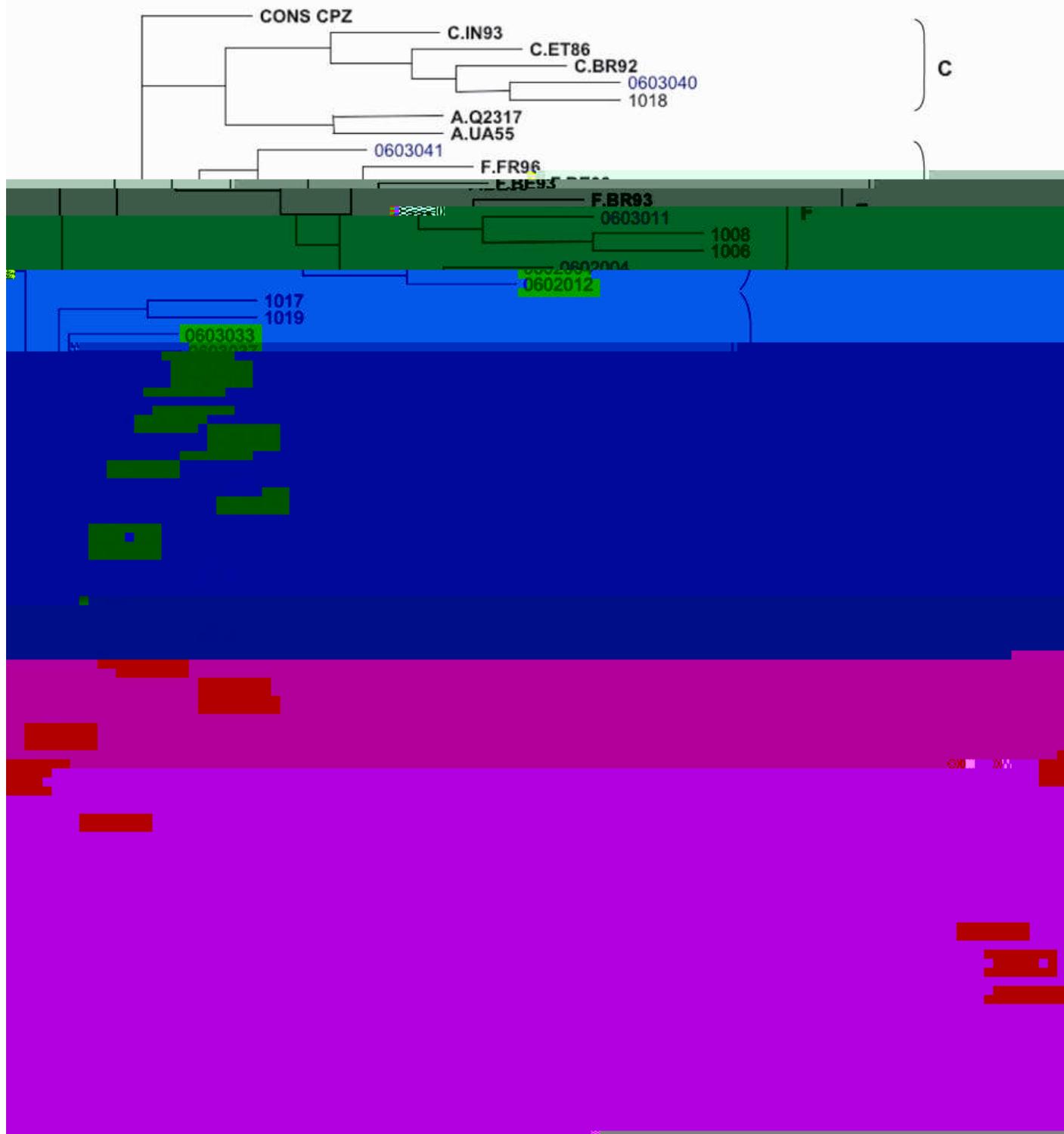


Figura 04 - Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região da transcriptase reversa do gene *pol* inferida por *Neighbor-Joining*. A árvore foi enraizada com a seqüência de nucleotídeos CPZ do Gabão. As amostras pertencentes ao grupo IR estão em preto, e as pertencentes ao grupo IE estão em azul. Em negrito estão as seqüências referências dos subtipos do HIV-1.



Figura 05 - Árvore filogenética das seqüências de nucleotídeos da região V3 da gp120 do gene *env* inferida por *Neighbor-Joining*. A árvore foi enraizada com a seqüência de nucleotídeos CPZ do Gabão. As amostras pertencentes ao grupo IR estão em preto, e as pertencentes ao grupo IE estão em azul. Em negrito estão as seqüências referências dos subtipos do HIV-1.

4.6 Análise da diversidade genética do gene *pol*

Quando analisamos o alinhamento das seqüências de aa da PRO tanto do grupo IR como do grupo IE (figura 5) notamos que a maioria das mutações, ocorreram entre os subdomínios da enzima (sítio ativo, “*flap*” e fenda do substrato). No grupo IR os códons que apresentaram maior índice de polimorfismos foram: L63 (53,8%), R41 (46,1%) N37 e I72 (34,6 %) e E35, M36 e I62 (23,1%). No grupo IE foram os códons: L63 (67,8 %), E35 (39,3 %), R57 (35,7 %) e M36, R41 e Q61 (32,1 %). A variabilidade genética encontrada no grupo IR foi de 7,2 % ($s = \pm 3,3$) e no grupo IE foi de 7,4% ($s = \pm 3,0$). O DN/DS encontrado nesta região foi de 1,00 para o grupo com IR e 1,28 para o grupo com IE, sendo que estas diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes.

	Sítio ativo				" flap "		fenda do substrato								
	22	30	33	36	40	47	50	57	60	63	74	80	87	90	93
ConsensoIR	ALLDTGADDTV	LEEMNLPGRW	KPKMIGGIGG	FIKVRQYDQI	LIEICGHKAI	GTVLVGPTPV	NIIGRNLLTQ	IGC							
IR-B-1001	P.....	TE	I.....	L..
IR-B-1002DI.....	SV.....
IR-B-1004I.....	P.....	Q.....
IR-B-1005	V...T.....	SV.....	L..
IR-B-1007	E.....
IR-B-1009	K.....
IR-B-1011D.....	V.....	I.....
IR-B-1012	K.....	P.....	R.....
IR-B-1013	T..K.....	V.....	P.....	S.....	V.....	I.....
IR-B-1015	E.V.....	V.....
IR-B-1016	E.V.....	V.....
IR-B-1017	SV.....
IR-B-1020	S.....	P.....	T.....	I.....
IR-B-1021	S...K.....	R.....
IR-B-1022	K.....
IR-B-2002D.....	P.....
IR-B-2003	S.....
IR-B-2004	V.....	PV...Y.....	V.....
IR-B-2005	A.....
IR-B-2006	A.....
IR-B-2008	I...S.....	K.....	P.....
IR-B-2009	S.....
IR-F-1006DI...K.....	K...NV.....	YQ.T.....	M.....
IR-F-1008DI...K.....	K...NV.....	RYQ.T.....	R...M.....	S.....
IR-F-1019DID.....	R.....	H.....	S.....	T.....	V.....	M.....
IR-C-1018IK...N.....	H.....	V.....	M...L.....
ConsensoIE	ALLDTGADDTV	LEEMNLPGRW	KPKMIGGIGG	FIKVRQYDQI	LIEICGHKAI	GTVLVGPTPV	NIIGRNLLTQ	IGC							
IE-B-0602001DI.....	V.....	A.....
IE-B-0602003	H.....	E.....
IE-B-0602006	V.....	P.....
IE-B-0602008	V.....	PM.....	I.....
IE-B-0602009WS.....	P...F.K.TL.....
IE-B-0602011	P.....	K.....
IE-B-0602013D.....	V.....	K.....
IE-B-0603005S.....	V.....	Q.....
IE-B-0603007	P.....
IE-B-0603008	I...S.....	K.....	P.....
IE-B-0603009	S.....	P.....	K.TE.....	I.....
IE-B-0603012	K.....	I.....	L..
IE-B-0603013DI...K.....	N.....	V.....	L..
IE-B-0603014E.....	R.....	V.....
IE-B-0603034	V...S.S.....	K.....	SV.....
IE-B-0603035	P.....
IE-B-0603036G.S.....	V.....	A.....	I.....
IE-B-0603037	P.D.....
IE-B-0603038	E.V.....	V.....	Q.....	I.....
IE-B-0603039EI...K.....	K...N.....	H.....
IE-B-0603040	K...N.....	K.....	I.....	M...L.....
IE-B-0603042D.A.....	P.....
IE-F-0602004DI...K.....	K.H.N.....	M.....
IE-F-0602012DI...K.....	K.H.N.....	R.....	M.....
IE-F-0603010DI.....	K...N.....	T.....	V.....
IE-F-0603011DI...K.....	K...ED.....	S.....	M.....
IE-F-0603033DI...K.....	K...N.....	V.....	T.....	M.....
IE-F-0603041DI...K.....	K...D.....	T.....	M.....

