

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Oswaldo Cruz**

**Departamento de Medicina Tropical**

Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) em  
Municípios do Interior do Estado do Rio de Janeiro, com Ênfase nas Cidades de Miracema,  
Santo Antonio de Pádua e Saquarema, 2001 a 2006

Walter de Araujo Eyer-Silva

Tese apresentada à coordenação  
do Curso de Pós-graduação em  
Medicina Tropical do Instituto  
Oswaldo Cruz como requisito  
para a obtenção do grau de  
Doutor em Medicina, área de  
concentração Medicina Tropical.

### **Orientação**

Profa. Dra. Mariza Gonçalves Morgado

Laboratório de Aids & Imunologia Molecular

Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro - RJ

Junho de 2007

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Esta tese intitulada

**Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1)  
em Municípios do Interior do Estado do Rio de Janeiro, com Ênfase nas Cidades  
de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, 2001 a 2006**

de autoria de

***Walter A. Eyer-Silva***

foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

**Prof. Hermann Gonçalves Schatzmayr (Presidente)**

**Prof. Luiz Roberto Castello-Branco**

**Prof. Amílcar Tanuri**

**Prof<sup>a</sup>. Ana Teresa Dumans**

**Prof. Luiz Carlos Júnior Alcântara**

Tese defendida e aprovada em 25 de junho de 2007

## Ficha Catalográfica

Eyer-Silva, Walter A.

Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1) em Municípios do Interior do Estado do Rio de Janeiro, com Ênfase nas Cidades de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, 2001 a 2006

240 Páginas

Tese: doutorado em Medicina Tropical

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 2007

Orientação: Mariza G. Morgado

1. Brasil; 2. epidemiologia molecular; 3. HIV-1; 4. resistência anti-retroviral; 5. Rio de Janeiro; 6. terapia anti-retroviral.

*Para Isabela e Gabriela,  
Rainha e Princesa,  
Que me guiam e protegem*

*Tolhido pelas minhas limitações, este trabalho é uma singela homenagem aos professores*

***Antar Padilha-Gonçalves e Luis Carlos de Brito Lyra,***

*in memoriam*

*e também aos professores*

***Mariza Gonçalves Morgado,***

***Carlos Alberto Basílio de Oliveira,***

***Carlos Alberto Moraes de Sá,***

***Jorge Francisco da Cunha Pinto***

***e Marcio Neves Bóia***

a quem muito devo pelo convívio e conversas iluminadoras

*Para ensinar, sempre é necessário amar e saber*

*pois quem não ama não quer*

*e quem não sabe não pode.*

Pe. Antonio Vieira (1608-1697), *Sermão do Espírito Santo*

### *Agradecimentos*

Aos pacientes que contribuíram com amostras de sangue para estes estudos, minha infinita gratidão. Absolutamente todos os pacientes convidados prontamente concordaram em participar;

Este trabalho não se tornaria realidade sem o apoio e a amizade da equipe do *Laboratório de Aids & Imunologia Molecular* do IOC, Fiocruz (RJ). Entre tantos outros, não posso deixar de agradecer a Aline, Caio, Carlos Silva-de-Jesus, Carlos, Carmen, Deyse, Gonzalo, José Antonio, José Carlos, Mariza, Monick, Rafael, Roberta, Saada, Sylvia e Vera;

A todo o staff do *Ambulatório de Alergia & Imunologia Clínica* do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Devo especial agradecimento a Adilson, Albertina, Carlos Alberto, Dário, Eliane, Fernando Ferry, Fernando Sion, Ivete, Jorge Francisco, Luis, Marcelo, Marilza, Martha, Ricardo, Rogério e Ronaldo;

Aos profissionais da área de saúde dos municípios de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, cuja abnegação tornou possível este trabalho;

A Sebastião Marcos dos Reis, que sabe tudo e mais um pouco sobre Miracema e sobre muitas outras coisas legais;

Aos professores Luiz Carlos Alcântara, Flora Fernandes, Túlio de Oliveira, Anne-Mieke Vandamme, Sonia Van Dooren, Bernardo Galvão-Castro e Marcelo Soares, por me darem a oportunidade de participar dos inesquecíveis simpósios *Treinamento em*

*Bioinformática e Análises Genéticas e Evolutivas Virais, Estudos Avançados em Bioinformática e Análises Evolutivas Virais e Segundo Workshop Brasileiro em Evolução Viral e Epidemiologia Molecular*, hospedados pelo Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz (CPqGM), Fiocruz (BA), e patrocinados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e pelo Programa Nacional de DST/Aids do Ministério da Saúde; e do *11<sup>th</sup> International Workshop on Virus Evolution and Molecular Epidemiology*, organizado pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela Katholieke Universiteit Leuven e pelo Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis (RJ);

Aos professores da Escola Nacional de Saúde Pública, em especial a Marília Sá Carvalho e Valeska Lima Andreozzi, pelas excelentes aulas de estatística;

Aos meus pais e avós, os melhores do mundo.



*Não vimos o traço superior do acontecimento. (...) Não entendemos a mensagem eloqüente.*

Euclides da Cunha, em *Os Sertões – Campanha de Canudos*

*O que os portugueses instauraram no Brasil foi, sem dúvida,  
uma civilização de raízes rurais.*

Sérgio Buarque de Holanda, em *Raízes do Brasil*

*A satisfação de realizar, por mais humilde que seja a esfera de cada um, uma parcela de  
bem para outrem, (...), é uma alegria intensa que apaga por si só a lembrança das privações  
pessoais.*

Joaquim Nabuco, em *Minha Formação*

## Índice

<b>Lista de Figuras</b> .....	XII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	XIII
<b>Lista de Siglas e Abreviaturas</b> .....	XVI
<b>Resumo</b> .....	XVI
<b>Abstract</b> .....	XVIII
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
Os agentes etiológicos da Aids .....	2
Epidemiologia molecular do HIV-1 .....	5
A Aids no mundo .....	8
A Aids no Brasil .....	8
A interiorização da epidemia de Aids no país .....	9
A filogenia como ferramenta para o estudo da interiorização da epidemia de Aids no Brasil .	12
Resistência primária e secundária do HIV-1 no Brasil .....	14
<b>Objetivo geral</b> .....	20
<b>Objetivos específicos</b> .....	20
<b>METODOLOGIA</b> .....	21
Os municípios do presente estudo .....	21
Miracema .....	21
Santo Antonio de Pádua .....	22
Saquarema .....	23
Outros municípios .....	26
Coleta de informações clínicas e epidemiológicas .....	26
O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 e seu estágio clínico .....	27
A coleta das amostras de sangue .....	27
A extração do DNA .....	27
A reação da polimerase em cadeia, aninhada .....	28
A purificação do produto final de amplificação .....	30
A reação de seqüenciamento .....	30
Genotipagem do HIV-1 RNA recuperado do compartimento plasmático .....	31
Seqüenciamento de genoma completo .....	32
A análise e edição das seqüências .....	32
Controle de qualidade das seqüências .....	32
Análise filogenética .....	33
Representação gráfica de redes filogenéticas com o <i>splitstree</i> .....	35
Análises bayesianas de coalescência .....	35

Estimativa da susceptibilidade aos anti-retrovirais .....	36
Análises estatísticas .....	37
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	39
Características gerais da casuística dos três municípios .....	39
Epidemiologia molecular do HIV-1 no interior do estado do Rio de Janeiro .....	42
Totalização das amostras .....	42
Distribuição de subtipos .....	42
Ocorrência de clusters monofiléticos .....	49
Comparação dos resultados dos estudos filogenéticos do envelope e da polimerase na casuística de Miracema .....	51
Inter-relações filogenéticas entre clusters de municípios vizinhos .....	55
Estimativa bayesiana da data em que existiram os ancestrais comuns mais recentes das variantes de subtipo B que desencadearam as duas maiores redes de transmissão em Miracema .....	58
Variáveis independentemente associadas aos clusters filogenéticos .....	58
Estudo genético das seqüências geradas da amostra 04BRSAP19 (subtipo D) .....	59
Estudo filogenético dos recombinantes BF1 .....	66
Resistência genotípica aos anti-retrovirais nas casuísticas dos três municípios .....	72
Balanço geral da prevalência de mutações associadas a resistência e predição da susceptibilidade genotípica das variantes descritas no estudo .....	72
Registro dos polimorfismos e mutações em códons associados a resistência .....	80
Mutações secundárias no gene da protease em pacientes virgens de tratamento .....	83
Sucesso do esquema anti-retroviral .....	83
<b>DISCUSSÃO</b> .....	85
<b>CONCLUSÕES</b> .....	105
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	110
<b>ANEXOS</b> .....	137
<b><u>ANEXO 1:</u></b> Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	138
<b><u>ANEXO 2:</u></b> Questionário do Estudo Clínico e Epidemiológico da Infecção pelo HIV-1 .....	139
<b><u>ANEXO 3:</u></b> Lista de artigos que compõem esta tese (publicados, aprovados ou submetidos para publicação) .....	141
<b><u>ANEXO 3A:</u></b> HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. <i>Rev Saúde Pública</i> . 2005;39(6):950-5 .....	143
<b><u>ANEXO 3B:</u></b> A genotyping study of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in a small Brazilian municipality. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> . 2005;100(8):869-73 .....	150

<b><u>ANEXO 3C:</u></b> Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. <i>AIDS Res Hum Retroviruses</i> . 2006;22(2):207-11 .....	156
<b><u>ANEXO 3D:</u></b> Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. <i>J Acquir Immune Defic Syndr</i> . 2006;41(5):664-70.....	162
<b><u>ANEXO 3E:</u></b> Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio de Janeiro State, Brazil. <i>AIDS Res Hum Retroviruses</i> . 2007;23(2):303-8 .....	170
<b><u>ANEXO 3F:</u></b> Molecular evidence that human immunodeficiency virus type 1 dissemination in a small Brazilian city was already taking place in the early 1990s. <i>Mem Inst Oswaldo Cruz</i> 2007;102(5), no prelo .....	177
<b><u>ANEXO 3G:</u></b> Epidemiologic features of HIV infection in 3 cities of inner Rio de Janeiro State, Brazil. <i>Rev Inst Med Trop São Paulo</i> 2007, no prelo .....	181
<b><u>ANEXO 3H:</u></b> Autochthonous horizontal transmission of a CRF02_AG strain revealed by an HIV-1 diversity survey in a small city in inner Rio de Janeiro State, Southeast Brazil. <i>Submetido para publicação</i> .....	198
<b><u>ANEXO 3I:</u></b> Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-naïve and experienced patients from resource-limited settings with universal access to antiretroviral therapy: a survey in two small Brazilian cities. <i>Submetido para publicação</i> .....	220

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b>	Mapa dos municípios de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema .....	25
<b>Figura 2:</b>	Estudo filogenético das seqüências de polimerase geradas da casuística de Saquarema	45
<b>Figura 3:</b>	Estudo filogenético das polimerases geradas da casuística de Santo Antonio de Pádua e de 26 municípios não metropolitanos adicionais do estado do Rio de Janeiro .....	47
<b>Figura 4:</b>	Mapa das sub-regiões do estado do Rio de Janeiro.....	50
<b>Figura 5:</b>	Estudo filogenético das seqüências de envelope (5A) e polimerase (5B) geradas da casuística de Miracema .....	52
<b>Figura 6:</b>	Estudo filogenético das seqüências de polimerase representativas do subtipo B das casuísticas dos municípios vizinhos de Miracema e Santo Antonio de Pádua .....	56
<b>Figura 7:</b>	Estudo filogenético do genoma completo da seqüência 96BRRJ100 .....	60
<b>Figura 8:</b>	Estudo filogenético de cinco seqüências brasileiras representativas do subtipo D .....	63
<b>Figura 9:</b>	Estudo filogenético da seqüência não-autóctone 98BRRJ045 .....	65
<b>Figura 10:</b>	Estudo filogenético das seqüências de polimerase recombinantes inter-subtipo BF1 ....	68
<b>Figura 11:</b>	Representação gráfica obtida pelo <i>splitstree</i> das redes filogenéticas geradas pelo genoma completo de quatro seqüências com o mesmo perfil de recombinação BF1 .....	70
<b>Figura 12:</b>	Representação gráfica da estrutura recombinante do genoma completo 04BRSQ-46 ....	71

**Lista de Tabelas**

<b>Tabela 01:</b>	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação das regiões parciais dos genes do envelope e da polimerase .....	31
<b>Tabela 02:</b>	Dados demográficos, clínicos, epidemiológicos e comportamentais .....	41
<b>Tabela 03:</b>	Distribuição de subtipos de seqüências geradas de amostras de 221 pacientes .....	44
<b>Tabela 04:</b>	Subtipos não-B no universo de 221 amostras .....	44
<b>Tabela 05:</b>	Amostras que geraram seqüências filogeneticamente relacionadas .....	51
<b>Tabela 06:</b>	Estimativa das datas em que existiram os ancestrais comuns mais recentes dos dois principais clusters monofiléticos de Miracema .....	58
<b>Tabela 07:</b>	Prevalência de polimorfismos e/ou mutações associadas a resistência aos anti-retrovirais	74
<b>Tabela 08:</b>	Prevalência de resistência aos anti-retrovirais .....	74
<b>Tabela 09:</b>	Dados clínicos, epidemiológicos e virológicos dos pacientes em tratamento.....	75
<b>Tabela 10:</b>	Dados clínicos, epidemiológicos e virológicos dos pacientes previamente expostos aos anti-retrovirais .....	78
<b>Tabela 11:</b>	Dados clínicos, epidemiológicos e virológicos dos pacientes virgens de tratamento e cuja genotipagem mostrou a presença de mutações associadas a diminuição da sensibilidade aos anti-retrovirais .....	79
<b>Tabela 12:</b>	Freqüência de cada mutação associada a resistência aos anti-retrovirais .....	82
<b>Tabela 13</b>	Associação entre a interpretação do algoritmo de sensibilidade e a carga viral plasmática	84