Figura 06 – Alinhamento de aminoácidos da região da protease do gene *pol*. A primeira divisão mostra as seqüências de aminoácidos (aa) do grupo IR (infecção recente) alinhadas com sua seqüência consenso, a segunda, mostra o alinhamento das seqüências de aa do grupo IE (infecção estabelecida) com sua seqüência consenso. As amostras estão identificadas pelo grupo ao qual pertencem, seguido pelo subtipo encontrado na região e seu número no estudo. Os aa que constituem os sítios ativos estão em negrito; pontos significam identidade.

A figura 6 mostra o alinhamento das seqüências de aa da região da TR do grupo IR e do grupo IE. No grupo IR os códons que apresentaram maior índice de polimorfismos foram: K122, T200 e R211 (45,8%), D177 (41,6%), S162 (37,5%) e F214 (33,3%). No grupo IE foram os códons: I135 (57,7%), K122, S162 e R211 (38,4%) e Q174 (30,7%). A variabilidade genética encontrada no grupo IR foi de 7,0 % ($s = \pm 2,7$) e no grupo IE foi de 6,9% ($s = \pm 2,9$), sendo que esta diferença, entre os grupos, não foi estatisticamente significativa. O DN/DS encontrado nesta região foi de 0,41 para o grupo com IR e 0,41 para o grupo com IE.

4.7 Análise da resistência genotípica aos anti-retrovirais

Para analisarmos o grau de diminuição de susceptibilidade aos ARV consideramos apenas as amostras onde foi possível amplificar a PRO e TR (n=24). Em relação aos inibidores de protease (IP), vimos no grupo IR que pelo menos 75% das amostras possuíam pelo menos uma mutação associada à perda de susceptibilidade enquanto no grupo IE foi encontrado 92,9%. A mesma análise foi feita em relação aos inibidores da transcriptase reversa (ITR), onde observamos que 16,7% das amostras das amostras do grupo IR possuíam pelo menos uma mutação associada à perda de susceptibilidade a classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleosídeos (ITRN) e 12,5% a classe dos inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN); no grupo IE, encontramos 7,2% das amostras com pelo menos uma mutação associada à perda de susceptibilidade a classe dos ITRN e 3,6% para a classe dos ITRNN. Ao analisarmos o grau de diminuição de susceptibilidade aos ARV, detectamos no grupo IR, 29,1% de resistência, nenhuma amostra apresentou resistência aos IP juntamente com resistência aos ITR. Destas amostras, uma (4,2%) apresentou resistência às duas classes dos ITR, 2 (8,3%) a classe dos ITRN, e duas (8,3%) apenas a classe dos ITRNN; em relação aos IP, duas (8,3%) amostras apresentaram resistência. Nas amostras do grupo IE, onde observamos, 11,4 % de resistência, destas amostras, uma (3,8%) apresentou resistência aos IP e 2 (7,7%) aos ITRN. Também neste grupo não foi observada resistência aos IP juntamente com resistência aos ITR. As diferenças entre as prevalências resistência tanto para os IP como para os ITRN, encontradas nos grupos com IR e IE não foram estatisticamente significativas (IP - $p < 0,47$ e ITRN – $p < 0,18$) A figura 8 apresenta a distribuição da resistência genotípica dos grupos IR e IE a cada uma das classes de ARV, e a figura 9 apresenta as mutações encontradas nos dois grupos do estudo e a interpretação destas segundo o algoritmo de Stanford.

Painel A

GRUPO DE INFECÇÃO RECENTE			
	Resistente	Não Resistente	TOTAL DE RESISTÊNCIA
IP	2	22	8,3 % (2/24)
ITRN	2	22	8,3 % (2/24)
ITRNN	2	22	8,3 % (2/24)
ITRN e ITRNN	1	23	4,2 % (1/24)
IP & ITR	0	24	0% (0/24)
IP ou ITR	7	18	29,1 % (7/24)

Painel B

GRUPO DE INFECÇÃO ESTABELECIDO			
	Resistente	Não Resistente	TOTAL DE RESISTÊNCIA
IP	1	25	3,8% (1/26)
ITRN	2	24	7,7 % (2/26)
ITRNN	0	26	0 % (0/26)
ITRN e ITRNN	0	0	0 % (0/26)
IP & ITR	0	26	0% (0/26)
IP ou ITR	3	23	11,4 % (3/26)

Figura 08 - Distribuição da resistência genotípica dos grupos IR (painel A) e IE (painel B) a cada uma das classes de ARV. IP – inibidores da protease; ITRN – inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos; ITRNN - inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos.

Painel A		CÓDONS MUTADOS	
AMOSTRA	PRO	TR	
IR 1001	I15V, L63P, A71T, I72V, V77I, I93L	K103N, K122P, I135T, I142V, E169D, R172K, R211K	
IR 1007	I15V, L19T, D60E	M41L, K122E, D123N, I135T, E138A, I142V, S162C	
IR 1017	N37S, L63S, I64V	K103N, I135T, A158S, M184V, R211K	
IR 1019	E35D, M66I, N37D, K55R, Q61H, L63S, I72T, L76V, L89M	F77L, R78I, K103N, K122K, K173A, R211K	
IR 1020	I15L, E21K, N37S, I72T, V77I, N88D/N, I93L	NA	
IR 2002	E35D, L63P	M41L, S68G, V90I, I135T, K101R, K122E, S162C, F171Y, T200A, E204D, R211K	
IR 2003	P39S, V82A	I135T, D177E, R211K	
IE 0602006	I62V, L63P, I93	G45R, K49Q, G51R, E53K, W88Q, G93R, G99R, I135L, E138R, G152R, G155R, D177E, M184I, G196R, W121G, R211K, G213R	
IE 0602013	E35D, I64V, R87K	E53K, V75M, V90I, K122E, I135T, S162A, D177E, I178M, G196E, R211K	
IE 0603012	M46M/V, V77I, I93L, R57K	K122E, I135V, A158S	

Painel B

AMOSTRA	RESISTÊNCIA																
	IP							ITRN					ITRNN				
	APV	ATV	IDV	LPV	NFV	RTV	SQV	3TC	ABC	AZT	D4T	DDC	DDI	TDF	DLV	EFV	NVP
IR 1001	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	A	A	A
IR 1007	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IR 1017	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	A	B	nd	nd	B	B	nd	A	A	A
IR 1019	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	A	A	A
IR 1020	nd	nd	nd	nd	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IR 2002	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IR 2003	nd	B	nd	B	I	I	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IE 0602006	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IE 0602013	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd
IE 0603012	nd	B	nd	nd	B	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Figura 09 – Mutações no *pol* que ocasionam algum grau de resistência. Painel A – códons mutados; PRO – região da protease; TR – região da transcriptase reversa. Painel B - IP – inibidores da protease; ITRN – inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos; ITRNN - inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos; APV – Amprenavir; ATV – Atazanavir; IDV – Indinavir; LPV – Lopinavir; NFV – Nelfinavir; RTV – Ritonavir; SQV – Saquinavir; 3TC – Lamivudina; ABC – Abacavir; AZT – Zidovudina; D4T – Estavudina; DDC – Zalcitabina; DDI – Didanosina; TDF - Tenofovir; DLV – Delavirdina, EFV – Efavirenz; NVP – Nevirapina; nd – não detectada; A – resistência alta; B – resistência baixa; I – resistência intermediária. As amostras estão identificadas pelo grupo ao qual pertencem seguido pelo número no estudo.

4.8 Diversidade genética da região V3

Quando analisamos o alinhamento das seqüências de aa da V3 (figura 9), verificamos no grupo IR, das 20 seqüências do subtipo B, 6 (27,3%) apresentavam a seqüência GPGR na coroa da alça V3 e 6 (27,3%) com a seqüência GWGR, o restante (36,4%) apresentou variações da seqüência GPGR. As duas amostras deste grupo identificadas como subtipos possuíam a seqüência GPGR na coroa da alça V3. No grupo IE, das 16 seqüências do subtipo B, 7 (36,9%) possuem a seqüência GPGR na coroa da alça V3 e 5 (31,3%) a seqüência GWGR. As duas seqüências do subtipo F e uma do subtipo C encontradas neste grupo apresentavam a seqüência GPGQ. Em relação à seqüência de aa do sítio de glicosilação associado ao N, 31,8% das seqüências do grupo IR apresentaram mutação em pelo menos um aa e no grupo IE 31,6% apresentaram mutação em apenas um aa.

Para a inferência sobre a presença de cepas indutoras de sincício em ambos os grupos, levamos em consideração apenas as amostras que apresentaram aa básicos nas posições 306 e 320. No grupo IR uma amostra (4,5%) mostrou-se como tendo um perfil genético compatível com cepa indutora de sincício por apresentar um aa básico na (R) posição 320. No grupo IE, 2 amostras (10,5%) apresentaram padrão compatível com o de cepas indutoras de sincício; as duas por apresentarem um básico (K) na posição 320. Todas estas amostras, tanto as do grupo IR como as do grupo IE foram identificadas como pertencentes ao subtipo B. A variabilidade genética encontrada no grupo IR foi de 22,1 % ($s = \pm 8,8$) e no grupo IE foi de 18,2% ($s = \pm 7,4$). O DN/DS encontrado nesta região foi de 2,99 para o grupo com IR e 2,65 para o grupo com IE, sendo que as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes.

	C2	V3										C3
		296	306	320	330							
Consenso IR	A K T I I V Q L N E S V Q I N	C	T R P N N N T R K S I H M G P G R A F Y A T G E I I G D I R Q A H C	N L S K T K W N N T L K Q I V I K L R E Q F								
IR-B-1001
IR-B-1005
IR-B-1009
IR-B-1015
IR-B-1019
IR-B-1020
IR-B-1021	S
IR-B-1022	T E
IR-B-2003
IR-B-2004
IR-B-2005
IR-B-2006
IR-B-2008
IR-B-2009
IR-B-1002
R-IB-1004
IR-B-1007
IR-B-1016
IR-B-1017
IR-B-2010
IR-F-1006	T
IR-F-1008	T
Consenso IE	A K T I I V Q L N E T V E I N	C	T R P N N N T R K S I H I G P G R A F Y A T G E I I G D I R Q A H C	N L S K A K W N N T L K Q I A A K L R E Q F								
IE-B-0602009
IE-B-0603005
IE-B-0603009
IE-B-0603011
IE-B-0603012
IE-B-0603014
IE-B-0603033
IE-B-0603035
IE-B-0603037
IE-B-0602003
IE-B-0602006
IE-B-0602013
IE-B-0603034
IE-B-0603036
IE-B-0603038
IE-B-0603042
IE-F-0603008
IE-F-0603041
IE-C-0603040

Figura 10 – Alinhamento de aminoácidos da região V3 da gp 120. A primeira divisão mostra as seqüências de aminoácidos (aa) do grupo IR (infecção recente) alinhadas com sua seqüência consenso, a segunda, mostra o alinhamento das seqüências de aa do grupo IE (infecção estabelecida) com sua seqüência consenso. As amostras estão identificadas pelo grupo ao qual pertencem, seguido pelo subtipo encontrado na região e seu número no estudo. * cepa indutora de sincício; pontos significam identidade.

5 – DISCUSSÃO

Durante a infecção primária, antes do aparecimento de anticorpos, a infecção pelo HIV pode ser confirmada pela demonstração da circulação do antígeno p24 ou pela presença de RNA ou DNA viral (Kinloch de Loies et al., 1995, Schacker et al., 1996). Uma vez dado aparecimento de anticorpos, seus títulos aumentam progressivamente durante 3 a 5 semanas até atingirem um platô, que permanece razoavelmente constante pelo resto da infecção (Constantine et al., 1994). O período onde os anticorpos aparecem, mas ainda não atingiram seu platô pode ser considerado como infecção recente. Com o desenvolvimento da metodologia conhecida como STARHS, foi possível a identificação de pessoas com infecção recente (Janssen et al., 1998). O emprego desta metodologia possibilita a estimativa da incidência do HIV, além da caracterização dos vírus correntemente transmitidos (Machado et al., 2002). Através da utilização desta técnica foi possível detectar 27 amostras de pessoas com infecção recente, das quais 18 foram confirmadas como sendo infecção recente pela positivação do teste menos sensível em amostras seqüenciais. Para as outras 9 amostras não foi possível a confirmação do resultado obtido no primeiro teste, devido ao fato de 6 indivíduos abandonarem o estudo, ficando estes sem amostras seqüenciais, e 3 amostras não se positivaram no teste mesmo com tempo maior do que aquele previsto para a soroconversão. Destas 3, 2 eram de indivíduos que entraram em tratamento e portanto apresentavam resposta imune muito pobre o que pode levar a um erro de classificação. De fato, um estudo avaliando pacientes que iniciaram tratamento com anti-retroviral identificou que os títulos do EIA menos sensível diminuiu ao longo do tratamento, sendo que o este teste se tornou negativo em dois entre 15 indivíduos que adquiriram carga viral indetectável. (Cimerman, 2002).

A grande maioria das 27 amostras de pessoas com infecção recente, que entraram no estudo, tiveram a três regiões alvo amplificadas com sucesso (74%). Entretanto no grupo com infecção estabelecida, 67,9% das amostras tiveram as três regiões amplificadas de forma eficaz. É possível que as regiões não amplificadas das amostras de ambos os grupos possuam divergências nas seqüências de nucleotídeos nas regiões alvo de anelamento dos iniciadores, impossibilitando dessa forma a amplificação do fragmento. Nestas amostras onde uma ou outra região não foi amplificada, a insuficiência de DNA proviral como causa da falha na amplificação do

HIV-1 fica menos provável, posto que as PCRs para as três regiões foram feitas com a mesma alíquota de DNA extraído.

Através da análise filogenética das seqüências geradas, observamos que tanto no grupo de pessoas com infecção recente quanto no grupo com infecção estabelecida, o subtipo B foi o mais freqüente nas três regiões estudadas, seguido pelo subtipo F e posteriormente por uma minoria de C. Desde o início da caracterização do HIV-1 no Brasil têm se encontrado o subtipo B como o mais freqüente (~75%), e dentre os não-B, o subtipo F é o mais predominante (~10%) seguido pelo subtipo C (~3%) (Morgado et al., 1994; Sabino et al., 1996; Tanuri et al., 1999; Rossini et al., 2001, Dumans et al., 2002, Brindeiro et al., 2003; Pires et al., 2004). Estes dados reforçam a teoria de que o subtipo B tenha sido o primeiro a ser introduzido no Brasil e, portanto encontrou grupos de risco disseminadores antes de outros subtipos do HIV-1, caracterizando o que se convencionou descrever como efeito fundador. Quando analisamos simultaneamente as três regiões estudadas, observamos que no grupo com infecção recente, amostras de 20 pessoas são concordantes quanto ao subtipo encontrado nas três regiões, sendo que destas, 18 (89,4%) são pertencentes ao subtipo B e 2 (10,5%) são do subtipo F. Neste grupo encontramos uma amostra com PRO e TR do subtipo C, porém nesta última não foi possível amplificar a V3. No grupo de pessoas com infecção estabelecida, o subtipo mais freqüentemente encontrado nas amostras foi o B (73,7%), seguido pelos subtipos F e C (5,2%). Em ambos os grupos encontramos amostras que possuíam subtipos discordantes entre as regiões; em uma amostra do grupo com IR foi identificado o subtipo F na região da protease (PRO) e B tanto nas regiões da transcriptase reversa (TR) quanto na região V3 da gp120 (V3). Já no grupo com IE, duas amostras apresentavam subtipos discordantes entre as regiões, uma apresentava PRO e TR do subtipo B e V3 do subtipo F e a outra apresentava PRO e TR do subtipo F e V3 do subtipo B.

No Brasil já foram descritos recombinantes entre os subtipos B e F (Sabino 1996, Soares et al., 2003; Brindeiro et al., 2003). Neste estudo detectamos tanto a presença de recombinações intragênicas como recombinações intergênicas, ambos os eventos podem ser explicados através dos saltos da enzima viral transcriptase reversa de uma fita de RNA (doadora) para uma outra fita (receptora) a partir de uma infecção dupla pelo HIV-1 (Jetzt et al., 2000; Hu and Temin, 1990) como também pela presença de seqüências de bases repetidas como quatro ou cinco adeninas, timinas, citosinas e guaninas ao longo do genoma do HIV-1, o que favoreceria o desligamento da

transcriptase reversa destas seqüências de bases de uma das fitas de RNA (doadora) (Quinones-Mateu et al., 2002). Para uma caracterização mais precisa destas seqüências recombinantes seria necessário o seqüenciamento do genoma completo destas amostras, a fim de se verificar o padrão de recombinação e também onde estão localizados os pontos de quebra (*breakpoint*).

Nas amostras identificadas como pertencentes ao subtipo B na V3, encontramos no grupo IR igual número (27,3%) de amostras com a seqüência GPGR, comum em amostras do subtipo B da América do Norte e Européias, e de amostras com a seqüência GWGR, característica da variante do subtipo B brasileira. Já no grupo IE, a seqüência mais prevalente na coroa da alça foi a GPGR (36,9%) seguida da seqüência GWGR (31,3%). A variante GWGR tem sido detectada nas cepas brasileiras desde o início da década de 80 (Potts et al., 1993; Morgado et al., 1994; Casseb et al., 1998; Bongertz et al., 2000; Vicente et al., 2000) em proporções similares a variante GPGR, o que sugere que a freqüência e a proporção entre as duas variantes têm se mantido ao longo do tempo. Em todas as amostras do subtipo F, a seqüência encontrada foi GPGQ, observada ocasionalmente em amostras F brasileiras e também romenas (Bandeia et al., 1995). Ao medirmos a variabilidade genética das seqüências da V3 vimos que nos dois grupos ela é alta, e com valores bem semelhantes, sendo no grupo com IR 22,1% ($s=+ 8,8$) e no grupo com IE 18,2% ($s=+7,4$). Esta alta variabilidade dificulta a produção de uma vacina efetiva baseada em uma seqüência consenso do envelope.

Encontramos tanto no grupo com IR como no com IE, amostras com genótipo que prediria o fenótipo de uma cepa indutora de sincício. A presença de cepas indutoras de sincício em indivíduos com infecção recente já foi documentada em outro estudo (Machado et al., 2002), porém este achado não é comum já que os vírus detectados em indivíduos recém infectados são vírus trópicos por macrófagos e monócitos e não indutores de sincício (Roos et al., 1992; Connor et al., 1998). É descrito que indivíduos com infecção recente portadores deste tipo de vírus podem progredir mais rapidamente à aids (Roos et al., 1992; Nielsen et al., 1993).