## Lista de Siglas e Abreviaturas

<b>ABC</b>	abacavir
<b>3TC</b>	lamivudina
<b>Aids</b>	síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>BLAST</b>	Ferramenta de busca em linha; do inglês, <i>basic local alignment search tool</i>
<b>CAEV</b>	Vírus da artrite e encefalite caprina
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CRF</b>	Forma recombinante circulante; do inglês, <i>circulating recombinant form</i>
<b>CV</b>	carga viral plasmática do HIV-1
<b>D4T</b>	estavudina
<b>DDI</b>	didanosina
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>EFV</b>	efavirenz
<b>EIAV</b>	vírus da anemia infecciosa equina
<b>env</b>	gene do envelope do HIV-1
<b>ESS</b>	do inglês, <i>effective sampling size</i>
<b>FeLV</b>	vírus da leucemia felina
<b>FIV</b>	vírus da imunodeficiência felina
<b>gag</b>	gene <i>gag</i> (group-specific antigen) do HIV-1
<b>GTR</b>	do inglês, <i>general time-reversible</i> (modelo de substituição nucleotídica)
<b>GTR+I+G</b>	Modelo GTR com variação ao longo dos sítios seguindo distribuição gama e fração de sítios invariáveis
<b>HCV</b>	vírus da hepatite C
<b>HIV</b>	vírus da imunodeficiência humana
<b>HIV-1</b>	vírus da imunodeficiência humana tipo 1
<b>HIV-2</b>	vírus da imunodeficiência humana tipo 2
<b>HKY</b>	Hasegawa, Kishino e Yano (modelo de substituição nucleotídica)
<b>HTLV-I</b>	vírus T-linfotrópico humano tipo I
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>IDV</b>	indinavir
<b>ILD</b>	inferior ao limite de detecção
<b>IPEA</b>	Instituto de Pesquisas Econômicas e Aplicadas
<b>LPV</b>	co-formulação de lopinavir e ritonavir
<b>MCMC</b>	<i>Markov chain Monte Carlo</i> (algoritmo estocástico de coleta de amostras de uma distribuição posterior)
<b>MLV</b>	vírus da leucemia murina
<b>nef</b>	gene <i>nef</i> ( <i>negative factor</i> ) do HIV-1

<b>NFV</b>	nelfinavir
<b>NVP</b>	nevirapina
<b>NJ</b>	do inglês, <i>neighbor-joining</i> (algoritmo de reconstrução de árvores filogenéticas)
<b>OR</b>	do inglês, <i>odds ratio</i> (razão de chance)
<b>PAUP*</b>	<i>Phylogenetic analysis under parsimony *and other methods</i> (programa de filogenia)
<b>PCR</b>	reação da polimerase em cadeia
<b><i>pol</i></b>	gene da polimerase do HIV-1
<b>PTV</b>	profilaxia de transmissão vertical
<b>PR</b>	protease
<b>RENAGENO</b>	Rede Nacional de Genotipagem do HIV-1
<b>RNA</b>	ácido ribonucléico
<b>RSV</b>	Vírus do sarcoma de Rous
<b>RTV</b>	ritonavir
<b>SQV</b>	saquinavir
<b>TAM</b>	mutação associada aos análogos de timidina
<b><i>tat</i></b>	gene <i>tat</i> ( <i>transcriptor activator</i> ) do HIV-1
<b>TR</b>	transcriptase reversa
<b>TVM</b>	do inglês, <i>transversion model</i> , modelo de substituição nucleotídica
<b>TVM+I+G</b>	Modelo TVM com variação ao longo dos sítios seguindo distribuição gama e fração de sítios invariáveis
<b>ZDV</b>	zidovudina



## RESUMO

Embora conserve um perfil epidemiológico predominantemente associado aos grandes centros urbanos do país, a epidemia de Aids vem se expandindo em direção aos pequenos municípios e ao interior do Brasil. A disseminação da epidemia em direção a esses locais trará consigo enormes desafios de ordem médica, social e logística. Embora os dados epidemiológicos do Ministério da Saúde apontem para a interiorização da epidemia de Aids no Brasil, muito pouco se sabe sobre suas características clínicas, epidemiológicas e virológicas. Tendo como alvo, sobretudo, os genes do envelope e da polimerase, buscamos, no conjunto de estudos que compõem esta tese, extrair das seqüências de HIV-1 informações nucleotídicas que nos permitam começar a caracterizar a diversidade genética, a epidemiologia molecular e o perfil de resistência genotípica aos fármacos anti-retrovirais no interior do estado do Rio de Janeiro. Não sendo possível nos deter detalhadamente em todas as cidades do interior do estado, concentramos nossa lupa de investigação em três cidades escolhidas como amostragem de conveniência: Miracema e Santo Antonio de Pádua, no noroeste fluminense, e Saquarema, na Costa do Sol. Destas casuísticas, poderemos talvez extrair informações que sejam úteis à compreensão de aspectos importantes da interiorização da epidemia de Aids no estado do Rio de Janeiro e no país. Entre julho de 1999 e maio de 2006, um total de 208 pacientes adultos recebeu atenção médica nos programas municipais de HIV-1/Aids das três cidades. Obtivemos um perfil de epidemia heterossexual, com uma razão de sexos homem-mulher de 1,1. Quase 60% dos pacientes iniciaram acompanhamento em estágios avançados de infecção pelo HIV-1, o que sugere a existência de um grande reservatório de casos não diagnosticados na comunidade. O sexo masculino e a idade mais avançada mostraram-se variáveis independentemente associadas a um diagnóstico de estágio clínico definidor de Aids quando da apresentação. Mais de 90% dos casos eram de pessoas residentes nas cidades em estudo, o que demonstra uma grande demanda local por serviços de aconselhamento, testagem e tratamento da infecção pelo HIV-1 e suas complicações. Dessa forma, acreditamos que o estabelecimento do maior número possível de programas municipais de HIV-1/Aids será parte importante da luta contra a interiorização da epidemia no Brasil. Registramos ainda uma baixa freqüência de circuncisão masculina, um importante determinante da transmissão heterossexual do HIV-1. Cerca de um quarto da casuística referiu uso prévio de cocaína inalada. Nas duas cidades do noroeste do estado, registramos que 14,5% dos pacientes em estágio C do CDC desenvolveram meningoencefalite por *Cryptococcus neoformans*. Para as análises de epidemiologia molecular, tivemos ainda oportunidade de estudar casos isolados de outros 26 municípios não metropolitanos do estado. Geramos seqüências de HIV-1 de amostras colhidas de um total de 221 pacientes e registramos a ocorrência dos subtipos B em 190 (86%), F1 em 14 (6,3%), CRF02\_AG em duas (0,9%), D em duas (0,9%), além de variantes recombinantes intersubtipo com regiões representativas dos subtipos B e F1 em 13 (5,9%) amostras. Embora os subtipos B e F1 sejam os mais prevalentes no sudeste do Brasil, as variantes D e CRF02\_AG haviam sido até então descritas apenas em casos isolados na capital fluminense. Apresentamos ainda a primeira evidência molecular de transmissão autóctone do subtipo CRF02\_AG no Brasil. A análise filogenética das seqüências do subtipo D, estudada em conjunto com outras seqüências deste subtipo identificadas em nosso laboratório, demonstrou que as seqüências autóctones brasileiras guardam grande similaridade genética com seqüências deste subtipo descritas ao longo da década de 1980 na África do Sul, um país onde esta variante ocorre apenas em casos isolados. Nossos resultados sugerem a introdução bem sucedida desta variante no sudeste brasileiro a partir do efeito fundador de uma seqüência ancestral de provável origem sul-africana. Observamos na casuística de Saquarema a presença de uma variante BF1 cujo genoma completo forma, em conjunto com outras três seqüências oriundas

de diferentes estudos em curso em nosso laboratório, um cluster candidato a um novo CRF\_BF brasileiro. Os estudos de eficácia dos esquemas anti-retrovirais mostraram que 70% dos pacientes em tratamento quando da coleta da amostra estavam com a carga viral plasmática abaixo do limite de detecção. Os estudos de prevalência de resistência genotípica aos fármacos inibidores da transcriptase reversa e da protease, conduzidos com seqüências geradas do compartimento proviral, mostraram um caso (1,2%) de resistência primária entre 84 pacientes virgens de tratamento. Entre aqueles que estavam em uso de esquemas anti-retrovirais quando da coleta, 31,1% apresentavam diminuição da sensibilidade a algum agente anti-retroviral. Apenas cinco casos de diminuição da sensibilidade aos inibidores da protease foram registrados em toda a casuística. A baixa prevalência de resistência anti-retroviral nestas comunidades pouco privilegiadas economicamente, porém com amplo acesso às medicações componentes dos esquemas terapêuticos, contribui para o debate sobre a conveniência de acesso universal da terapia anti-retroviral em países do terceiro mundo. Nossos dados sustentam que, por mais complexos que sejam os esquemas de tratamento, comunidades menos favorecidas economicamente não devem deixar de se beneficiar da terapia anti-retroviral e que não há evidências de que estejam mais propensas a emergência e disseminação de variantes resistentes às drogas. As reconstruções filogenéticas mostraram perfis polifiléticos, sugestivos de múltiplas introduções virais nas cidades estudadas. Mostraram ainda a ocorrência de clusters monofiléticos de seqüências que guardam grande similaridade genética entre si e que foram geradas de amostras de pacientes que provavelmente tomaram parte na mesma cadeia de transmissão viral. Análises de regressão logística identificaram que *ter sempre residido na cidade em estudo* e *ter uma relação epidemiológica conhecida com algum outro componente da casuística* são variáveis independentemente associadas a ser um paciente cuja amostra gerou seqüências que se abrigaram em algum cluster monofilético. A alta freqüência seqüências que vieram a se agrupar em algum cluster monofilético sugere a existência de redes de interação sexual nas comunidades e é um indicativo de que múltiplas novas infecções estão ocorrendo em um intervalo de tempo relativamente curto. Este perfil molecular é sugestivo de alta incidência e chama a atenção para a necessidade urgente de se conduzir estudos de prevalência nas pequenas cidades do interior do Brasil. Análises de coalescência sugerem que os ancestrais comuns mais recentes que desencadearam as duas cadeias de transmissão que resultaram nos dois maiores clusters de Miracema já estavam em circulação no início da década de 1990. A demonstração de que a disseminação dessas variantes fundadoras já estava em curso em uma época em que pouco ou nada se falava sobre a interiorização da epidemia no Brasil pode ter importantes implicações de saúde pública. Ao compararmos os clusters monofiléticos dos dois municípios vizinhos de Miracema e Santo Antonio de Pádua observamos a total independência dessas redes de transmissão. Os resultados sugerem que cada uma dessas cidades experimentou a introdução independente, com subsequente disseminação, de diferentes linhagens de subtipo B, em um padrão que não é indicativo de redes de transmissão comprometendo toda a sub-região noroeste fluminense, mas sim de múltiplas micro-epidemias difusamente distribuídas e desenrolando-se em ambiente municipal. As reconstruções filogenéticas dos genes do envelope e da polimerase produziram resultados em todo similares, demonstrando que, apesar de ser uma região genômica extremamente conservada, a crescente disponibilidade de seqüências de polimerase geradas para fins de estudos de resistência genotípica pode encontrar aplicabilidade adicional para estudos de cunho epidemiológico.

**ABSTRACT**

The AIDS epidemic in Brazil is spreading from the large urban centers to small cities and the innermost parts of the country, yet data on the features of HIV-1 infection in these places are scarce. Such spread is expected to pose formidable medical, social and logistic challenges. By using mainly HIV-1 envelope and polymerase genomic regions, the studies that compose this thesis try to translate HIV-1 nucleotide sequences into knowledge on viral genetic diversity, molecular epidemiology and prevalence of antiretroviral drug resistance in inner Rio de Janeiro State. Not being feasible to study in detail all inner municipalities of the State, we focus our magnifying lens of investigation into three inner cities chosen as a convenience sample: Miracema and Santo Antonio de Pádua, in the northwestern sub-region, and Saquarema, in the Sun Coast sub-region. In these places we might perhaps extract useful information that will lead to a better understanding of the features of HIV-1 spread towards inner Rio de Janeiro State and Brazil. Between July 1999 and May 2006 a total of 208 adult patients received care in the municipal HIV-1/AIDS program established in these cities. A portrait of a heterosexual epidemic emerged, with a male to female ratio of 1.1. Almost 60% of the patients first presented in advanced stages of HIV-1 disease, which suggests the existence of a large pool of undiagnosed cases in the community. Variables *age* and *male gender* were independent predictors of an AIDS-defining CDC stage at presentation. More than 90% of the patients were residents of the studied cities, which demonstrate a huge local demand for HIV-1-related counseling, testing and treatment. Therefore, the establishment of as many municipal HIV-1/AIDS programs should stand as a priority in our efforts to halt epidemic spread towards inner Brazil. We report a low frequency of male circumcision, an important determinant of HIV-1 heterosexual transmission. Around one fourth of the cohort reported past use of inhaled cocaine. A total of 14.5% of CDC stage C patients from the 2 northwestern cities developed meningoencephalitis due to *Cryptococcus neoformans*. To the molecular epidemiology analyses we had the opportunity to study isolated cases from 26 additional, non-metropolitan cities of the State. HIV-1 sequences were generated from samples from a total of 221 patients. Sequences were assigned subtypes B (190; 86%), F1 (14; 6.3%), CEF02\_AG (2; 0.9%), and D (2; 0.9%), as well as BF1 intersubtype recombinant forms (13; 5.9%). Subtypes B and F1 are the most prevalent lineages in southeast Brazil, whereas subtypes D and CRF02\_AG had previously been reported only from isolated cases in the capital of Rio de Janeiro State. Moreover, we present the first molecular evidence of autochthonous transmission of CRF02\_AG in Brazil, an HIV-1 lineage of major global importance. Phylogenetic analysis of subtype D strains, in conjunction with other subtype D representatives generated in our laboratory, demonstrated that Brazilian autochthonous subtype D sequences share close genetic relatedness with subtype D strains reported in the 1980s from South Africa, a country where this lineage occurs only in isolated cases. Our data suggest that this subtype has been successfully introduced in southeast Brazil as the founder effect of an ancestral sequence of possible South African origin. One of the BF1 recombinant strains was sequenced to full genome and found to share the same recombinant breakpoints with other 3 strains recovered from different studies from our laboratory, thus potentially standing as novel Brazilian CRF\_BF. Data on the efficacy of antiretroviral therapy, performed by targeting the proviral compartment, demonstrate that 70% of the patients under treatment as of sampling had a plasma viral load below detection limit. One case of primary resistance among 84 treatment-naïve subjects was recorded. Among samples from patients under antiretroviral therapy as of sampling, 31.1% had evidence of reduced susceptibility to at least one antiretroviral drug. Only 5 cases of reduced susceptibility to protease inhibitors were recorded among the whole cohort. The relatively low prevalence of antiretroviral drug resistance in these underprivileged settings contributes to the

debate on the convenience of offering universal access to antiretroviral combinations in the underdeveloped world. Our data suggest that underprivileged communities should not have denied their right to state-of-the-art antiretroviral combinations due to the possibility of suboptimal adherence leading to the emergence and spread of resistant variants. Phylogenetic analyses of viral sequences provided evidence of a polyphyletic pattern suggestive of multiple viral introductions in the studied cities. Also, we recorded the occurrence of multiple monophyletic clusters of sequences that share close genetic relatedness. These sequences were generated from samples obtained from patients who probably took part in the same chain of viral spread, suggesting the existence of sexual networks and a high incidence molecular profile. Logistic regression analyses have found that *always having lived in the studied city* and *having a known epidemiologic link within the cohort* were independent predictors of being a patient whose sample yielded clustered sequences. The high frequency of samples that generated clustered sequences is an indication that multiple new infections have occurred in a relatively short period of time and further highlights the urgent need to perform incidence studies in inner Brazil. Coalescent analyses suggest that the most recent common ancestors that triggered the 2 largest transmission chains recorded in the city of Miracema were in circulation in the early 1990s. The demonstration that the dissemination of these viral lineages was already taking place at a time AIDS was considered a problem mainly restricted to the large urban areas of the country may have important public health implications. Phylogenetic analyses also demonstrated that monophyletic clusters from Miracema were phylogenetically unrelated to those from the neighboring Santo Antonio de Pádua, suggesting that in spite of being very close to each other, each city experienced the independent introduction and subsequent dissemination of different subtype B lineages, in a pattern that resembles multiple scattered micro-epidemics. Phylogenetic reconstructions of envelope and polymerase data sets yielded the same overall results, thus demonstrating that in spite of being a relatively conserved region of HIV-1 genome, polymerase sequences, which are being increasingly generated to allow genotypic analyses of drug resistance, can also be useful to studies of epidemiologic relationships between populations, groups and people.

## INTRODUÇÃO

O entendimento de que o surto de pneumocistose pulmonar e sarcoma de Kaposi em jovens previamente saudáveis, descrito a partir da edição de cinco de junho de 1981 do *Morbidity and Mortality Weekly Report* (CDC 1981a, 1981b, 1981c), era consequência da acentuada imunodeficiência celular induzida pela infecção por um novo retrovírus humano (Barre-Sinoussi 1983, Gallo 1983, Levy 1984) foi o desenlace de uma série de descobertas científicas que vinham se desencadeando ao longo do século XX e cujo ponto inicial poderíamos arbitrariamente posicionar no ano de 1904 (revisto em Eyer-Silva 2002). Naquele ano, Carré & Valle (Carré & Vallé 1904) descreveram evidências de que a doença febril anêmica que comprometia o plantel eqüino da região era causada por um agente etiológico que poderia ser transmitido mesmo após a passagem por filtros capazes de reter organismos suficientemente grandes para serem vistos ao microscópio. Este agente vem a ser o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), um retrovírus do mesmo gênero lentivírus dos vírus da imunodeficiência humana. Seguiram-se os experimentos pioneiros de Peyton Rous, publicados em 1910 (Rous 1910) e 1911 (Rous 1911), sobre o sarcoma aviário e que levariam à identificação do vírus do sarcoma de Rous (RSV); os ensaios sobre leucemia em camundongos (Gross 1951), que resultariam na identificação do primeiro retrovírus de mamíferos, o vírus da leucemia murina (MLV); os estudos sobre leucemia e linfoma em felinos domésticos (Jarrett 1964a, Jarrett 1964b), que culminariam com a identificação do primeiro retrovírus associado a imunodeficiência, o vírus da leucemia felina (FeLV); a simultânea descoberta por investigadores independentes da enzima transcriptase reversa, que ocorre em todos os retrovírus, e somente nestes (Baltimore 1970, Temin & Mizutani 1970); e a identificação em 1980 do primeiro retrovírus humano, o vírus da leucemia/linfoma de células T humanas (HTLV-I) (Poiesz 1980).

## *Os agentes etiológicos da Aids*

Encontram-se vírus da família retrovírus, os *Retroviridae*, em todos os vertebrados. Duas características marcantes dos retrovírus são o fluxo reverso de informação genética no sentido RNA para DNA e a integração de seu DNA ao genoma da célula hospedeira (Goff 2001). Estes agentes foram originalmente classificados em quatro tipos (de A a D), de acordo com a morfologia e posicionamento do cerne nucleocapsídico do seu virion, da forma como visualizado por microscopia eletrônica. Atualmente, com base em novos critérios, os membros da família *Retroviridae* são classificados em nove gêneros, dentre os quais se encontram os lentivírus, possuidores de um virion de morfologia peculiar, com nucleocapsídeo em forma de cone ou cilindro. Os lentivírus estão entre os quatro gêneros de retrovírus cuja organização genômica é considerada complexa, pois além de codificar os produtos dos genes que proporcionam integridade estrutural (*gag* e *env*) e função enzimática (*pol*), codificam uma variedade de pequenas proteínas que desempenham várias funções regulatórias (Goff 2001). São membros do gênero lentivírus os agentes etiológicos da Aids (HIV-1 e HIV-2), os retrovírus de primatas não-humanos (SIVs), o vírus da imunodeficiência felina (FIV), o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), o vírus da imunodeficiência bovina (BIV), além de dois vírus que causam doença em hospedeiros caprinos: o vírus da artrite e encefalite caprina, ou CAEV, e o vírus *visna maedi* (do islandês, apatia e dispnéia), ou MMV (Desrosiers 2001). Sabemos hoje que os dois agentes etiológicos da Aids descendem de vírus ancestrais que infectam seus hospedeiros naturais há centenas de milhares, talvez até milhões de anos (revisto em Eyer-Silva 2005a).

Como todos os outros membros da família *Retroviridae*, os agentes etiológicos da Aids contêm um capsídeo viral composto pela proteína capsídica p24, a proteína nucleocapsídica p7/p9, o genoma diplóide de RNA de fita única e três enzimas virais: a

transcriptase reversa, a protease e a integrase. O capsídeo viral está encoberto pela proteína da matriz (p17), posicionada na face interna do envelope. Este é composto de uma dupla camada lipídica, oriunda da membrana citoplasmática da célula hospedeira, ornamentada de espículas essenciais à invasão celular. Estas espículas são complexos protéicos compostos pela glicoproteína de superfície gp120 e a glicoproteína gp41, de transposição da membrana (Barre-Sinoussi 1996, Freed & Martin 2001, Poignard 2001).

Os retrovírus possuem três grupos de genes estruturais: *gag* (antígeno grupo-específico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). O gene *gag* codifica a proteína precursora assemblina (p55), que será clivada pela protease para dar origem às proteínas da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p7/p9). O gene *pol* contém as instruções para a produção das enzimas transcriptase reversa, protease, responsável pela clivagem proteolítica dos produtos dos genes *gag* e *pol*, sem a qual as partículas virais produzidas são desprovidas de infectividade (Kohl 1988, Kaplan 1993) e integrase, fundamental à integração do provírus ao genoma da célula hospedeira (Barre-Sinoussi 1996, Freed & Martin 2001). O gene *env* traz as informações necessárias à produção da proteína precursora gp160, que será processada por uma protease celular para dar origem às duas proteínas do envelope: gp120 e gp41. Estas proteínas vão desempenhar papel de maior relevância na patogenia da infecção. Os retrovírus ditos *complexos*, como os lentivírus de primatas, possuem alguns genes adicionais com função regulatória. Os agentes etiológicos da Aids contêm os genes *tat*, *rev*, *vif*, *nef* e *vpr*. O HIV-1 possui ainda o gene *vpu*; o HIV-2 possui o *vpx*.

O primeiro passo para a infecção celular produtiva se dá com a adsorção às células de virions livres através de suas interações tanto com o receptor CD4 como com os receptores de quimiocinas. O HIV ganha o citoplasma com a fusão das membranas viral e citoplasmática e a perda de seu envelope. Segue-se a transcrição reversa no citoplasma e o transporte do DNA

de fita dupla (provírus) para o núcleo, onde é integrado ao DNA do hospedeiro através da atuação da enzima integrase. O DNA viral integrado serve como molde para a enzima RNA polimerase DNA-dependente, resultando na produção de RNAs mensageiros que são traduzidos em proteínas virais no citoplasma. As poliproteínas do envelope e do complexo *gag/pol* são transportadas por vias independentes para a membrana plasmática, onde partículas virais imaturas ganham o espaço extracelular por brotamento. A enzima viral protease gera então partículas maduras contendo um cerne viral caracteristicamente condensado e as proteínas gp120 excedentes também são liberadas das células (Freed & Martin 2001).

As glicoproteínas do envelope viral desempenham a função de mediadoras da entrada do HIV na célula e são alvo do ataque humoral do hospedeiro. A gp120 é altamente glicosilada e compõe-se de cinco regiões constantes (C1 a C5), interpostas com cinco regiões variáveis (V1 a V5). A fusão viral à célula-alvo ocorre através de uma interação seqüencial entre a gp120 e os receptores celulares do HIV: a molécula CD4 e os membros da família de receptores de quimiocina. A ligação da gp120 ao receptor CD4 não é suficiente para a invasão celular, mas gera uma alteração na estrutura da primeira que permite sua interação com um membro da família de receptores de quimiocina. As cepas com tropismo pelos macrófagos (cepas R5) utilizam o receptor CCR5, as com tropismo pelas células T (X4) utilizam o receptor CXCR4 e aquelas com duplo tropismo (R5X4) podem utilizar um ou outro. Após a ligação da gp120 ao co-receptor, uma nova alteração na estrutura tridimensional da glicoproteína do envelope permite a fusão da gp41 à membrana celular e a penetração viral (Cormier & Dragic, 2000; Poignard e cols., 2001). A importância dos co-receptores celulares do HIV pôde ser demonstrada com a descoberta de que o genótipo homocigoto para a deleção  $\Delta 32$  no gene CCR5 confere resistência (não absoluta) à infecção pelo HIV (Liu 1996), de que o genótipo heterocigoto está associado com uma progressão clínica mais lenta (Dean 1996) e



com o desenvolvimento de agentes farmacológicos que buscam um efeito antagonista a estes co-receptores (Hendrix 2004, Dorr 2005, Strizki 2005).

A patogenia da infecção pelo HIV-1 é extremamente complexa. A infecção direta e destruição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que desempenham papel de relevância central na indução e controle da reposta imune, leva a imunodeficiência. Na infecção humana e em modelos símios, mais da metade do *pool* de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória, predominantemente das superfícies mucosas, é rapidamente destruída, e nunca mais plenamente reposta, quando da infecção primária (Mehandru 2004; Matapallil 2005). A persistência da infecção em células da linhagem macrocítica parece ser importante como um reservatório de replicação viral e na patogênese dos quadros de disfunção neurológica (Speth 2005).

### ***Epidemiologia molecular do HIV-1***

A variação genética dos agentes etiológicos das doenças infecciosas pode alterar de forma significativa sua patogênese, imunogenicidade e potencial de transmissão. O estudo da diversidade genética do HIV-1 e sua evolução ao longo do tempo é fundamental para a compreensão da dinâmica da pandemia de Aids, das circunstâncias que envolveram o seu advento, dos padrões de transmissão em uma dada comunidade e, em sentido mais amplo, de sua disseminação global, da velocidade e maneira como esses vírus modificam-se e como poderão fazê-lo no futuro, além de poder lançar luz sobre o entendimento de sua patogênese, curso clínico, transmissão, diagnóstico, tratamento e no desenvolvimento de vacinas (Anderson 1996, Hu 1996, Korber 2000).

Observa-se extensa heterogeneidade genética nas seqüências de HIV-1, em maior grau nas seqüências hipervariáveis do gene *env*, mesmo em isolados gerados de amostras de um

mesmo indivíduo (Zhang 1997, Shankarappa 1999). Diversas razões explicam tal heterogeneidade genética: a alta taxa de erro da transcriptase reversa em conjunto com a alta taxa de replicação viral (Ho 1995, Wei 1995), a existência de fortes pressões ambientais seletivas (como a abordagem do sistema imune e, inclusive, a presença de agentes anti-retrovirais), do tropismo viral por células deste ou daquele tecido e do evento da recombinação inter e intra-subtipo (Bonhoeffer 1995, Robertson 1995, McCutchan 1996).

Como resultado de sua grande diversidade genética, as seqüências conhecidas de HIV-1 podem ser classificadas do ponto de vista filogenético em diversos grupos e subtipos. As análises filogenéticas de numerosas seqüências de HIV-1 geradas de amostras oriundas de localidades geográficas as mais diversas revelam a ocorrência de três grupos claramente distintos: M, N e O. A grande maioria das seqüências pertence a apenas um destes grupos, o grupo M, responsável, portanto, pela atual pandemia. Dentro do grupo M, uma variedade de subtipos e formas recombinantes circulantes podem ser identificadas. Acredita-se que todos os subtipos de HIV-1 emergiram na África central, provavelmente na região da República Democrática do Congo, onde grande variedade de subtipos pode ser registrada (Vidal 2000). A presença de uma diversidade genética significativamente mais restrita nas demais regiões geográficas da África e dos demais continentes se deve provavelmente ao efeito fundador, através do qual a introdução de determinada variante leva, em havendo condições epidemiológicas que se lhe apresentem favoráveis, ao seu estabelecimento como a forma genética preponderante.

Para a definição de um novo grupo, subtipo ou forma recombinante circulante requer-se que ao menos três seqüências completas ou quase completas sejam descritas. Estas seqüências devem ser geradas a partir de amostras de indivíduos que não tenham ligação epidemiológica entre si. Devem ainda ser filogeneticamente semelhantes entre si ao longo de todo o genoma

viral (Robertson 1999). Sob este prisma, temos atualmente nove subtipos conhecidos no grupo M (A [sub-subtipos A1 e A2], B, C, D, F [sub-subtipos F1 e F2], G, H, J e K) e 34 formas recombinantes circulantes.