A variabilidade genética encontrada nas seqüências da PRO foi de 7,2% ($s=+ 3,3$) no grupo com IR e 7,4% ($s=+ 3,0$) no grupo com IE, e na TR foi de 7,0% ($s=+ 2,7$) no grupo com IR e 6,9% ($s=+ 2,9$) no grupo com IE, estes valores são bem inferiores aos detectados na V3 da gp 120 demonstrando que para o bom funcionamento destas enzimas há uma forte pressão na manutenção da estrutura

terciária, gerada pela composição dos aa proporcionando assim uma diversidade genética consideravelmente baixa na ausência de outra forma de seleção, como poderia ser o caso da presença de anti-retrovirais. Dentro do *pol* pudemos observar que não houve muitas variações na composição dos aa. Na PRO o valor de DN/DS foi igual 1 ou muito próximo deste valor (IR=1,00 e IE=1,28), e a grande maioria destas variações foram detectadas entre os subdomínios da enzima (fora do sítio ativo). Na TR o valor de DN/DS foi inferior a 1 (0,41 para os dois grupos) o que indica uma evolução neutra na PRO e uma forte pressão para que a estrutura e função sejam conservadas na TR. Os maiores valores de substituições não conservadoras foram encontrados na V3 da gp 120 (IR – DN/DS= 2,99 e IE – DN/DS= 2,65), o que indica que nesta região está ocorrendo uma pressão seletiva positiva possibilitando o aparecimento de novas mutações envolvidas no escape imune. A transmissão de cepas resistentes aos anti-retrovirais (ARV) têm sido documentada em quase todos os grupos de risco (Tang and Pillay, 2004). A terapia anti-retroviral é bem efetiva na supressão da replicação viral, entretanto o aparecimento de vírus resistentes deve-se principalmente ao tratamento parcial ou interrompido por fatores como toxicidade, acessibilidade às drogas ou baixa adesão. Durante a falência da terapia, a carga viral do HIV aumenta, possibilitando a transmissão de cepas resistentes para indivíduos susceptíveis. Por este motivo, pacientes que recebem a terapia anti-retroviral necessitam de um monitoramento cuidadoso e um controle que leve a completa supressão viral para que se reduza o risco de transmissão vírus resistentes. No Brasil existe uma política bem estabelecida de tratamento em HIV/aids e é usada como modelo de tratamento para HIV/aids pelo mundo. O grande acesso à terapia anti-retroviral, resultou em um aumento da prevalência de resistência primária, entre 1996-1998 a taxa de prevalência estava em 1% e passou para 7% entre os anos de 2000-2002 (Brindeiro et al., 2003). Entretanto em alguns locais de alta incidência de infecção pelo HIV e manipulação ARV extensa, como no município de Santos/SP, observou-se uma alta prevalência de resistência primária tanto para os inibidores da protease (IP) como para os inibidores da transcriptase reversa (ITR), perfazendo um total 36% de resistência primária entre indivíduos com infecção recente pelo HIV-1. (Sucupira, 2002).

Embora a resistência primária no Brasil tenha aumentado, ainda é considerada baixa quando comparada com outros países que possuem extensivo acesso aos ARV. Em alguns estudos a prevalência da resistência primária varia entre 0-17% em vários

países como a Grécia, França e Estados Unidos, Itália, Canadá, Alemanha, Espanha, Inglaterra e Luxemburgo (Alexander, et al., 2001; Briones et al., 2001; Descamps et al., 2001, Duwe et al., 2001, Gómez-Cano et al., 1998; Margiorkinis et al., 2002; Perno et al., 2002; Tamalet et al., 2000; UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance, 2003; Violin et al., 2002; Wegner et al., 2000; Weinstock et al., 2000). Outros estudos, entretanto, tem encontrado altas prevalências que variam de 26 a 38% na Polônia, Itália e Estados Unidos (Horban, et al., 2002; Ristig et al., 2002; Tambussi et al., 2000).

Neste estudo detectamos a presença de cepas portadoras de mutações em códons que acarretam a diminuição de susceptibilidade aos ARVs. Em relação aos IP, detectamos no grupo com IR uma alta prevalência de resistência (8,3 %), sendo esta associada à presença de uma mutação primária (V82A) Em ambos os grupos detectamos a presença de múltiplas mutações secundárias. Estas mutações podem favorecer a resistência causada por mutações primárias mesmo sem causar impacto necessariamente na eficácia da droga (Martinez-Picado et al., 1999). Embora ainda controverso, existe evidência de que a presença destas mutações em indivíduos não tratados estaria relacionada a um pobre resultado e rápida falência virológica depois de iniciado o tratamento anti-retroviral (Little, 1999). Também detectamos altas taxas de resistência aos ITR. No grupo com IR, detectamos 20,8% de resistência, com amostras resistentes as duas classes de ITR (inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos - ITRN e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos ITRNN) e no grupo com IE encontramos 7,7% de resistência, porém, somente à classe dos ITRN. Não foi encontrada em nenhum grupo, amostra de resistentes as três classes de ARV. As diferenças entre as prevalências de resistência tanto para os IP como para os ITRN, encontradas nos grupos com IR e IE não foram estatisticamente significantes. Como mencionado anteriormente, altos índices de resistência também foram observados em amostras de indivíduos recém infectados no município de Santos (Sucupira, 2003). A respeito dos altos índices de resistência encontrados merecem destaques os fatos do município de São Paulo ser o epicentro da epidemia de aids no Brasil e também o grande acesso dos pacientes aos ARV.

O fato de termos detectado resistência em indivíduos recém infectados confirma a existência de transmissão de cepas com mutações de resistência. Isto implica que em algum momento da cadeia de transmissão do HIV, as normas fundamentais de prevenção à transmissão não foram respeitadas, visto que os transmissores são da

infecção são pessoas que conhecem seus status sorológico e que fazem uso de ARV e encontram-se em falha terapêutica. De fato, estudo recente demonstra que pacientes com falha do tratamento anti-retroviral e com cepas de HIV-1 resistentes, continuam engajados em atividades de alto risco com exposições múltiplas a parceiros soronegativos (Kozal et al., 2004). Além disto, este fato confirma que o monitoramento prospectivo de resistência primária é fundamental em nosso meio, principalmente em locais onde exista alta exposição ao HIV, já que a transmissão de vírus resistentes limita imediatamente as escolhas para a primeira linha de tratamento anti-retroviral.

6 – CONCLUSÕES

Graças à metodologia STARHS, foi possível detectar 27 amostras de pessoas com infecção recente. Destas, 18 apresentaram a positivação do teste menos sensível em amostras seqüenciais. Entretanto, em alguns indivíduos não foi possível a confirmação do teste pela sua positivação, seja esta por abandono do estudo ou por introdução de tratamento anti-retroviral.

Através da análise filogenética das seqüências geradas, observamos que em ambos os grupos o subtipo B foi o mais freqüente nas três regiões estudadas (PRO, TR e V3), seguido pelo subtipo F e posteriormente por uma minoria de C. Nos dois grupos encontramos amostras que possuíam subtipos discordantes entre as regiões que foram consideradas como provenientes de HIV-1 recombinantes.

A variabilidade genética detectada no *pol* foi baixa tanto grupo de pessoas com infecção recente (IR) como no grupo de pessoas com infecção estabelecida (IE). Já a variabilidade genética detectada na região V3 da gp120 foi alta e apresentando valores semelhantes em ambos os grupos. As regiões próximas à coroa da alça foram mais variáveis quando compara as demais. Nas amostras do subtipo B a seqüência mais prevalente na coroa da alça foi a GPGR (IR – 72,7%; IE – 62,5%) seguido da seqüência GWGR (IR – 27,3%; IE – 37,5%). Em todas as amostras do subtipo F, a seqüência encontrada foi GPGQ. Foi evidenciada maior pressão seletiva na região do env, seguida da protease e da transcriptase reversa, sugerindo que estas regiões possam conter epítomos com maior poder antigênico ou que as alterações menores representem necessidade de manutenção de estrutura e/ou função das proteínas.

Detectamos em ambos os grupos uma alta freqüência de cepas portadoras de mutações relacionadas à resistência aos ARVs, que ocasionaram em algum grau de diminuição de susceptibilidade aos ARVs. No grupo de pessoas com infecção recente 8,3% das cepas apresentavam resistência aos inibidores da protease e 20,8% aos inibidores da transcriptase reversa. No grupo com infecção estabelecida, detectamos que 3,8% das cepas apresentavam resistência aos inibidores da protease e 7,7 % aos inibidores da transcriptase reversa. Cepas com resistência genotípica estão infectando indivíduos, sendo que a resistência aos inibidores da protease e os inibidores da

transcriptase reversa apresentam um pequeno aumento quando comparada à resistência encontrada nos indivíduos com infecção estabelecida, apesar deste aumento não ser estatisticamente significativo.

7 – ANEXO 1

Projeto de pesquisa: **Avaliação da resposta imunológica do em pacientes recentemente infectados pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio imunoenzimático com estratégia de testagem dupla (*detuned*),**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – 1

Data: ___/___/___

Código de identificação: _____

Você estará coletando sangue para realizar o teste para verificar se você se contaminou com o Vírus HIV, que é o vírus que causa a AIDS, como você já ouviu durante o aconselhamento.

Durante alguns meses, neste CTA nós estamos realizando um estudo para identificar pessoas que se contaminaram com o HIV recentemente, quer dizer num período de menos de 170 dias. Para isto, além do exame ELISA e dos testes confirmatórios que já são feitos de rotina, um novo exame estará sendo feito com o mesmo sangue. Este estudo é feito com a participação de vários profissionais aqui da Secretaria Municipal de Saúde e da Escola Paulista de Medicina, e o coordenador é o Dr. Esper Kallás

Saber há quanto tempo as pessoas se contaminaram é muito importante para entender como a doença está se espalhando e como podemos preveni-la.

Nós estamos pedindo sua autorização para realizar esse novo teste, caso o seu exame seja positivo, ou seja, se o primeiro exame indicar que você está contaminado com o HIV. Se você concordar, fique certo que você não correrá nenhum risco a mais, porque o exame será realizado usando o mesmo sangue que você vai tirar para o exame de rotina. Isso também não significa nenhum benefício imediato para você. No entanto, você estará contribuindo para o conhecimento sobre a AIDS.

Você entendeu? Tem alguma pergunta? Caso seu teste para o HIV seja positivo, você autoriza a realização desse outro exame? Se sim, por favor assine na linha abaixo.

Assinatura do usuário

Assinatura do profissional responsável

Projeto de pesquisa: **Avaliação da resposta imunológica do em pacientes recentemente infectados pelo HIV-1, identificados pela técnica sorológica de ensaio imunoenzimático com estratégia de testagem dupla (*detuned*),**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – 2 (TCLE)

Você está convidado para participar em um estudo de pesquisa. Você pode escolher livremente se quer ou não participar. Por favor, leia cuidadosamente o que está apresentado a seguir e pergunte qualquer dúvida que você possa ter. Este estudo está sendo conduzido pela Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Escola Paulista de Medicina / Universidade Federal de São Paulo.

Desde o aparecimento da epidemia causada pelo HIV, têm sido desenvolvidos vários exames para ajudar a explicar melhor como o organismo tenta combater o vírus.

Como você já sabe, de acordo com testes que foram realizados, você provavelmente adquiriu o HIV há pouco tempo. Nós pretendemos desenvolver um outro deste que nos ajude a identificar pessoas em situação semelhante à sua. Um dos objetivos deste estudo é testar, em laboratório, como as células brancas do seu sangue respondem à partes do HIV.

O HIV é conhecido por apresentar muitas diferenças quando analisado em diferentes regiões, países, e até mesmo, entre diferentes pessoas. Um outro objetivo deste estudo será observar que tipo de HIV está presente em seu corpo.

Hoje nós sabemos que o HIV vai progressivamente destruindo os mecanismos de defesa do organismo, o que chamamos de sistema imunológico. O vírus consegue fazer com que, pouco a pouco, sejam destruídas uma das principais células de defesa de seu corpo, o chamado linfócito T CD4+. Entretanto, além de destruí-las diretamente, o HIV parece também criar uma situação na qual estes linfócitos T CD4+ parecem estar predispostos a morrer mais do que o normal. Este estudo pretende avaliar esta predisposição, bem como algumas outras características destes linfócitos em seu sangue.

Quem pode participar

Serão convidados a participar pacientes com o HIV que apresentem suspeita de terem se infectado recentemente.

Como será realizado este estudo

Durante o estudo, será colhida uma amostra de 90 ml de sangue (1/3 de um copo de requeijão) em dez ocasiões, com intervalos de três meses, por um período de 2 anos. Estas amostras serão enviadas ao Laboratório de Imunologia da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Escola Paulista de Medicina / Universidade Federal de São Paulo. Lá, serão feitos testes de laboratório para verificar as características de seus linfócitos (aquelas células de defesa), o vírus HIV que está em seu corpo e como suas células combatem algumas partes do vírus.

Além disso, serão realizados testes genéticos do vírus HIV, que dirão qual é o tipo de vírus que você tem e o perfil de resistência aos medicamentos que são usados para o tratamento.

Quantas pessoas participarão

Participarão deste estudo 60 pessoas infectadas pelo HIV com suspeita de infecção recente.

Vantagens e desvantagens de participar neste estudo

Os riscos de participação são mínimos, pois a quantidade de sangue que será colhida é segura. Esta quantidade é menos da metade do sangue que é tirado quando vamos doar sangue. No entanto, podem aparecer alguns efeitos colaterais em consequência da coleta de sangue, como dor no local da picada, ou um pequeno desconforto depois da coleta de sangue. Algumas pessoas podem apresentar a sensação de desmaio ou até mesmo desmaiar. Existe uma possibilidade muito pequena de que a coleta de sangue provoque um grande coágulo (hematoma) ou infecção no local da coleta, mas isto é extremamente raro.

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas de sua participação no estudo, na medida em que esclareçam melhor como o sistema imunológico das pessoas se defende do HIV, poderão beneficiar outras pessoas. Você não receberá nenhuma compensação financeira para participar neste estudo.

Você e seu médico terão acesso a todos os resultados de contagem de vírus no sangue (carga viral do HIV) e contagem de linfócitos T CD4+. Essas informações são importantes para seu médico saber quando você precisa começar a tomar os remédios contra o vírus.

Você e seu médico também terão acesso ao resultado do teste de genotipagem do HIV, que avalia se o vírus está resistente a algum remédio usado para tratar a infecção.

Quem poderá ter acesso aos meus dados e saber que estou neste estudo

Se você concordar em tornar parte deste estudo, seu nome e as informações que você fornecer serão mantidos em sigilo. Somente terão acesso direto aos seus registros médicos e resultados dos testes, os pesquisadores.

T1742(a)15.664(s)-0.310242(a)15.664(s)-0.31(r)-7.21089(m)32.5037(n)-4.34718(t)-2.173596(o)-4.34718(n)

990255.664(l)-18.148742(V)6.0971(.)-2.-278.573

mbém40.346[1(m)32.5037(p)-4.34718()-202.298(d)-18.1485(a)40.34718()-82.2238(c)-0.31.298(a)-4.34718(n)-

Comite de Ética em Pesquisa (CEP) da EPM / UNIFESP – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj. 14, Fone: 5571 1062 / Fax: 5539 7162

Posso recusar-me a participar ou ser solicitado a sair do estudo?

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode decidir não participar ou desistir a qualquer momento. Se você escolher não participar do estudo, o seu atendimento neste e em outros serviços de saúde não serão comprometidos. A sua escolha em participar ou não, deste estudo agora, não impedirá que você venha a participar de outros estudos e pesquisas.

Sua participação poderá ser interrompida pelo responsável pelo estudo, se durante este período de seis meses, algum fato inesperado, como o aparecimento de alguma doença que altere o plano de pesquisa, que foi aqui explicado. Se você quiser deixar o estudo, ou precisar sair, o médico poderá solicitar examiná-lo e realizar alguns exames finais.

Você receberá uma cópia assinada deste consentimento informado

Se você tiver alguma pergunta, fique à vontade para fazê-la. Se você não tiver mais nenhuma dúvida e quiser participar, por favor, assine abaixo. Obrigada.

Nome do Voluntário: _____

Assinatura do Voluntário: _____ **Data:** _____

Assinatura do funcionário que conduziu a revisão do TCLE

_____ **Data:** _____

8 – REFERÊNCIAS

- Ahluwalia, G., Cooney, D.A., Mitsuya, H., Fridland, A., Flora, K.P., Hao, Z., Dalal, M., Broder, S., and Johns, D.G. (1987) Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxyinosine, an inhibitor of HIV infectivity. *Biochem Pharmacol* 36: 3797-3800.
- Alexander, C.S., Dong, W., Chan, K., Jahnke, N., O'Shaughnessy, M.V., Mo, T., Piaseczny, M.A., Montaner, J.S., and Harrigan, P.R. (2001) HIV protease and reverse transcriptase variation and therapy outcome in antiretroviral-naive individuals from a large North American cohort. *Aids* 15: 601-607.
- Ammann, A.J., Cowan, M.J., Wara, D.W., Weintrub, P., Dritz, S., Goldman, H., and Perkins, H.A. (1983) Acquired immunodeficiency in an infant: possible transmission by means of blood products. *Lancet* 1: 956-958.
- Appelt, K., Bacquet, R.J., Bartlett, C.A., Booth, C.L., Freer, S.T., Fuhry, M.A., Gehring, M.R., Herrmann, S.M., Howland, E.F., Janson, C.A., and et al. (1991) Design of enzyme inhibitors using iterative protein crystallographic analysis. *J Med Chem* 34: 1925-1934.
- Arthur, L.O., Bess, J.W., Jr., Sowder, R.C., 2nd, Benveniste, R.E., Mann, D.L., Chermann, J.C., and Henderson, L.E. (1992) Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258: 1935-1938.
- Ayoub, A., Souquieres, S., Njinku, B., Martin, P.M., Muller-Trutwin, M.C., Roques, P., Barre-Sinoussi, F., Mauclore, P., Simon, F., and Nerrienet, E. (2000) HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *Aids* 14: 2623-2625.
- Banda, C.I., Ramos, A., Pieniazek, D., Pascu, R., Tanuri, A., Schochetman, G., and Rayfield, M.A. (1995) Epidemiologic and evolutionary relationships between Romanian and Brazilian HIV-subtype F strains. *Emerg Infect Dis* 1: 91-93.

- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Bennett, R.P., Nelle, T.D., and Wills, J.W. (1993) Functional chimeras of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus gag proteins. *J Virol* 67: 6487-6498.
- Berger, E.A., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Korber, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q.J., Schuitemaker, H., Sodroski, J., and Weiss, R.A. (1998) A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240.
- Birk, M., and Sonnerborg, A. (1998) Variations in HIV-1 pol gene associated with reduced sensitivity to antiretroviral drugs in treatment-naive patients. *Aids* 12: 2369-2375.
- Boletim epidemiológico de AIDS do município de São Paulo. (2004), ano VIII; nº 8.
- Bongertz, V., Bou-Habib, D.C., Brigido, L.F., Caseiro, M., Chequer, P.J., Couto-Fernandez, J.C., Ferreira, P.C., Galvao-Castro, B., Greco, D., Guimaraes, M.L., Linhares de Carvalho, M.I., Morgado, M.G., Oliveira, C.A., Osmanov, S., Ramos, C.A., Rossini, M., Sabino, E., Tanuri, A., and Ueda, M. (2000) HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 184-193.
- 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., and Tanuri, A. (2003) Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *Aids* 17: 1063-1069.

- Briones, C., Perez-Olmeda, M., Rodriguez, C., del Romero, J., Hertogs, K., and Soriano, V. (2001) Primary genotypic and phenotypic HIV-1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 145-150.
- Buchbinder, S.P., Katz, M.H., Hessel, N.A., O'Malley, P.M., and Holmberg, S.D. (1994) Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids* 8: 1123-1128.
- Carr, J.K., Salminen, M.O., Albert, J., Sanders-Buell, E., Gotte, D., Birx, D.L., and McCutchan, F.E. (1998) Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* 247: 22-31.
- Casseb, J., Hong, M.A., Gonzalez, C., Brigido, L.F., Duarte, A.J., and Michael-Hendry, R. (1998) Two variants of HIV-1 B serotype are transmitted heterosexually in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 31: 1243-1246.
- CDC. (2001) Human Immunodeficiency Virus tupe I Organon Teknika Vironosica Less Sensitive EIA, Centers for disease Control Prevation.
- Chen, Z., Li, Y., Schock, H.B., Hall, D., Chen, E., and Kuo, L.C. (1995) Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. *J Biol Chem* 270: 21433-21436.
- Chesebro, B., Nishio, J., Perryman, S., Cann, A., O'Brien, W., Chen, I.S., and Wehrly, K. (1991) Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *J Virol* 65: 5782-5789.
- Cimerman, S. (2002) Avaliação da resposta anti-retroviral com o teste imunoenzimático menos sensível (Elisa Detuned) em pacientes com infecção pelo HIV/AIDS. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo, 76p.
- Coffin, J.M. (1992) Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 176: 143-164.

- Cohen, O.J., and Fauci, A.S. (1998) Host factors that affect sexual transmission of HIV. *Int J Infect Dis* 2: 182-185.
- Connor, R.I., Korber, B.T., Graham, B.S., Hahn, B.H., Ho, D.D., Walker, B.D., Neumann, A.U., Vermund, S.H., Mestecky, J., Jackson, S., Fenamore, E., Cao, Y., Gao, F., Kalams, S., Kunstman, K.J., McDonald, D., McWilliams, N., Trkola, A., Moore, J.P., and Wolinsky, S.M. (1998) Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J Virol* 72: 1552-1576.
- Constantine, N. T., Van der Groen, G., Belsey E. (1994) Sensitivity of HIV antibody assays as determined by Seroconversion panels. *AIDS* 8: 1715-1720.
- D'Souza, M.P., and Harden, V.A. (1996) Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat Med* 2: 1293-1300.
- De Jong, J.J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M., and Goudsmit, J. (1992) Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 66: 6777-6780.
- Debouck, C., Gorniak, J.G., Strickler, J.E., Meek, T.D., Metcalf, B.W., and Rosenberg, M. (1987) Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 8903-8906.
- Deeks, S.G. (2001) International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26 Suppl 1: S25-33.
- Delwart, E.L., Shpaer, E.G., Louwagie, J., McCutchan, F.E., Grez, M., Rubsamen-Waigmann, H., and Mullins, J.I. (1993) Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 262: 1257-1261.

- Descamps, D., Calvez, V., Izopet, J., Buffet-Janvresse, C., Schmuck, A., Colson, P., Ruffault, A., Maillard, A., Masquelier, B., Cottalorda, J., Harzic, M., Brun-Vezinet, F., and Costagliola, D. (2001) Prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naive chronically HIV-infected patients in 1998: a French nationwide study. *Aids* 15: 1777-1782.
- Doms, R.W. (1993) Protein conformational changes in virus-cell fusion. *Methods Enzymol* 221: 61-72.
- Dumans, A.T., Soares, M.A., Pieniazek, D., Kalish, M.L., De Vroey, V., Hertogs, K., and Tanuri, A. (2002) Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naive human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3075-3079.
- Duwe, S., Brunn, M., Altmann, D., Hamouda, O., Schmidt, B., Walter, H., Pauli, G., and Kucherer, C. (2001) Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV-1 among therapy-naive patients of the German Seroconverter Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 266-273.
- Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N.A., Tersmette, M., Huisman, H.G., Miedema, F., and Schuitemaker, H. (1992) Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol* 66: 3183-3187.
- Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., Albright, A.V., Gonzalez-Scarano, F., and Malim, M.H. (1998) Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex. *J Virol* 72: 6004-6013.
- Freed, E.O., and Risser, R. (1991) Identification of conserved residues in the human immunodeficiency virus type 1 principal neutralizing determinant that are involved in fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* 7: 807-811.

- Freed, E.O., and Martin, M.A. (1996) Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* 70: 341-351.
- Frenkel, D., Clark, D.E., Li, J., Murray, C.W., B, R.O., Waszkowycz, B., and Westhead, D.R. (1995) PRO_LIGAND: an approach to de novo molecular design. 4. Application to the design of peptides. *J Comput Aided Mol Des* 9: 213-225.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., Weisman, J.D., Fan, P.T., Wolf, R.A., and Saxon, A. (1981) Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305: 1425-1431.
- Groenink, M., Fouchier, R.A., Broersen, S., Baker, C.H., Koot, M., van't Wout, A.B., Huisman, H.G., Miedema, F., Tersmette, M., and Schuitemaker, H. (1993) Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science* 260: 1513-1516.
- Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J., Jr., Feinberg, J.E., Balfour, H.H., Jr., Deyton, L.R., Chodakewitz, J.A., and Fischl, M.A. (1997) A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* 337: 725-733.
- Hecht, F.M., Grant, R.M., Petropoulos, C.J., Dillon, B., Chesney, M.A., Tian, H., Hellmann, N.S., Bandrapalli, N.I., Digilio, L., Branson, B., and Kahn, J.O. (1998) Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med* 339: 307-311.
- Hirsch, M.S., Conway, B., D'Aquila, R.T., Johnson, V.A., Brun-Vezinet, F., Clotet, B., Demeter, L.M., Hammer, S.M., Jacobsen, D.M., Kuritzkes, D.R., Loveday, C., Mellors, J.W., Vella, S., and Richman, D.D. (1998) Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel. *Jama* 279: 1984-1991.

- Ho, D.D. (1995) HIV-1 dynamics in vivo. *J Biol Regul Homeost Agents* 9: 76-77.
- Horban, A., Stanczak, J.J., Bakowska, E., Tobolewska, E.J., Przybylska-Stengiel, K.J., Stanczak, G.P., and Burkacka, E. (2002) High prevalence of genotypic resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors among therapy-naive individuals from the Warsaw cohort. *Infection* 30: 356-359.
- Hoxie, J.A., Alpers, J.D., Rackowski, J.L., Huebner, K., Haggarty, B.S., Cedarbaum, A.J., and Reed, J.C. (1986) Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science* 234: 1123-1127.
- Hu, W.S., and Temin, H.M. (1990) Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 250: 1227-1233.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D., Jr., Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P., and et al. (1993) Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6320-6324.
- Jacobsen, H., Hanggi, M., Ott, M., Duncan, I.B., Owen, S., Andreoni, M., Vella, S., and Mous, J. (1996) In vivo resistance to a human immunodeficiency virus type 1 proteinase inhibitor: mutations, kinetics, and frequencies. *J Infect Dis* 173: 1379-1387.
- Jaffe, H.W., Bregman, D.J., and Selik, R.M. (1983) Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *J Infect Dis* 148: 339-345.
- Janssen, R.S., Satten, G.A., Stramer, S.L., Rawal, B.D., O'Brien, T.R., Weiblen, B.J., Hecht, F.M., Jack, N., Cleghorn, F.R., Kahn, J.O., Chesney, M.A., and Busch, M.P. (1998) New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *Jama* 280: 42-48.
- Jetzt, A.E., Yu, H., Klarmann, G.J., Ron, Y., Preston, B.D., and Dougherty, J.P. (2000) High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* 74: 1234-1240.