Os subtipos B e D são os mais próximos do ponto de vista filogenético e provavelmente derivam de um ancestral comum. De fato, a mais remota seqüência de HIV conhecida, colhida em 1959 na atual República Democrática do Congo, foi posicionada próxima ao nodo ancestral dos subtipos B e D (Zhu 1998). Provavelmente o subtipo B é fruto da introdução e subsequente disseminação nas Américas, possivelmente no Haiti ou Estados Unidos, de uma variante representativa do subtipo D (Thomson & Najera 2005). De um ponto de vista global, as variantes responsáveis pelo maior número de infecções são o subtipo C, com cerca de 50% dos casos, o subtipo A (sub-subtipo A1), com 12%, e o subtipo B, com 10% (Hemelaar 2006). A preponderância do subtipo C é fruto de sua ampla disseminação na Índia e no sul e sudeste africanos (Janssens 1997, Alaeus 2000, Thomson 2002b, Thomson & Najera 2005). Na América Latina, os principais subtipos são o B, com cerca de 73% dos casos, o C (13%), o F1 (4%), além de formas recombinantes BF (8%) (Hemelaar 2006).

Uma substancial parcela da pandemia global é composta por formas recombinantes intersubtipo. A emergência de formas recombinantes pode ser considerada uma propriedade fundamental dos retrovírus em razão da natureza diplóide do seu genoma de RNA e da possibilidade da transcriptase reversa atuar ora nesta, ora naquela fita em células infectadas por mais de um subtipo (Robertson 1995, Blackard 2002). Dessa forma, os espécimes com recombinação intersubtipo são mais prevalentes em áreas onde circulam múltiplos subtipos. Algumas dessas formas recombinantes ocorrem em casos isolados ou clusters de casos epidemiologicamente relacionados, situação em que são denominadas formas recombinantes únicas. Outras, entretanto, disseminaram-se como no caso dos subtipos CRF01\_AE,

predominante no sudeste asiático e esporadicamente encontrada em países da África central (Gao 1996), CRF02\_AG, predominante na África ocidental e central (Carr 1998), CRF07\_BC e CRF08\_BC, os principais subtipos entre usuários de drogas na China (Su 2000), e o CRF12\_BF, que circula predominantemente na Argentina e no Uruguai (Thomson 2000, Thomson 2002a). As duas principais formas recombinantes, o CRF01\_AE e o CRF02\_AG, respondem, cada qual, por cerca de 5% de todos os casos de infecção pelo HIV no mundo (Hemelaar 2006).

### ***A Aids no mundo***

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a infecção pelo HIV é o mais urgente problema de saúde pública da atualidade. Trata-se de uma catástrofe social que já ceifou cerca de 30 milhões de vidas humanas. No ano de 2006, cerca de 39,5 milhões de pessoas estavam vivendo com infecção pelo HIV, incluindo as cerca de 4,6 milhões que adquiriram a infecção naquele ano, e 2,9 milhões morreram de complicações relacionadas à Aids. Quase dois terços das pessoas infectadas reside na África subsaariana e as maiores prevalências são registradas na Suazilândia (33%), Lesoto e Namíbia (20 a 24%). Nos últimos anos os mais significativos aumentos de prevalência ocorreram na Ásia e na Europa oriental (OMS 2004, OMS 2006).

### ***A Aids no Brasil***

A epidemia de HIV-1 é um dos mais graves problemas de saúde pública no Brasil. Sua introdução no país trouxe consigo consideráveis repercussões de ordem médica, social e econômica (Goncalves 1996, Levi & Vitoria 2002, Marins 2003, Teixeira 2004). Até junho de 2006, um total de 433.067 casos cumulativos de Aids havia sido notificado ao Ministério da Saúde no Brasil (Brasil 2006). Estima-se que durante o ano de 2004 a taxa de prevalência de

infecção pelo HIV-1 para a faixa etária de 15 a 49 anos era de 0,42% para as mulheres e 0,8% para os homens. Estes números indicam que, ao longo daquele ano, mais de 590.000 pessoas nesta faixa etária viviam com infecção pelo HIV-1 no país (Szwarcwald & Junior 2006). Embora a epidemia de Aids no Brasil ainda ostente um perfil predominantemente associado aos grandes centros urbanos, as cifras epidemiológicas apontam para uma clara mudança de cenário.

### *A interiorização da epidemia de Aids no país*

Dados do Ministério da Saúde mostram que há uma grande tendência de aumento do número de casos de Aids nos pequenos municípios do Brasil (Brasil 1998, Szwarcwald 2000, Brito 2001). Na região Sudeste, por exemplo, as cidades com mais de meio milhão de habitantes tiveram entre 1990 e 1996 um aumento do número de novos casos de Aids de 4,08% e 19,61% para os sexos masculino e feminino, respectivamente. As cifras correspondentes aos pequenos municípios foram, respectivamente, de 20,79% e 31,45% (Szwarcwald 2000). Conseqüentemente, precisamos urgentemente melhor compreender as características clínicas e epidemiológicas da expansão da epidemia de Aids em direção aos pequenos municípios brasileiros para que estratégias eficazes de controle possam ser desenhadas e implementadas. Duas importantes características da epidemia de Aids nas pequenas comunidades brasileiras, quando comparadas ao perfil dos grandes centros urbanos, estão definidas: uma maior representatividade da categoria de transmissão heterossexual e uma menor razão de sexos homem-mulher (Szwarcwald 2000). As pequenas cidades brasileiras devem ser consideradas pelas políticas de controle da epidemia como um grande reservatório suscetível à disseminação do HIV-1, merecedor dos melhores esforços e estratégias de controle disponíveis.

A expansão da epidemia de HIV-1 em direção aos pequenos municípios do interior do país traz consigo enormes desafios de ordem médica, social e logística. Não são poucas as diferenças potenciais que podem tornar o tratamento e o controle da epidemia nestes locais ainda mais complexos do que já o são nos grandes centros urbanos do país. Apesar dos indicadores epidemiológicos apontarem a expansão da epidemia em direção a estas localidades (Szwarcwald 2000, Brito 2001), pouco se sabe sobre suas características clínicas, epidemiológicas e virológicas (Eyer-Silva 2002).

Os pequenos municípios brasileiros contam em geral com uma infra-estrutura de saúde muito menos desenvolvida do que as cidades de médio e grande porte. A epidemia nestes locais pode ter características clínicas e epidemiológicas peculiares, que precisam ser entendidas para o desenho e implementação de estratégias de controle. Não sabemos se campanhas de prevenção bem sucedidas nas grandes cidades também o serão nos pequenos municípios, áreas rurais e semi-rurais do Brasil. Os pequenos municípios do país também têm uma chance menor de dispor de médicos com experiência no tratamento da infecção pelo HIV-1 e da Aids. A extensão da epidemia em direção a esses locais trará um grande desafio aos profissionais locais, uma vez que terão em geral pouca ou nenhuma experiência anterior no tratamento cada vez mais complexo da infecção pelo HIV-1.

A infra-estrutura médica em geral menos ampla das pequenas comunidades poderá tornar mais difícil o reconhecimento etiológico das complicações clínicas da infecção pelo HIV-1. O espectro e a importância local de cada desordem clínica associada à Aids pode demonstrar variações regionais significativas, que precisam ser reconhecidas.

Outro ponto importante é a questão da confidencialidade. Nas pequenas comunidades todos se conhecem pelo nome e pode ser extremamente difícil manter um diagnóstico, qualquer que ele seja, sob sigilo. A possibilidade de que o diagnóstico de infecção pelo HIV-1 e Aids caia em domínio público pode dificultar a procura por testagem sorológica e tratamento. Se tal dificuldade estender-se às gestantes, o risco de transmissão perinatal poderá ser maior nestas localidades. Dessa forma, as dificuldades em se manter sob sigilo o diagnóstico de infecção pelo HIV-1 tendem a tornar extraordinariamente complexo o controle da epidemia nas pequenas comunidades brasileiras.

Pouco ou nada sabemos sobre a eficácia e tolerabilidade do tratamento da infecção pelo HIV-1 nos pacientes das pequenas comunidades. Particularidades locais, como o alcoolismo e o uso de drogas ilícitas, e até mesmo menores oportunidades educacionais e a questão da confidencialidade, poderão interpor-se como barreiras ao uso apropriado destas medicações e favorecer a falência virológica e terapêutica, a emergência de variantes virais resistentes aos fármacos anti-retrovirais e sua transmissão.

Os habitantes dos pequenos municípios podem experimentar uma falsa sensação de que a epidemia de Aids permanece um problema restrito aos grandes centros urbanos do país. A própria geração de informações sobre HIV-1 e Aids veiculadas pelos meios de comunicação é feita, em geral, a partir das grandes metrópoles, na maioria das vezes do eixo Rio de Janeiro e São Paulo. Pouco ou nada se fala sobre a presença da epidemia nas áreas rurais e nos pequenos municípios.

De forma que o estudo cuidadoso das características da infecção pelo HIV-1 nos pequenos municípios nos ajudará a melhor entender a real magnitude do problema, as

diferenças geográficas no seu espectro de complicações clínicas, as vulnerabilidades locais que favorecem a disseminação da epidemia e a importância das diferenças sócio-econômicas, educacionais e comportamentais na eficácia das campanhas de prevenção e no tratamento. E permitirá um entendimento das vias de disseminação do HIV-1, uma melhora da abordagem médica com o reconhecimento do espectro local de complicações clínicas da Aids, o desenho de estratégias de prevenção apropriadas e uma alocação adequada dos recursos, já tão limitados.

Os estudos que se seguem são uma tentativa inicial de lançar luz sobre a interiorização da epidemia de HIV-1 no estado do Rio de Janeiro, usando as informações nucleotídicas contidas no genoma viral como ferramenta para melhor entender sua epidemiologia, a eficácia da terapia anti-retroviral e a prevalência de mutações que conferem resistência aos fármacos anti-HIV-1.

### ***A filogenia como ferramenta para o estudo da interiorização da epidemia de Aids no Brasil***

As seqüências nucleotídicas do HIV-1 encerram informações filogenéticas que, uma vez bem decodificadas, podem mostrar-se valiosas para o entendimento dos perfis macro e micro-epidemiológicos de disseminação viral. Ora envolvendo seqüências recuperadas de alguns poucos indivíduos, ora de grupos que representam toda uma comunidade, toda uma região geográfica ou mesmo um conjunto de países, são inúmeros os exemplos de estudos filogenéticos que souberam extrair das seqüências nucleotídicas do genoma do HIV-1 informações moleculares que vieram a ser traduzidas em conhecimento epidemiológico (Kuiken 2000). Estas investigações mostraram-se inestimáveis, por exemplo, em ensaios que lançaram luz sobre as rotas de transmissão viral em grandes cidades (Holmes 1995, Brown



1997), que demonstraram (Ou 1992, Blanchard 1998) ou, por outra, descartaram (Holmes 1993, Rogers 1993, Jaffe 1994) a via iatrogênica de transmissão, que delinearam uma longa cadeia de transmissão envolvendo nove indivíduos (Leitner 1996); que sustentaram uma fonte única de infecção de 13 mulheres de um vilarejo rural que referiram contato sexual com o mesmo indivíduo HIV-1-positivo (Robbins 2002); que identificaram rotas de disseminação viral em diferentes regiões de um mesmo país (Yu 2001); que demonstraram que duas epidemias independentes estavam em curso no mesmo país (Ou 1993); que mapearam a origem geográfica de subtipos e variantes recentemente introduzidas em uma dada região (Gao 1996, Kato 1999, Couto-Fernandez 2006); que inferiram a história demográfica e os dados cronológicos associados às explosões epidêmicas (Robbins 2003, Bello 2007); que investigaram episódios atípicos de transmissão viral (Goujon 2000, Andreo 2004); que permitiram uma melhor compreensão da compartimentalização da infecção pelo HIV-1 com o advento do ramo da “filodinâmica” (Salemi 2005); que encontraram aplicação em ambiente forense como ferramenta adicional para a investigação de casos criminais como, por exemplo, estupro (Albert 1994, Banaschak 2000, Metzker 2002, Lemey 2005b) e transmissão parenteral intencional (Metzker 2002); e que desacreditaram a peça jurídica forjada contra profissionais estrangeiros acusados de desencadear um surto de infecção pelo HIV-1 (e HCV) em um hospital pediátrico na Líbia (Oliveira 2006).

As análises filogenéticas das seqüências de bases nucleotídicas do HIV-1 também se mostraram úteis na demonstração de perfis moleculares sugestivos de alta incidência, como o registro de múltiplos clusters de transmissão, com baixo grau de diversidade genética e assinaturas moleculares comuns a seqüências de uma dada região (McCutchan 1992, Dietrich 1993, Ou 1993, Liitsola 1998, Oelrichs 2000, Shankarappa 2001, Nguyen 2002), ou ainda de sinais moleculares sugestivos de um perfil epidêmico maduro ou estabilizado, dada a alta

diversidade genética, a escassez de clusters monofiléticos de transmissão e de assinaturas moleculares geograficamente representativas (Yirrell 1998, Vidal 2000, Trask 2002).

Dessa forma, para melhor entender o perfil epidemiológico da infecção pelo HIV-1 em pequenos municípios do interior do estado do Rio de Janeiro, conduzimos análises de epidemiologia molecular de seqüências de HIV-1 geradas de amostras de pacientes em acompanhamento em cidades do interior do estado do Rio de Janeiro, tendo os municípios de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema como foco principal. Não sendo factível nos deter detalhadamente em todos os municípios do interior, foram estas cidades escolhidas como uma amostragem de conveniência de onde talvez possamos extrair informações que sejam úteis à compreensão de características importantes da interiorização da epidemia de HIV-1 no estado. Tendo como alvo os genes da polimerase (nas três cidades) e do envelope (em Miracema), buscamos extrair das seqüências virais informações nucleotídicas que nos permitissem caracterizar a diversidade genética da infecção pelo HIV-1 nestas localidades, sua epidemiologia molecular, bem como seu perfil de resistência genotípica aos inibidores da transcriptase reversa e da protease.

### ***Resistência primária e secundária do HIV-1 no Brasil***

A infecção pelo HIV-1 é tratada com combinações de fármacos anti-retrovirais que têm como objetivo a interrupção da progressão clínica para estágios de imunodeficiência e o máximo de redução da carga viral plasmática, se possível para níveis abaixo dos limites de detecção. Uma das causas de falência ao tratamento é a emergência de variantes com mutações que conferem resistência aos fármacos individuais do esquema terapêutico. Uma vez que cada possível mutação pontual ao longo do genoma do HIV ocorre cerca de  $10^4$  a  $10^5$  vezes ao dia em um indivíduo que não esteja em tratamento (Coffin 1995), a persistência de

replicação viral na presença de drogas anti-retrovirais leva a seleção e emergência das variantes com mutações de resistência, por conferirem melhor capacidade adaptativa a um ambiente sob estas condições. Outras causas da falência ao tratamento são a adesão incompleta às prescrições, uma atividade antiviral insuficiente do esquema escolhido, razões farmacocinéticas e resistência primária.

Nosso país implementou uma política de disponibilização gratuita e universal de drogas anti-retrovirais, de acordo com diretrizes de indicação e uso periodicamente atualizadas pelo Ministério da Saúde (Marins 2003, Teixeira 2004). Desde 1991 que a zidovudina, primeiro fármaco com atividade anti-HIV a ser lançado no mercado, está disponível através do sistema público de saúde no Brasil. A este agente logo se seguiram novos inibidores da transcriptase reversa e, em 1996, os inibidores de protease.

Acompanharam o fornecimento da terapia anti-retroviral o estabelecimento de uma rede de laboratórios para citometria de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, em 1997, quantificação do RNA plasmático do HIV-1 (carga viral), em 1998 e estudo genotípico da resistência aos anti-retrovirais, em 2002. O resultado deste esforço foi um substancial aumento da sobrevida, com declínio significativo na ocorrência de complicações oportunistas e queda extraordinária do número de mortes relacionadas a complicações da infecção pelo HIV-1 (Marins 2003, Teixeira 2004, Campos 2005).

Uma vez que a persistência da replicação viral na presença de pressão seletiva de drogas que inibem a atividade das enzimas protease e transcriptase reversa invariavelmente resulta na emergência de variantes virais resistentes às medicações, o acesso universal às drogas que compõem os diversos esquemas anti-retrovirais necessita estar acompanhado por um esforço contínuo de assegurar a adesão ao tratamento, bem como de vigilância da

prevalência de mutações associadas a resistência às três classes de anti-retrovirais atualmente disponíveis no país. De fato, o acesso universal a drogas anti-retrovirais em países subdesenvolvidos despertou a preocupação de que seu uso inapropriado e uma baixa adesão ao tratamento poderiam desencadear o surgimento e disseminação de variantes resistentes. Houve quem anunciasse que o mundo em desenvolvimento poderia tornar-se uma “placa de Petri” para a emergência de linhagens virais novas, resistentes ao tratamento e passíveis de disseminação (Popp & Fisher 2002).

Estudos de prevalência de mutações associadas a resistência em variantes geradas a partir de amostras de pacientes nunca antes expostos a terapia anti-retroviral (resistência primária) são um importante sinalizador da frequência com que vírus resistentes estão sendo transmitidos na comunidade. A interpretação dos resultados destas análises deve levar em consideração a possibilidade teórica de inclusão de pacientes que sub-repticiamente omitem sua experiência prévia com agentes anti-retrovirais, diante da oportunidade de realização do teste de genotipagem. No mundo desenvolvido, estes estudos de prevalência de resistência primária encontram resultados variáveis, eventualmente com taxas alarmantes em algumas casuísticas, como 22,7% nos Estados Unidos (Little 2002) e 20,6% na Itália (Violin 2002). Entre 2.208 pacientes de um grande estudo envolvendo diversos países europeus, a prevalência foi de 10,4% (Wensing 2005). Também chamam atenção estudos que apontam altas frequências de variantes multirresistentes, como a taxa de 10,2% entre 377 indivíduos recrutados em inquérito norte-americano (Little 2002).

Recente revisão de literatura mostra que, quando comparadas às taxas reportadas em diversos países desenvolvidos da Europa e América do Norte, são relativamente baixas as prevalências de resistência primária no Brasil (Soares 2004). Também não temos descrições de variantes resistentes a múltiplas classes de anti-retrovirais em indivíduos virgens de

tratamento. Em casuística do Instituto Adolfo Lutz, a prevalência de resistência primária foi de 3% para inibidores da transcriptase entre 44 indivíduos (Brigido 2005). Entre amostras de banco de sangue, as prevalências oscilam entre zero (Dumans 2002), 0,9% (Brindeiro 1999), 1,35% (Sa-Ferreira 2007) e 6,3% (Barreto 2006). Uma frequência de 3% de resistência primária foi registrada entre 108 amostras de indivíduos soropositivos diagnosticados em centro de aconselhamento e testagem voluntária de Porto Alegre (Rodrigues 2006). Em outra casuística do sul do país, um caso de resistência primária foi identificado entre 25 (4%) indivíduos estudados (Soares 2005). Entre amostras de 84 indivíduos acompanhados no Recife, três (3,6%) apresentavam mutações associadas a resistência aos análogos de timidina (Medeiros 2006). No maior estudo brasileiro, entre 535 amostras obtidas no ano de 2001 de indivíduos virgens de tratamento, registrou-se resistência primária a inibidores da protease, a inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa e a inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa em 2,24%, 2,36% e 2,06% das amostras, respectivamente (Brindeiro 2003).

Quatro outros estudos brasileiros, entretanto, encontraram prevalências de resistência primária mais elevadas e devem servir como um sinal de alerta, embora seus resultados provavelmente não sejam representativos da prevalência de resistência primária em outros grupos epidemiológicos e devam estar relacionados às características das populações estudadas. Em casuística relativamente pequena (56 casos) do Hospital Central do Exército no Rio de Janeiro, 14% das amostras apresentavam resistência para inibidores da transcriptase reversa (Pires 2004). Em coorte de 38 usuários de drogas no Rio de Janeiro, demonstrou-se resistência primária a inibidores da transcriptase reversa e da protease em 13,2% e 7,9% das amostras, respectivamente (Maia Teixeira 2006). Em estudo conduzido em Salvador (BA) entre 2000 e 2004, 18 (15,8%) amostras de 114 adultos e sete (26,9%) de 26 crianças apresentaram ao menos uma mutação associada a resistência genotípica (Pedroso 2007). Na

cidade de Santos foram demonstradas as maiores prevalências de resistência primária no país. Entre amostras de 25 pacientes com infecção pelo HIV-1 recente e 65 com infecção crônica pelo HIV-1, conforme inferido através de uma bateria de sorologias com sensibilidades distintas, oito (36,8%) e 14 (25%), respectivamente, apresentavam resistência a ao menos uma classe de anti-retroviral (Sucupira 2007).

Além dos inquéritos sobre resistência primária, estão disponíveis diversos estudos brasileiros que se debruçaram sobre o perfil genotípico de seqüências geradas de amostras de pacientes selecionados por estarem em falência virológica aos seus esquemas anti-retrovirais (Caride 2000, Caride 2001, Brindeiro 2002, Tanuri 2002, Cerqueira 2004, Couto-Fernandez 2005, Rodrigues 2005a, Rodrigues 2005b), Como seria esperado pelas características das casuísticas, estes inquéritos apontam alta prevalência de mutações associadas a resistência. Um desdobramento importante destes estudos é o melhor entendimento da diversidade genética e da epidemiologia molecular do HIV-1 em nosso país (tema a ser abordado na Discussão).

São, entretanto, poucas as investigações disponíveis sobre a freqüência de sucesso terapêutico e de prevalência de mutações associadas a resistência em coortes brasileiras sob terapia anti-retroviral regular. Em casuística do sul do país, com grande representatividade de infecção pelo subtipo C (45%), demonstrou-se que 60% (36 casos em 60) das amostras de pacientes em tratamento anti-retroviral regular apresentavam mutações associadas a resistência (Soares 2005). Um pequeno estudo capixaba envolvendo 35 pacientes em uso de esquemas anti-retrovirais, todos previamente expostos a combinações de atividade insatisfatória, encontrou alta freqüência de falência virológica e de mutações associadas a resistência (Pilcher 1999).

Adicionalmente, nosso conhecimento sobre resistência primária e secundária no Brasil concentra-se em casuísticas recrutadas nos grandes centros urbanos do país. Com a expansão da epidemia em direção às pequenas cidades e às áreas rurais, que também contam com acesso universal aos esquemas terapêuticos, ganha enorme relevância o estudo da prevalência de mutações associadas a resistência em casuísticas de pequenos municípios do interior do país. O presente estudo, portanto, será uma oportunidade de estudarmos o perfil de resistência genotípica do HIV-1 em três cidades do interior do estado do Rio de Janeiro, todas com índices de desenvolvimento humano relativamente baixo, e amplo acesso a esquemas anti-retrovirais de alta atividade.

## **OBJETIVO GERAL**

Descrever a epidemiologia molecular da infecção pelo HIV-1 em municípios do interior do estado do Rio de Janeiro, tendo as cidades de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, como cenário principal.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

# Extrair das seqüências de genes do HIV-1 informações nucleotídicas que possam nos ajudar a melhor compreender a epidemiologia e os padrões de disseminação da epidemia em pequenos municípios do estado do Rio de Janeiro. Notadamente, buscaremos entender se a epidemia de HIV-1 nestas cidades é fruto de uma única ou de múltiplas introduções virais na região e se há perfis moleculares sugestivos de alta incidência;

# Estudar a diversidade genética e a distribuição de subtipos de HIV-1 nestas regiões e compará-los com o perfil previamente descrito na Região Sudeste, no Brasil e no mundo, depositadas em bancos de dados de domínio público;

# Estudar a prevalência de mutações associadas a resistência aos anti-retrovirais, tanto em pacientes previamente expostos a estes agentes, como em indivíduos virgens de tratamento; associar estes resultados com a presença ou não de falência virológica ao tratamento, de forma a estimar a freqüência de sucesso terapêutico aos esquemas terapêuticos;

# Descrever o perfil clínico e epidemiológico da casuística.



## METODOLOGIA

### *Os municípios do presente estudo*

#### *Miracema*

Miracema é um município localizado na região noroeste do estado do Rio de Janeiro (Figura 1), com uma área de 303Km<sup>2</sup> e 138m acima do nível do mar (IBGE 2007). Faz divisa com o município mineiro de Palma ao oeste e com os municípios fluminenses de São Jose de Ubá ao leste, Santo Antônio de Pádua ao sul, além de Laje do Muriaé e de Itaperuna ao norte. Divide-se politicamente em sua sede e dois distritos rurais: Venda das Flores, ao norte, e Paraíso do Tobias, ao sudeste. A população estimada em 01 de julho de 2005 foi de 28.300 habitantes, com uma razão de sexos homem-mulher de 0,95 (IBGE 2007).

A economia municipal baseia-se na cultura do arroz, feijão, milho e do café, na pecuária leiteira e de corte, na olericultura, suinocultura e fruticultura. Destaca-se na economia municipal a pecuária leiteira, com mais de 26.904 cabeças-de-boi, em estimativa do ano de 2003.

Miracema tem dois hospitais, um municipal e outro particular, a Casa de Saúde São Sebastião, que presta serviços ao Sistema Único de Saúde. A sede do município conta com quatro unidades ambulatoriais: o Posto de Saúde Dr. Irineu Sodré, o Centro de Saúde Dr. Moacyr Junqueira, o Posto de Saúde do bairro da CEAB e o Posto de Saúde do bairro de Santa Tereza. Os distritos de Venda das Flores e Paraíso do Tobias também contam, cada qual, com um Posto de Saúde. Destaca-se ainda na sede do município a Clínica Santo Inácio,

com ambulatórios de atendimento exclusivamente particular em diversas especialidades médicas.

Até junho de 1999 os pacientes do Programa de HIV-1/Aids de Miracema eram acompanhados por um generalista local. Desde julho de 1999 o atendimento é feito pelo o autor. As visitas são mensais e o atendimento é feito no Posto de Saúde Dr. Irineu Sodré.

Segundo o IPEA, o índice de desenvolvimento humano de Miracema é de 0,733, correspondendo a 70ª posição entre os 92 municípios do estado do Rio de Janeiro (IPEA 2003).

### **Santo Antônio de Pádua**

O município de Santo Antônio de Pádua também se localiza na região noroeste do estado do Rio de Janeiro (Figura 1). Faz divisa com os municípios de Miracema e São Jose do Ubá, ao norte, Cambuci, Aperibé e Itaocara, ao leste, e com o estado de Minas Gerais, ao sul e oeste. Ocupa uma área de 612Km<sup>2</sup>, dos quais 20,7Km<sup>2</sup> são considerados urbanos (Pádua 2003). Segundo estimativa do IBGE, o município contava 42.078 habitantes em 01 de julho de 2005, com uma razão de sexos homem-mulher de 0,99 (IBGE 2007). De perfil predominantemente urbano (74,9%), sua população divide-se pelos nove distritos políticos do município, a saber: Santo Antônio de Pádua (sede), Baltazar, Santa Cruz, Marangatu, São Pedro de Alcântara, Monte Alegre, Paraoquena, Ibitiguaçu e Campelo.

Ao longo de cerca de 30Km o Rio Pomba, tributário do Paraíba do Sul, banha os distritos de Paraoquena e Baltazar, além de rasgar a sede do município em 4Km de extensão. Poluído, o Rio Pomba sofre com a degradação ambiental, que exauriu a densa Mata Atlântica

que o abrigava no início do século XX, e com a poluição industrial. As principais atividades econômicas do município são a extração e beneficiamento de pedras decorativas, a horticultura, a produção de insumos agropecuários e a reciclagem de papel (UFF 2003, Pádua 2003). O município também é uma estância hidromineral.

Até setembro de 2001, Santo Antônio de Pádua não contava com um Programa de HIV-1/Aids. Os pacientes eram atendidos pelo Programa de Itaperuna, a cerca de 60Km de distância do centro de Pádua. A partir de outubro daquele ano os pacientes do município passaram a contar com visitas médicas mensais do autor, na sede municipal, sempre no dia seguinte a sua estada em Miracema. O Programa de HIV-1/Aids de Pádua foi credenciado pela Secretaria Estadual de Saúde em 2002. Pádua conta com quatro hospitais.