- Katz, R.A., and Skalka, A.M. (1994) The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 63: 133-173.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16: 111-120.
- Kinloch-De Loes, S., Hirschel, B.J., Hoen, B., Cooper, D.A., Tindall, B., Carr, A., Saurat, J.H., Clumeck, N., Lazzarin, A., Mathiesen, L., and et al. (1995) A controlled trial of zidovudine in primary human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 333: 408-413.
- Kohl, N.E., Emini, E.A., Schleif, W.A., Davis, L.J., Heimbach, J.C., Dixon, R.A., Scolnick, E.M., and Sigal, I.S. (1988) Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 4686-4690.
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A., and Steitz, T.A. (1992) Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 256: 1783-1790.
- Kozal, M.J., Shah, N., Shen, N., Yang, R., Fucini, R., Merigan, T.C., Richman, D.D., Morris, D., Hubbell, E., Chee, M., and Gingeras, T.R. (1996) Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* 2: 753-759.
- Kozal M.J., Amico K.R., Chiarella J., Schreiber T., Cornman D., Fisher W., Fisher J., Friedland G. (2004) Antiretroviral resistance and high-risk transmission behavior among HIV-positive patients in clinical care. *AIDS* 16:2185-9.
- Krausslich, H.G., Schneider, H., Zybarth, G., Carter, C.A., and Wimmer, E. (1988) Processing of in vitro-synthesized gag precursor proteins of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by HIV proteinase generated in *Escherichia coli*. *J Virol* 62: 4393-4397.

- Lech, W.J., Wang, G., Yang, Y.L., Chee, Y., Dorman, K., McCrae, D., Lazzeroni, L.C., Erickson, J.W., Sinsheimer, J.S., and Kaplan, A.H. (1996) In vivo sequence diversity of the protease of human immunodeficiency virus type 1: presence of protease inhibitor-resistant variants in untreated subjects. *J Virol* 70: 2038-2043.
- Ledergerber, B., Egger, M., Erard, V., Weber, R., Hirschel, B., Furrer, H., Battegay, M., Vernazza, P., Bernasconi, E., Opravil, M., Kaufmann, D., Sudre, P., Francioli, P., and Telenti, A. (1999) AIDS-related opportunistic illnesses occurring after initiation of potent antiretroviral therapy: the Swiss HIV Cohort Study. *Jama* 282: 2220-2226.
- Levy, J.A. (1993) HIV pathogenesis and long-term survival. *Aids* 7: 1401-1410.
- Lifson, A.R., Buchbinder, S.P., Sheppard, H.W., Mawle, A.C., Wilber, J.C., Stanley, M., Hart, C.E., Hessel, N.A., and Holmberg, S.D. (1991) Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* 163: 959-965.
- Lin, Y., Lin, X., Hong, L., Foundling, S., Henrikson, R.L., Thaisrivongs, S., Leelamanit, W., Ratterman, D., Shah, M., Dunn, B.M., and et al. (1995) Effect of point mutations on the kinetics and the inhibition of human immunodeficiency virus type 1 protease: relationship to drug resistance. *Biochemistry* 34: 1143-1152.
- Little, S.J., Holte, S., Routy, J. P. Daar, E.S. Markowitz, M. Collier, A. C. (2002) Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347: 385-394.
- Loeb, D.D., Hutchison, C.A., 3rd, Edgell, M.H., Farmerie, W.G., and Swanstrom, R. (1989) Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 protease suggests functional homology with aspartic proteinases. *J Virol* 63: 111-121.
- Loveday, C. (2001) International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26 Suppl 1: S10-24.

- Machado, D.M., Delwart, E.L., Diaz, R.S., de Oliveira, C.F., Alves, K., Rawal, B.D., Sullivan, M., Gwinn, M., Clark, K.A., and Busch, M.P. (2002) Use of the sensitive/less-sensitive (detuned) EIA strategy for targeting genetic analysis of HIV-1 to recently infected blood donors. *Aids* 16: 113-119.
- Magiorkinis, E., Paraskevis, D., Magiorkinis, G., Chryssou, S., Chini, M., Lazanas, M., Pappas, V., Saroglou, G., Antoniadou, A., Giamarellou, E., Karafoulidou, A., and Hatzakis, A. (2002) Mutations associated with genotypic resistance to antiretroviral therapy in treatment naive HIV-1 infected patients in Greece. *Virus Res* 85: 109-115.
- Manchester, M., Everitt, L., Loeb, D.D., Hutchison, C.A., 3rd, and Swanstrom, R. (1994) Identification of temperature-sensitive mutants of the human immunodeficiency virus type 1 protease through saturation mutagenesis. Amino acid side chain requirements for temperature sensitivity. *J Biol Chem* 269: 7689-7695.

- McCusker, J., Willis, G., Vickers-Lahti, M., and Lewis, B. (1998) Readmissions to drug abuse treatment and HIV risk behavior. *Am J Drug Alcohol Abuse* 24: 523-540.
- McFarland, W., Busch, M.P., Kellogg, T.A., Rawal, B.D., Satten, G.A., Katz, M.H., Dilley, J., and Janssen, R.S. (1999) Detection of early HIV infection and estimation of incidence using a sensitive/less-sensitive enzyme immunoassay testing strategy at anonymous counseling and testing sites in San Francisco. *J Acquir Immune Defic Syndr* 22: 484-489.
- Mildvan, D., Mathur, U., Enlow, R.W., Romain, P.L., Winchester, R.J., Colp, C., Singman, H., Adelsberg, B.R., and Spigland, I. (1982) Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann Intern Med* 96: 700-704.
- Milich, L., Margolin, B., and Swanstrom, R. (1993) V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* 67: 5623-5634.
- Miller, M.D., Farnet, C.M., and Bushman, F.D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71: 5382-5390.

- IMorgado, M.G., Sabino, E.C., Shpaer, E.G., Bongertz, V., Brigido, L., Guimaraes, M.D., Castilho, E.A., Galvao-castro, B., Mullins, J.I., and Hendry, R.M. (1994) V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American / European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10: 569-576.
- Najera, I., Holguin, A., Quinones-Mateu, M.E., Munoz-Fernandez, M.A., Najera, R., Lopez-Galindez, C., and Domingo, E. (1995) Pol gene quasiespecies of human immunodeficiency virus: mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. *J Virol* 69: 23-31.
- Negroni, M., and Buc, H. (2001) Retroviral recombination: what drives the switch? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 151-155.
- Nielsen, C., Pedersen, C., Lundgren, J.D., and Gerstoft, J. (1993) Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *Aids* 7: 1035-1040.
- Oleske, J., Minnefor, A., Cooper, R., Jr., Thomas, K., dela Cruz, A., Ahdieh, H., Guerrero, I., Joshi, V.V., and Desposito, F. (1983) Immune deficiency syndrome in children. *Jama* 249: 2345-2349.
- Peeters, M., Gueye, A., Mboup, S., Bibollet-Ruche, F., Ekaza, E., Mulanga, C., Ouedrago, R., Gandji, R., Mpele, P., Dibanga, G., Koumare, B., Saidou, M., Esu-Williams, E., Lombart, J.P., Badombena, W., Luo, N., Vanden Haesevelde, M., and Delaporte, E. (1997) Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *Aids* 11: 493-498.
- Peeters, M., and Sharp, P.M. (2000) Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *Aids* 14 Suppl 3: S129-140.
- Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., and Ho, D.D. (1996) HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271: 1582-1586.

- Perno, C.F., Cozzi-Lepri, A., Balotta, C., Bertoli, A., Violin, M., Monno, L., Zauli, T., Montroni, M., Ippolito, G., and d'Arminio-Monforte, A. (2002) Low prevalence of primary mutations associated with drug resistance in antiviral-naive patients at therapy initiation. *Aids* 16: 619-624.
- Pieniazek, D., Peralta, J.M., Ferreira, J.A., Krebs, J.W., Owen, S.M., Sion, F.S., Filho, C.F., Sereno, A.B., De Sa, C.A., and Weniger, B.G. (1991) Identification of mixed HIV-1 / HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. *Aids* 5: 1293-1299.
- Pires, I.L., Soares, M.A., Speranza, F.A., Ishii, S.K., Vieira, M.C., Gouvea, M.I., Guimaraes, M.A., de Oliveira, F.E., Magnanini, M.M., Brindeiro, R.M., and Tanuri, A. (2004) 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. *J Clin Microbiol* 42: 426-430.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.A., Ratner, L., Lane, C.M., Moore, M.S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998) Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17: 909-917.
- Potts, K.E., Kalish, M.L., Lott, T., Orloff, G., Luo, C.C., Bernard, M.A., Alves, C.B., Badaro, R., Suleiman, J., and Ferreira, O. (1993) Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *Aids* 7: 1191-1197.
- Quinones-Mateu, M.E and Arts, E.J. (1999) Recombination in HIV-1: Update and implications. *AIDS Reviews* 1: 89-100.
- Quinones-Mateu, M.E., Gao, Y., Ball, S.C., Marozsan, A.J., Abraha, A., and Arts, E.J. (2002) In vitro intersubtype recombinants of human immunodeficiency virus type 1: comparison to recent and circulating in vivo recombinant forms. *J Virol* 76: 9600-9613.
- Rawal, B.D., Degula, A., Lebedeva, L., Janssen, R.S., Hecht, F.M., Sheppard, H.W., and Busch, M.P. (2003) Development of a new less-sensitive enzyme immunoassay for detection of early HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33: 349-355.