Segundo o IPEA, o índice de desenvolvimento humano de Pádua é de 0,754, correspondendo a 50ª posição entre os 92 municípios do estado do Rio de Janeiro (IPEA 2003).

### **Saquarema**

Saquarema localiza-se na Região dos Lagos, também chamada de Costa do Sol (Figura 1). Com uma razão de sexos homem-mulher de um, Saquarema contava, segundo estimativa do IBGE, 61.591 habitantes em 01 de julho de 2005 - posicionando-se, portanto, no limite inferior da faixa populacional dos municípios de tamanho médio (IBGE 2007). Com uma área de 355Km<sup>2</sup>, o município é banhado pelo Oceano Atlântico e faz divisa com Rio Bonito, ao norte, Maricá, ao oeste e Araruama, ao leste. Com suas lagoas espremendo-se entre o mar e as montanhas ainda cobertas de Mata Atlântica, sua alegre enseada que culmina com um outeiro encimado pela igreja de N. Sr<sup>a</sup> de Nazareth, padroeira da cidade, Saquarema é,

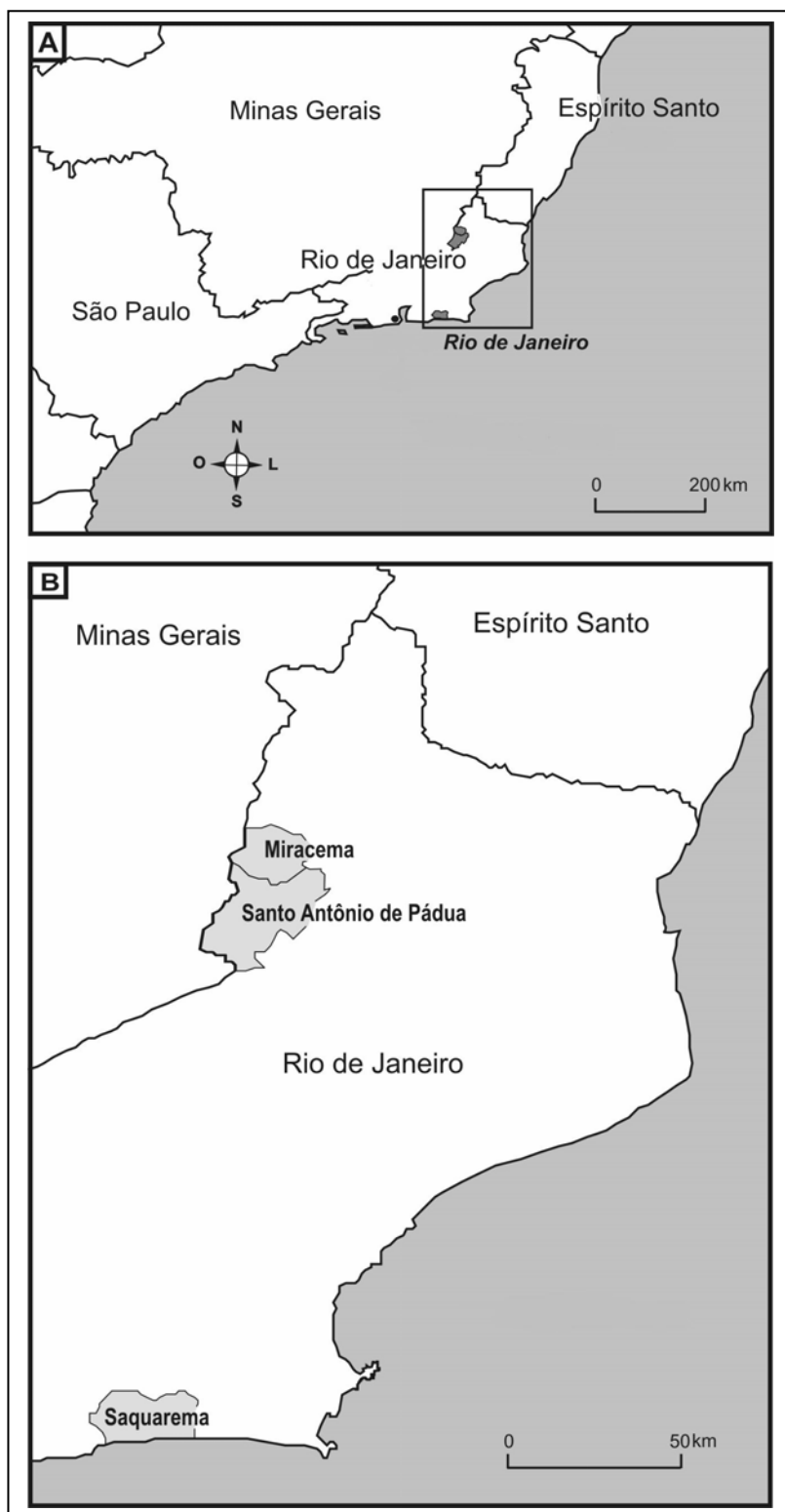
seguramente, uma das mais belas paisagens fluminenses. Atrai grande população flutuante de turistas, veranistas, adeptos de passeios ecológicos, surfistas, balonistas, pára-quedistas, praticantes de diversos esportes náuticos e pescadores, além de abrigar um centro de treinamento da Confederação Brasileira de Voleibol. A região também possui importantes sítios arqueológicos que conservam remanescentes da cultura dos índios tamoios (Saquarema 2003). O município mantém uma página oficial na rede mundial de computadores: <http://www.saquarema.rj.gov.br/>.

Além do turismo, as principais atividades econômicas de Saquarema são a pesca, a construção civil e o comércio, sobretudo concentrado no distrito de Bacaxá, o mais populoso. A sede administrativa situa-se na região do centro histórico, onde ainda podemos ver o que restou da tão simples e tão bela arquitetura do antigo arraial de pescadores. Outros distritos e bairros municipais são Sampaio Correa, Boqueirão, Itaúna, Porto da Rosa, Jaconé, Rio da Areia, Barra Nova, Bicuíba e Vilatur.

O Programa de HIV-1/Aids de Saquarema está em funcionamento desde o ano de 1999. Até janeiro de 2001 os pacientes vinham em acompanhamento com um ginecologista local. A partir de fevereiro daquele ano o autor assumiu a direção médica do Programa. O município conta com um único hospital.

Segundo o IPEA, o índice de desenvolvimento humano de Saquarema é de 0,762, correspondendo a 45ª posição entre os 92 municípios do estado do Rio de Janeiro (IPEA 2003).

**Figura 1.** A) A Região Sudeste do Brasil; B) As cidades de Saquarema, na sub-região da Costa do Sol, e Miracema e Santo Antonio de Pádua, na sub-região noroeste fluminense.



**FIGURA 1**

### *Outros municípios*

Tivemos oportunidade de estudar seqüências de polimerase de pacientes que estavam em acompanhamento em outras 26 cidades não metropolitanas do estado do Rio de Janeiro e que estavam em falência virológica aos seus respectivos esquemas anti-retrovirais. Estas amostras foram encaminhadas ao laboratório de referência da RENAGENO, na Fiocruz, para estudo de genotipagem.

### *Coleta de informações clínicas e epidemiológicas*

O estudo clínico e epidemiológico constou da coleta dos dados referentes ao sexo, data de nascimento, naturalidade, estado civil, escolaridade, ocupação, local de residência, antecedentes de residência em outro município, data do primeiro atendimento, data da primeira sorologia anti-HIV-1 reativa, data do diagnóstico de Aids, forma de aquisição da infecção pelo HIV-1, resultados da citometria de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e da quantificação do RNA plasmático do HIV-1 (carga viral), complicações clínicas associadas à infecção pelo HIV-1, abuso de bebidas alcoólicas (definido como o uso regular de bebidas alcoólicas em quantidade suficiente para trazer significativos problemas de ordem social, interpessoal, familiar e/ou orgânica), uso de drogas ilícitas e a adesão ao esquema anti-retroviral (vide *Questionário Clínico e Epidemiológico*, ANEXO 2). Entre os pacientes do sexo masculino, registramos a frequência de circuncisão, um importante determinante da transmissão heterossexual do HIV-1.

### ***O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 e o seu estágio clínico***

O diagnóstico de infecção pelo HIV-1 foi feito de acordo com o fluxograma proposto pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil 2003). O estágio clínico da infecção pelo HIV-1 foi determinado de acordo com o sistema de classificação proposto pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC 1992).

### ***A coleta das amostras de sangue***

Cerca de 10ml de sangue venoso periférico foram coletados, a vácuo, em tubos contendo o anticoagulante etilenodiamina, a partir de punção de veia da fossa cubital. O sangue foi centrifugado e os componentes plasmático e celular (creme leucocitário) foram armazenados em alíquotas devidamente identificadas e mantidos em recipiente de isopor contendo gelo seco para transporte ao laboratório de Aids e Imunologia Molecular da Fiocruz, onde as alíquotas foram então conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a data do processamento.

### ***A extração do DNA***

A extração do DNA foi conduzida em amostras de 200 $\mu\text{l}$  do concentrado de células utilizando-se o kit comercial *QIAmp Blood kit* (Qiagen Inc., Chatswoth, CA, USA) da empresa QIAGEN, observando as instruções do fabricante. As soluções assim obtidas foram imediatamente encaminhadas à reação de polimerase em cadeia ou, alternativamente, foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para processamento posterior.

### ***A reação da polimerase em cadeia, aninhada (nested PCR)***

O produto da extração do DNA foi encaminhado à reação da polimerase em cadeia, aninhada, com jogos de oligonucleotídeos iniciadores complementares a uma seqüência viral conhecida, com o objetivo de amplificar seqüências-alvo do genoma do HIV-1.

Para a amplificação da região hipervariável C2V3 do gene do envelope, as misturas de reação foram preparadas para um volume final de 50,5µl (5µl dos quais de DNA e 0,5µl da enzima Ampli Taq polimerase 2,5U) e continham os dideoxynucleotídeos dCTP, dATP, dGTP e dTTP (0,09µl de cada; 25mM), tampão Taq 10X (5µl: 100mM Tris-HCl, 50mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,001% de gelatina, em pH 8,3), cloreto de magnésio (6,3µl; 10mM), cada um dos dois oligonucleotídeos iniciadores (1,8µl de cada; 5pmol) e 29,74µl de H<sub>2</sub>O.

Para amplificação de segmento parcial do gene da polimerase, compreendendo as regiões da protease e da transcriptase reversa, as misturas de reação continham 5µl do DNA extraído, 5µl de tampão Taq 10X, 0,6µl de cada um dos dideoxynucleotídeos 25mM, 5µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1µl de cada oligonucleotídeo iniciador 25pM, 33µl de H<sub>2</sub>O e 0,5µl de Ampli Taq polimerase 2,5U.

Todas as misturas de reação foram preparadas em ambiente apropriado, onde não se lida com produtos amplificados e periodicamente irradiado com ultravioleta, sob cuidadosa observação das técnicas para minimizar a contaminação das amostras.



Com o intuito de aumentar tanto a sensibilidade como a quantidade de DNA-alvo amplificado, a reação da polimerase em cadeia foi conduzida em duas etapas, inicialmente com oligonucleotídeos externos e posteriormente com internos, ou aninhados. Para a região C2V3 do gene do envelope, os oligonucleotídeos iniciadores externos utilizados foram o ED3 (ou ED5), senso, e o ED14 (ou ED12), anti-senso. Os internos foram o ED31, anterógrado, e o ED33, retrógrado (Delwart 1993). Para o segmento parcial do gene da polimerase, os oligonucleotídeos iniciadores externos foram o DP10, senso, e RT12, anti-senso. Como oligonucleotídeos internos, usamos o DP16, senso, e o RT4, anti-senso (Eyer-Silva & Morgado 2005). A Tabela 01 mostra a posição no genoma HXB2 e a seqüência 5'-3' dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação.

As duas etapas da reação da polimerase em cadeia, aninhada, foram conduzidas em um equipamento termociclador da marca Perkin-Elmer<sup>®</sup>, ora no modelo 480, ora no 9600. Para o envelope, as três primeiras ciclagens térmicas consumiram um período de desnaturação de 60 segundos a 97°C, seguidas de um período de anelamento de 60 segundos a 55°C e de 120 segundos de extensão a 72°C. As 32 ciclagens térmicas seguintes foram programadas com período de desnaturação de 45 segundos a 94°C e as mesmas condições de anelamento e extensão acima. Um período final de 10 minutos de extensão a 72°C completou a reação.

Para a polimerase, as três primeiras ciclagens térmicas consumiram um período de desnaturação de 3 minutos a 95°C, seguidas de um período de anelamento de 60 segundos a 55°C e de 60 segundos de extensão a 72°C. As 35 ciclagens térmicas seguintes foram programadas com período de desnaturação de 60 segundos a 95°C, anelamento de 45 segundos a 55°C e extensão de 60 segundos a 72°C. Um período final de 10 minutos de extensão a 72°C completou a reação.

Ao final da reação com os oligonucleotídeos iniciadores externos, 5 $\mu$ l do seu produto de amplificação foram transferidos para a mistura de reação da segunda etapa, com os oligonucleotídeos iniciadores aninhados. Foram observadas todas as precauções para evitar a possibilidade de artefatos, incluindo a utilização de controles positivo e negativo, e o uso de ambientes e pipetas exclusivos para cada etapa do procedimento, sempre com ponteiras com barreira. Um pequeno volume dos produtos de amplificação era então levado avaliado por eletroforese em gel de 2% de agarose corado com brometo de etídio, sob voltagem constante de 80 volts durante cerca de 2h, e visualizados sob luz ultravioleta.

#### ***A purificação do produto final de amplificação***

Os produtos de amplificação das reações da polimerase em cadeia foram então purificados através do Kit comercial *Concert*, da empresa GibcoBRL (GibcoBRL, Reino Unido), ou *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*, da empresa Promega (Madison, WI, USA), de acordo com as instruções dos fabricantes. Os produtos de amplificação purificados foram conservados sob temperatura de -20°C até a data do procedimento seguinte.

#### ***A reação de seqüenciamento***

Os produtos purificados da reação da polimerase em cadeia foram então seqüenciados em ambos os sentidos com os oligonucleotídeos iniciadores ED31 e ED33, para o envelope, e DP16, RT4, LR49 e LR51, para a polimerase, além de terminadores de extensão de cadeia marcados com radicais fluorescentes (kit *Big Dye*) e de seqüenciadores automáticos da

Applied Biosystems<sup>®</sup>, modelo 3100 (Foster City, California, USA), observando os protocolos fornecidos pelo fabricante.

**Tabela 01.** Posição no genoma HXB2 e seqüência 5'-3' dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação e seqüenciamento das regiões parciais dos genes do envelope (Delwart 1993) e da polimerase do HIV-1 (Eyer-Silva & Morgado 2005).

oligonucleotídeo	posição	orientação	gene	seqüência 5'-3'
DP10	2198-2223	senso	<i>pol</i>	TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG
RT12	3485-3516	anti-senso	<i>pol</i>	ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA
DP16	2253-2274	senso	<i>pol</i>	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC
RT4	3497-3519	anti-senso	<i>pol</i>	AGTTCATAACCCATCCAAAG
LR49	2616-2635	senso	<i>pol</i>	CAATGGCCATTGACAGAAGA
LR51	4591-4615	anti-senso	<i>pol</i>	TGTGGTATCCTAATTGAACTTCCC
ED3	5956-5985	senso	<i>env</i>	TTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGG
ED14	7960-7931	anti-senso	<i>env</i>	TCTTGCCTGGAGCTGTTTGATGCCCCAGAC
ED5	6556-6581	senso	<i>env</i>	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG
ED12	7822-7792	anti-senso	<i>env</i>	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGGAACCCAAG
ED31	6816-6844	senso	<i>env</i>	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG
ED33	7359-7380	anti-senso	<i>env</i>	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC

### *Genotipagem do HIV-1 RNA recuperado do compartimento plasmático*

A amplificação e seqüenciamento do RNA do HIV-1 das amostras de 63 pacientes em acompanhamento nas 26 cidades adicionais do interior do estado do Rio de Janeiro foram conduzidas através do Sistema de Genotipagem da Viroseq<sup>TM</sup>, conforme previamente descrito (Couto-Fernandez 2005).

### ***Seqüenciamento de genoma completo***

O seqüenciamento do genoma completo do HIV-1 de amostras selecionadas, como a seqüência representativa do subtipo D e algumas formas recombinantes BF foi conduzido com a amplificação de segmentos superpostos do genoma viral, conforme previamente descrito (Triques 2000).

### ***A análise e edição das seqüências***

As seqüências geradas por cada oligonucleotídeo iniciador foram inicialmente inspecionadas com o programa Chromas, versão 1.45 (Technelysiun Ltd, Queensland, Austrália), e os *contigs* foram reunidos e editados com o programa SeqMan II, incluído no pacote DNASTAR (Burland 2000) para definição das seqüências-consenso de cada amostra.

### ***Controle de qualidade das seqüências***

A extrema sensibilidade das técnicas de amplificação de seqüências nucleotídicas pode levar a contaminação das amostras deste estudo entre si, com amostras de outros estudos previamente conduzidos no mesmo laboratório ou com cepas usadas em procedimentos laboratoriais. Todas as seqüências geradas neste estudo foram submetidas a um rigoroso controle de qualidade para buscar evidências de contaminação ou troca de amostras (Korber 1995, Learn 1996) e foram depositadas no banco de dados do *GenBank*, da Biblioteca Nacional de Medicina do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos.

### *Análise filogenética*

Para a determinação do subtipo viral, as seqüências geradas foram alinhadas com o programa Clustal X (Thompson 1997) frente a um conjunto de seqüências de referência, representativas dos subtipos conhecidos do grupo M do HIV-1, colhidas no banco de dados do Laboratório Nacional de Los Alamos, Estados Unidos (<http://www.hiv.lanl.gov/>). Com o programa BioEdit (Hall 1999), versão 5.09, pequenos ajustes manuais foram introduzidos, quando necessário, ao alinhamento e suas extremidades 5' e 3' foram aparadas. As inferências filogenéticas foram conduzidas no programa PAUP\*, versão 4.0b10 (Swofford 2002), com base em uma matriz de distância de DNA dos diversos *taxa* do alinhamento (Felsenstein 2004a), através do algoritmo de busca de árvores proposto por Saitou e Nei e conhecido por *neighbor-joining* (NJ) (Saitou & Nei 1987), observando o modelo de substituição nucleotídica F84 (Felsenstein 1984), que encerra 5 parâmetros e assume diferentes taxas de transição e transversão, com freqüências de base assimétricas. A robustez das ramificações da árvore filogenética foi avaliada através de análise de *bootstrap* (Felsenstein 1985), metodologia de inferência do suporte estatístico da monofilia de um determinado subconjunto de seqüências, com 100 ciclos de replicação. As árvores filogenéticas foram esquematicamente representadas através do programa Treeview (Page 1996).

Para as reconstruções que demandavam uma análise mais fina das inter-relações filogenéticas das seqüências em estudo, sobretudo quando guardavam grande semelhança genética entre si, como os *taxa* componentes de um cluster monofilético, utilizamos o princípio da máxima verossimilhança, que tenta inferir qual árvore maximiza a probabilidade de se observar um determinado conjunto de dados, no nosso caso o alinhamento das

seqüências nucleotídicas (Felsenstein 1973). As seqüências em estudo foram então realinhadas com seqüências-controle quantitativa e qualitativamente representativas, sempre que possível, do espectro de diversidade genética, tanto intra como intersubtipo, de acordo com o caso, da região geográfica estudada. Os ensaios de máxima verossimilhança foram conduzidos no programa PAUP\*, versão 4.0b10, tendo como ponto de partida uma árvore gerada por NJ. O modelo de substituição nucleotídica melhor ajustado ao conjunto de dados foi determinado pelo programa MODELTEST, versão 3.06 (Posada & Crandall 1998). Todos os modelos utilizados foram do tipo *time-reversible*, de forma que a taxa de substituição do nucleotídeo *x* para o nucleotídeo *y* é igual a do nucleotídeo *y* para o nucleotídeo *x*. Os parâmetros de cada modelo escolhido estão indicados nas legendas das árvores filogenéticas. A estratégia de busca de árvores seguiu o algoritmo *branch-swapping* (Felsenstein 2004b).

Todos os alinhamentos foram submetidos a análise do sinal filogenético, com pesquisa de saturação nucleotídica e hipermutação G→A. A presença de homoplasia ou saturação nucleotídica foi pesquisada com o programa DAMBE (Xia & Xie 2001), traçando-se um gráfico das transições e transversões versus a distância genética segundo o modelo F84. A presença de hipermutação G→A foi pesquisada com o programa HYPERMUT (Rose & Korber 2000), utilizando-se como referência a seqüência CD83ELI (acesso K02454). Apenas alinhamentos com bom sinal filogenético foram utilizados.

Todas as seqüências aqui geradas também foram, uma a uma, estudadas para a presença de recombinação intersubtipo através do método de *bootscanning* implementado no programa SIMPLOT, versão 2.5 (Salminen 1995). A análise foi conduzida em uma janela deslizante de 400 nucleotídeos de extensão (250 para *env*) da seqüência em estudo movendo-se, através de incrementos de 40 bases, frente a um alinhamento de seqüências de referência

representativas dos diversos subtipos do grupo M. Para cada janela, 100 ciclos de replicação de *bootstrap* foram conduzidos através do algoritmo de *neighbor-joining* usando os programas SEQBOOT, DNADIST (usando o modelo de dois parâmetros de Kimura (Kimura 1980)), NEIGHBOR, e CONSENSE contidos no pacote PHYLIP (Felsenstein 1989), e os valores de *bootstrap* foram visualizados frente as posições nucleotídicas do alinhamento de seqüências de referência.

### ***Representação gráfica de redes filogenéticas com o splitstree***

As seqüências recombinantes tendem a emitir sinais filogenéticos conflitantes, que muitas vezes não podem ser corretamente representados através de uma única árvore filogenética. Nestas situações, os métodos de inferência filogenética atualmente disponíveis se mostram incapazes de apropriadamente modelar as inter-relações filogenéticas entre um dado conjunto de *taxa*. Utilizamos então o software *splitstree* (Huson 1998, Huson & Bryant 2006), que incorpora o método de *split decomposition*, para obter representações gráficas das redes filogenéticas que nos possam ser de utilidade na demonstração visual das inter-relações filogenéticas conflitantes emitidas quando de eventos genéticos como a recombinação intersubtipo. A vantagem de uma tal representação gráfica é que a árvore filogenética pressupõe que os processos evolutivos subjacentes sempre ocorrem por vias que se bifurcam ou ramificam, ao passo que o gráfico de *splits* é mais flexível, uma vez que não impõe uma árvore filogenética aos sinais conflitantes.

### ***Análises bayesianas de coalescência***

Utilizamos métodos bayesianos de coalescência para estimar as taxas de substituição nucleotídica ( $\mu$ , substituições nucleotídicas por sítio e por ano, *subst/sítio/ano*) e as datas em

que existiram os ancestrais comuns mais recentes ( $T_{mrca}$ , anos) das seqüências de clusters monofiléticos. A inferência bayesiana é um ramo da inferência estatística que permite o uso de conhecimento prévio (*prior distribution*). As estimativas foram obtidas através do algoritmo MCMC (*Markov chain Monte Carlo*), implementado no programa BEAST, versão 1.3 (Drummond 2002, Drummond & Rambaut 2003). Utilizamos como distribuição *prior* as distribuições posteriores previamente obtidas para  $\mu$  ( $3,8 \times 10^{-3}$  to  $6,2 \times 10^{-3}$  *subst/sítio/ano*) em um estudo de 145 seqüências brasileiras da região C2V3/*env* colhidas entre 1989 e 2004 (Bello 2007). As análises foram conduzidas observando-se o modelo de substituição nucleotídica descrito por Hasegawa, Kishino e Yano (HKY) (Hasegawa 1985) com taxas de variação ao longo dos sítios seguindo uma distribuição gama e uma proporção dos sítios tida como invariável. Três cadeias de MCMC independentes foram rodadas para  $5 \times 10^6$  gerações para cada alinhamento. Os tamanhos amostrais efetivos (ESS, *effective sampling size*) para as estimativas foram superiores a 100.

### ***Estimativa da susceptibilidade aos anti-retrovirais***

O nível de susceptibilidade das seqüências de polimerase foi inferido através do algoritmo do banco de dados *Stanford HIV resistance* (Shafer 2000). O arquivo com as seqüências em formato *fasta* foi submetido, em linha, ao sítio eletrônico <http://hivdb.stanford.edu/>. O algoritmo de Stanford atribui para cada mutação um escore de resistência cujo conjunto é traduzido em 5 patamares de susceptibilidade inferida a cada fármaco: suscetível, susceptibilidade potencialmente diminuída em baixo grau, baixo grau de resistência, resistência intermediária e alta resistência.



Observaremos ainda a frequência de mutações ditas secundárias para resistência aos inibidores da protease em pacientes virgens de tratamento. Estas mutações, que não devem ser confundidas com resistência secundária ao tratamento, por si só não provocam queda da sensibilidade e geralmente emergem no gene da protease após o surgimento das mutações primárias, uma vez que tendem a melhorar o *fitness* replicativo viral. As mutações secundárias na protease também são comumente encontradas como polimorfismos em variantes nunca antes expostas aos anti-retrovirais. Sua capacidade de comprometer a eficácia dos esquemas terapêuticos, uma vez iniciados, vem sendo debatida. Consideraremos como mutações secundárias na protease aquelas descritas na mais recente revisão da *International AIDS Society* (Johnson 2006).

### ***Análises estatísticas***

O grupo de pacientes cujas amostras geraram seqüências que se agruparam em um cluster filogenético foi comparado estatisticamente com o grupo cujas seqüências não se mostraram abrigadas em um cluster. Dependendo do tipo de variável, utilizamos o teste não-paramétrico de Wicoxon ou o teste do qui-quadrado (Colton 1974). Lançamos mão da regressão logística multivariável para buscar variáveis independentemente associadas a variável resposta de pertencer ao grupo de pacientes cuja amostra gerou uma seqüência que se agrupou em um cluster filogenético. Estudamos como variáveis explanatórias o sexo, a idade, o estado civil, o local de nascimento e residência, a categoria de exposição, a escolaridade, estágio clínico de Aids, o registro de ter relação epidemiológica com outro paciente da casuística, além de antecedentes de uso de cocaína inalada.

Para a comparação de variáveis clínicas e epidemiológicas entre os três municípios de estudo, aplicamos o teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para  $k$  amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para variáveis categóricas e contínuas, respectivamente, pré-especificando como erro tipo I um valor de  $<0.01$  (Colton 1974, Sigel & Castellan 1988). Quando da rejeição da hipótese nula (de que os 3 grupos eram oriundos da mesma amostra ou população), conduzimos uma análise de resíduos para melhor definir onde exatamente estavam as diferenças significantes na tabela de contingência  $r \times k$  (Sigel & Castellan 1988). Também rodamos análises de regressão logística multivariada para determinar quais variáveis estavam independentemente associadas ao diagnóstico, quando da apresentação, de um estágio clínico definidor de Aids. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no programa R, versão 2.2 (Ihaka & Gentleman 1996, Fox 2002, Maindonald & Braun 2003, Crawley 2005).

### ***Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa***

O protocolo do estudo foi revisto e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, sob o número 0010.0.009.000-03.

## RESULTADOS

### *Características gerais da casuística dos três municípios (ANEXOS 3A e 3G)*

Entre julho de 1999 e maio de 2006, um total de 81 adultos HIV-1-positivos recebeu atendimento pelo Programa Municipal de HIV/Aids de Miracema. Entre outubro de 2001 e maio de 2006, o número de pacientes HIV-1-positivos atendidos pelos programas de Santo Antonio de Pádua e Saquarema foi, respectivamente, de 34 e 93. Dessa forma, um total de 208 pacientes adultos recebeu atenção médica neste três municípios. A razão de sexos de casos de infecção pelo HIV-1 foi de 1,6 em Saquarema, 1,0 em Miracema e 0,8 em Santo Antonio de Pádua (Tabela 02). Já a razão de sexos de casos de Aids foi, respectivamente de 3,5, 1,3, e 0,9.