- Reich, S.H., Melnick, M., Davies, J.F., 2nd, Appelt, K., Lewis, K.K., Fuhry, M.A., Pino, M., Trippe, A.J., Nguyen, D., Dawson, H., and et al. (1995) Protein structure-based design of potent orally bioavailable, nonpeptide inhibitors of human immunodeficiency virus protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3298-3302.
- Ristig, M.B., Arens, M.Q., Kennedy, M., Powderly, W., and Tebas, P. (2002) Increasing prevalence of resistance mutations in antiretroviral-naive individuals with established HIV-1 infection from 1996-2001 in St. Louis. *HIV Clin Trials* 3: 155-160.
- Roberts, N.A., Martin, J.A., Kinchington, D., Broadhurst, A.V., Craig, J.C., Duncan, I.B., Galpin, S.A., Handa, B.K., Kay, J., Krohn, A., and et al. (1990) Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 248: 358-361.
- Robertson, D.L., Sharp, P.M., McCutchan, F.E., and Hahn, B.H. (1995) Recombination in HIV-1. *Nature* 374: 124-126.
- Roos, M.T., Lange, J.M., de Goede, R.E., Coutinho, R.A., Schellekens, P.T., Miedema, F., and Tersmette, M. (1992) Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 165: 427-432.
- Ross, L., Johnson, M., DeMasi, R., Liao, Q., Graham, N., Shaefer, M., and St Clair, M. (2000) Viral genetic heterogeneity in HIV-1-infected individuals is associated with increasing use of HAART and higher viremia. *Aids* 14: 813-819.
- Rossini, M.A., Diaz, R.S., Caseiro, M., Turcato, G., Accetturi, C.A., and Sabino, E.C. (2001) HIV-1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in Sao Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 34: 45-47.
- Rutherford, G.W., Lifson, A.R., Hessel, N.A., Darrow, W.W., O'Malley, P.M., Buchbinder, S.P., Barnhart, J.L., Bodecker, T.W., Cannon, L., Doll, L.S., and et al. (1990) Course of HIV-I infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study. *Bmj* 301: 1183-1188.

- Sabino, E.C., Diaz, R.S., Brigido, L.F., Learn, G.H., Mullins, J.I., Reingold, A.L., Duarte, A.J., Mayer, A., and Busch, M.P. (1996) Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in Sao Paulo City, Brazil. *Aids* 10: 1579-1584.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 106-425.
- Schacker, T., Collier, A.C., Hughes, J., Shea, T., and Corey, L. (1996) Clinical and epidemiologic features of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 125: 257-264.
- Schubert, U., Anton, L.C., Bacik, I., Cox, J.H., Bour, S., Bennink, J.R., Orłowski, M., Strebel, K., and Yewdell, J.W. (1998) CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* 72: 2280-2288.
- Siegal, F.P., Lopez, C., Hammer, G.S., Brown, A.E., Kornfeld, S.J., Gold, J., Hassett, J., Hirschman, S.Z., Cunningham-Rundles, C., Adelsberg, B.R., and et al. (1981) Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med* 305: 1439-1444.
- Simon, F., Mauclore, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Muller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barre-Sinoussi, F., and Brun-Vezinet, F. (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med* 4: 1032-1037.
- 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., and Tanuri, A. (2003) A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *Aids* 17: 11-21.
- Soriano, V. (2001) Sequencing antiretroviral drugs. *Aids* 15:547-551.

- Soriano, V., Maria Miro, J., and Guerrero, A. (2001) Primary resistance to antiretroviral agents]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 19: 22-25.
- Sucupira, M. C. A. (2002) Diversidade genética da região V3 da gp120 e das regiões da protease e transcriptase reversa do HIV-1. Comparação entre o perfil viral presente em indivíduos com infecção recente e indivíduos com infecção estabelecida atendidos entre 199 e 2001 no centro de Testagem e Aconselhamento de Santos, SP. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, 74p.
- Tamalet, C., Pasquier, C., Yahi, N., Colson, P., Poizot-Martin, I., Lepeu, G., Gallais, H., Massip, P., Puel, J., and Izopet, J. (2000) Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV-1 infection. *J Med Virol* 61: 181-186.
- Tambussi, G., Boeri, E., Carrera, P., Gianotti, N., and Lazzarin, A. (1998) Prevalence of mutation associated to resistance with nucleoside analogues in a cohort of naive HIV-1 positive subjects during the period 1984-1997. *J Biol Regul Homeost Agents* 12: 32-34.
- Tang, J.W., and Pillay, D. (2004) Transmission of HIV-1 drug resistance. *J Clin Virol* 30: 1-10.
- Tanuri, A., Swanson, P., Devare, S., Berro, O.J., Savedra, A., Costa, L.J., Telles, J.G., Brindeiro, R., Schable, C., Pieniazek, D., and Rayfield, M. (1999) HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20: 60-66.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Triques, K., Bourgeois, A., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Mulanga-Kabeya, C., Nzilambi, N., Torimiro, N., Saman, E., Delaporte, E., and Peeters, M. (2000) Near-full-length genome sequencing of divergent African HIV type 1 subtype F viruses leads to the

identification of a new HIV type 1 subtype designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 139-151.

Turner, B.G., and Summers, M.F. (1999) Structural biology of HIV. *J Mol Biol* 285: 1-32.

UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance. (2001) Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infections in the United Kingdom. *Bmj* 322:1087-1088.

UNAIDS/WHO. (2001) Aids epidemic update, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization.

Vella, S., and Palmisano, L. (2000) Antiretroviral therapy: state of the HAART. *Antiviral Res* 45: 1-7.

Vicente, A.C., Otsuki, K., Silva, N.B., Castilho, M.C., Barros, F.S., Pieniazek, D., Hu, D., Rayfield, M.A., Bretas, G., and Tanuri, A. (2000) The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 327-331.

Violin, M., Forbici, F., Cozzi-Lepri, A., Velleca, R., Bertoli, A., Riva, C., Giannella, S., Manconi, P.E., Lazzarin, A., Pasquinucci, S., Tacconi, L., Carnevale, G., Mazzotta, F., Bonazzi, L., Montroni, M., Chirianni, A., Capobianchi, M., Ippolito, G., Moroni, M., Perno, C.F., and D'Arminio-Monforte, A. (2002) Primary HIV-1 resistance in recently and chronically infected individuals of the Italian Cohort Naive for Antiretrovirals. *J Biol Regul Homeost Agents* 16: 37-43.

Vodicka, M.A., Koepf, D.M., Silver, P.A., and Emerman, M. (1998) HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12: 175-185.

Wang, C.T., and Barklis, E. (1993) Assembly, processing, and infectivity of human i-4.3484(i)-18.1485(n)-4.3484(a)-4.34596(n).7034(l)1.86395(i)-242.323(o)-4.3484(f)-2i84(v)19.70

- Wegner, S.A., Brodine, S.K., Mascola, J.R., Tasker, S.A., Shaffer, R.A., Starkey, M.J., Barile, A., Martin, G.J., Aronson, N., Emmons, W.W., Stephan, K., Bloor, S., Vingerhoets, J., Hertogs, K., and Larder, B. (2000) Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naive HIV-1 infected US military personnel. *Aids* 14: 1009-1015.
- Weinstock, H., Respess, R., Heneine, W., Petropoulos, C.J., Hellmann, N.S., Luo, C.C., Pau, C.P., Woods, T., Gwinn, M., and Kaplan, J. (2000) Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drug susceptibility among human immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. *J Infect Dis* 182: 330-333.
- Wlodawer, A., and Erickson, J.W. (1993) Structure-based inhibitors of HIV-1 protease. *Annu Rev Biochem* 62: 543-585.
- Wolfs, T.F., Zwart, G., Bakker, M., Valk, M., Kuiken, C.L., and Goudsmit, J. (1991) Naturally occurring mutations within HIV-1 V3 genomic RNA lead to antigenic variation dependent on a single amino acid substitution. *Virology* 185: 195-205.
- Zhang, Y.M., Imamichi, H., Imamichi, T., Lane, H.C., Falloon, J., Vasudevachari, M.B., and Salzman, N.P. (1997) Drug resistance during indinavir therapy is caused by mutations in the protease gene and in its Gag substrate cleavage sites. *J Virol* 71: 6662-6670.

ABSTRACT

The Serological Testing Algorithm for Recent HIV Infection (STARHS) has enabled us to detect recent HIV infection (infection acquired in the last 6 months). 810 samples from individuals attended at the Counseling and Testing sites of Sao Paulo were evaluated by this methodology in samples collected between June 2002 and March 2003. 27 individuals were detected with recent infection, composing the so called recently infected group (RI), and this group was compared with a group of 28 individuals with long term infection, composing the so called established infection group (EI), all antiretroviral naïve in both groups. *pol* gene and V3 region of gp120 gene were analyzed by sequencing followed by phylogenetic analyses. Clade assignment revealed that clade B was found more frequently, followed by clade F, and clade C. Among clade B viruses, the most frequently encountered motif at the tip of the V3 loop was the GPGR (RI = 27.3%; EI = 36.9%), followed by the GWGR (RI = 27.3%; EI = 31.3%). We found 8.3% and 3.8% of primary resistance to protease inhibitors in the RI and EI groups respectively, and 20.8% and 7.7% of primary resistance to reverse transcriptase inhibitors in the RI and EI respectively, thus confirming transmission of antiretroviral resistant HIV-1.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)