A média de idade ( $\pm$  DP) quando da apresentação foi de 34,6 ( $\pm$  11,5) anos, com extremos de 16 e 74 anos de idade (Tabela 02). Vinte e três (11%) pacientes tinham mais de 50 anos de idade quando do diagnóstico de infecção pelo HIV-1. Mais de 90% eram residentes nos municípios em estudo e cerca de três quartos atribuíram a aquisição da infecção pelo HIV-1 ao contato heterossexual. Registramos casos isolados (cinco pacientes) de aquisição da infecção atribuída ao uso de drogas intravenosas, ao passo que 51 (24,5%) informaram antecedentes de uso de cocaína inalada. Mais de 70% da casuística tinha  $\leq$  8 anos de escolaridade. Apenas 11 (5,3%) pacientes informaram ter iniciado curso superior. Quase 60% dos pacientes iniciaram acompanhamento em estágios clínicos definidores de Aids. Entre 99 pacientes do sexo masculino, eram incircuncisos 90 (90.9%).

Observamos entre as complicações clínicas da Aids o registro freqüente de candidíase orofaríngea, anemia, síndrome consumptiva, insuficiência respiratória clinicamente

compatível com pneumocistose pulmonar, desordens focais do sistema nervoso central compatíveis com neurotoxoplasmose, tuberculose em atividade, entre outras (Eyer-Silva 2005b). Chamou atenção a alta frequência de neurocriptococose nos dois municípios do noroeste do estado. Entre 62 pacientes com estágio C do CDC em Miracema e Santo Antonio de Pádua, nove (14,5%) tiveram o diagnóstico microbiológico de neurocriptococose.

Comparamos as características demográficas, epidemiológicas, clínicas e comportamentais das casuísticas dos três municípios. Não encontramos diferenças estatisticamente significativas para a idade (tanto como variável contínua, como faixas de idade categorizadas), residência no município de estudo, escolaridade, categoria de exposição, frequência de estagio clínico definidor de Aids quando da apresentação e antecedentes de uso de cocaína inalada. Entretanto, registramos que os pacientes de Miracema tinham uma maior probabilidade de serem solteiros e os pacientes de Saquarema eram com maior frequência naturais de outros municípios, além de terem maior probabilidade de ter iniciado seu acompanhamento em outras cidades (Tabela 02).

Conduzimos ainda análises de regressão logística multivariada para determinar a existência de variáveis independentemente associadas ao diagnóstico, quando da apresentação, de um estágio clínico definidor de Aids. Observamos que ser um paciente do sexo masculino (razão de chance [OR] = 2,27; intervalo de confiança em 95% [IC] = 1,67 a 2,86;  $P = 0,007$ ), bem como ter uma idade maior (OR = 1,06; 95% IC = 1,03 a 1,09;  $P = 0,0004$ ) se mostraram características independentes associadas a estágios clínicos definidores de Aids quando da apresentação. Para a variável idade, cada incremento de 5 e de 10 anos resultava em uma razão de chance de 1,37 e 1,89, respectivamente.

**Tabela 02.** Dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e comportamentais de 208 pacientes adultos HIV-1-positivos acompanhados pelos Programas de HIV/Aids dos municípios de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, interior do estado do Rio de Janeiro, julho de 1999 a maio de 2006.

	<b>Saquarema</b> Out 01 – Maio 06 (n=93)	<b>S<sup>to</sup> Ant. Pádua</b> Out 01 – Maio 06 (n=34)	<b>Miracema</b> Jul 99 – Maio 06 (n=81)	<b>Total</b> Jul 99- Maio 06 (n=208)
<b>sexo feminino (n, %)</b>	35 (37,6%)	17 (50%)	44 (54,3%)	96 (46,4%)
<b>razão de sexos HM (infecção pelo HIV-1)</b>	1,6	1,0	0,8	1,1
<b>razão de sexos HM (casos de Aids)</b>	3,5	1,3	0,9	1,7
<b>idade (média ± DP)</b>	35,6 ± 12,2	36,8 ± 11,2	32,5±10,5	34,6±11,5
<b>faixa de idade (anos)</b>	18 - 74	23 - 58	16 - 63	16 - 74
≤20	4 (4,3%)	-	5 (6,2%)	9 (4,3%)
21-30	31 (33,3%)	14 (41,2%)	37 (45,6%)	82 (39,4%)
31-40	32 (34,4%)	8 (23,5%)	23 (28,4%)	63 (30,3%)
41-50	15 (16,1%)	6 (17,6%)	10 (12,3%)	31 (14,9%)
>50	11 (11,8%)	6 (17,6%)	6 (7,4%)	23 (11%)
<b>estado civil (n, %)</b>				
solteiro	43 (46,2%)	10 (29,4%)	56 (69,1%)*	109 (52,4%)
casado/divorciado/união cons/viúvo	50 (53,7%)	24 (70,6%)	25 (30,8%)	99 (47,6%)
<b>local de nascimento (n, %)</b>				
natural do município de estudo	23 (24,7%)	18 (52,9%)	61 (75,3%)	102 (49%)
município vizinho	14 (15%)	9 (26,4%)	11 (13,6%)	34 (16,3%)
outro município	56 (60,2%)*	7 (20,6%)	9 (11,1%)	72 (34,6%)
<b>local de residência (n, %)</b>				
residência no município de estudo	86 (92,4%)	30 (88,2%)	73 (90,1%)	189 (90,8%)
Outro	7 (7,5%)	4 (11,7%)	8 (9,9%)	19 (9,1%)
<b>escolaridade (n, %)</b>				
Nenhuma	8 (8,6%)	7 (20,6%)	10 (12,3%)	25 (12%)
< 8yr	56 (60,2%)	21 (61,7%)	46 (56,8%)	123 (59,1%)
≥ 8yr	29 (31,2%)	6 (17,6%)	24 (29,6%)	59 (28,3%)
não registrada	-	-	1 (1,2%)	1 (0,5%)
<b>categoria de exposição (n, %)</b>				
heterossexual	69 (74,2%)	31 (91,1%)	58 (71,6%)	158 (75,9%)
homo/bissexual	20 (21,5%)	3 (8,8%)	17 (21%)	40 (19,2%)
uso de drogas intravenosas	4 (4,3%)	-	1 (1,2%)	5 (2,4%)
não registrada	-	-	5 (6,2%)	5 (2,4%)
<b>estágio clínico definidor de Aids (n, %)</b>				
não	39 (41,9%)	11 (32,3%)	34 (42%)	84 (40,4%)
sim	54 (58%)	23 (67,6%)	47 (58%)	124 (59,6%)
<b>uso de cocaína inalada (n, %)</b>				
sim	27 (29%)	4 (11,7%)	20 (24,7%)	51 (24,5%)
não	66 (71%)	30 (88,2%)	54 (66,6%)	150 (72,1%)
não registrado	-	-	7 (8,6%)	7 (3,3%)
<b>iniciou acompanhamento alhures (n, %)**</b>				
sim	17 (18,3%)*	-	4 (4,9%)	21 (10,1%)

\* p<0,01

\*\* Antes da instituição do Programa de HIV/Aids de Santo Antonio de Pádua, os pacientes deste município seguiam acompanhamento na cidade de Itaperuna.

## **Epidemiologia molecular do HIV-1 no interior do estado do Rio de Janeiro**

### ***Totalização das amostras (ANEXOS 3C, 3D, 3E e 3H)***

Seqüências geradas de 158 amostras de pacientes em acompanhamento nos três municípios estudados mais detidamente foram incluídas nas análises de epidemiologia molecular. Destes pacientes, 63 estavam em acompanhamento em Miracema, 24 em Santo Antonio de Pádua e 71 em Saquarema. Para as amostras de Miracema, obtivemos seqüências de envelope e polimerase. Para as casuísticas de Santo Antonio de Pádua e Saquarema trabalhamos apenas com o gene da polimerase, dada a representatividade desta região genômica para estudos de cunho epidemiológico (Eyer-Silva & Morgado 2006). Para amostras selecionadas, como, por exemplo, a que veio a gerar seqüências de subtipo D, amplificamos e estudamos diversas regiões genômicas virais.

Tivemos ainda a oportunidade de estudar seqüências de polimerase recuperadas de amostras de 63 pacientes adicionais, em acompanhamento clínico em outros 26 municípios de regiões não metropolitanas do estado do Rio de Janeiro e em falência virológica aos seus respectivos esquemas anti-retrovirais. Dessa forma, totalizamos 221 amostras estudadas.

### ***Distribuição de subtipos (ANEXOS 3C, 3D, 3E e 3H)***

Registramos nas coortes estudadas quatro subtipos de HIV-1, grupo M, além de formas recombinantes intersubtipo. Dentre as amostras dos 158 pacientes em acompanhamento nos três municípios estudados mais detalhadamente, encontramos seqüências de HIV-1 representativas do subtipo B em 135 (85,4%), do sub-subtipo F1 (doravante denominado subtipo F1) em nove (5,7%), do CRF02\_AG em duas (1,2%), do

subtipo D em uma (0,6%), além de variantes recombinantes intersubtipo com regiões representativas dos subtipos B e F1 em 11 (6,9%). Entre as 63 polimerases recuperadas dos pacientes em acompanhamento nos demais 26 municípios não metropolitanos do estado, encontramos a presença do subtipo B em 55 (87,3%), F1 em cinco (7,9%), BF1 em dois (3,1%) e D em um (1,6%). A distribuição dos subtipos por município é mostrada na Tabela 03. O registro desta diversidade genética já é, por si só, indicativo de múltiplas introduções virais nos municípios estudados.

As Figuras 2 e 3 mostram estudos filogenéticos conduzidos com as seqüências de Saquarema e Santo Antonio de Pádua e Saquarema, que identificaram, respectivamente, a presença do CRF02\_AG e do subtipo D, variantes até então demonstradas apenas em casos isolados na capital do estado. As duas amostras saquaremenses que geraram seqüências representativas do CRF02\_AG foram colhidas de um casal heterossexual (pacientes 06BRSQ-88 e 06BRSQ-90) que descreveram nunca ter saído do país. O paciente do sexo masculino atribuiu a aquisição da infecção a contatos sexuais na cidade do Rio de Janeiro. Sua esposa sempre residiu em Saquarema. Esta é provavelmente a primeira evidência molecular de transmissão autóctone desta variante no Brasil. As amostras que geraram seqüências de subtipos não-B são indicadas na Tabela 04.

**Tabela 03.** Distribuição dos subtipos de HIV-1, grupo M, em seqüências geradas de 221 amostras de pacientes em acompanhamento no interior do estado do Rio de Janeiro, 2001-2006.

	Miracema	Pádua	Saquarema	26 municípios adicionais	Total
<b>Subtipo B</b>	58 (92%)	18 (75%)	59 (83,1%)	55 (87,3%)	<b>190 (86%)</b>
<b>Recombinantes BF1</b>	4 (6,3%)	3 (12,5%)	4 (5,6%)	2 (3,1%)	<b>13 (5,9%)</b>
<b>Subtipo F1</b>	1 (1,6%)	2 (8,3%)	6 (8,4%)	5 (7,9%)	<b>14 (6,3%)</b>
<b>CRF02_AG</b>	-	-	2 (2,8%)	-	<b>2 (0,9%)</b>
<b>Subtipo D</b>	-	1 (4,2%)	-	1 (1,6%)	<b>2 (0,9%)</b>
<b>Total</b>	63 (28,5%)	24 (10,8%)	71 (32,1%)	63 (28,5%)	<b>221</b>

**Tabela 04.** Seqüências de subtipos não-B geradas do universo de 221 amostras de pacientes em acompanhamento no interior do Estado do Rio de Janeiro, 2001-2006.

subtipos	amostras (genes estudados)
Subtipo F1	M59 ( $env^{F1}, pol^{F1}$ ), 04BRSAP07 ( $pol^{F1}$ ), 04BRSAP13 ( $pol^{F1}$ ), 05BRSQ-05 ( $pol^{F1}$ ), 04BRSQ-39 ( $pol^{F1}$ ), 05BRSQ-42 ( $pol^{F1}$ ), 05BRSQ-44 ( $pol^{F1}$ ), 05BRSQ-69 ( $pol^{F1}$ ), 06BRSQ-92 ( $pol^{F1}$ ), 03BRRJ124 ( $pol^{F1}$ ), 03BRRJ178 ( $pol^{F1}$ ), 04BRRJ147 ( $pol^{F1}$ ), 05BRRJ151 ( $pol^{F1}$ ), 05BRRJ263 ( $pol^{F1}$ )
Recombinantes BF1	M02 ( $pol^{BF1}, env^{F1}$ ), M08 ( $pol^{BF1}, env^{F1}$ ), M31 ( $pol^{BF1}, env^{F1}$ ), M36 ( $pol^{BF1}, env^B$ ), 05BRSAP09 ( $pol^{BF1}$ ), 05BRSAP23 ( $pol^{BF1}$ ), 05BRSAP09_PED ( $pol^{BF1}$ ), 06BRSQ-35 ( $pol^{BF1}$ ), 04BRSQ-46 ( $pol^{BF1}$ ), 04BRSQ-54 ( $pol^{BF1}$ ), 06BRSQ-89 ( $pol^{BF1}$ ), 03BRRJ237 ( $pol^{BF1}$ ), 05BRRJ164 ( $pol^{BF1}$ )
Subtipo D	04BRSAP19 ( $gag^D, pol^D, env^D, nef^D$ ), 05BRRJ095 (genoma completo <sup>D</sup> )
CRF02_AG	06BRSQ-88 ( $pol^{CRF02\_AG}$ ), 06BRSQ-90 ( $pol^{CRF02\_AG}$ )



**Figura 2.** Estudo filogenético pelo princípio da máxima verossimilhança de 71 seqüências de polimerase geradas a partir de amostras colhidas entre 2004 e 2006 da casuística de Saquarema. Os alinhamentos foram preparados com seqüências de referência do HIV-1, grupo M, colhidas no banco de dados do laboratório de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). As seqüências de referência estão indicadas como pontos negros. Clusters e casais filogeneticamente relacionados com suporte de *bootstrap* superior a 80 estão circundados e suas seqüências correspondentes são listadas. Os primeiros dois dígitos indicam o ano da coleta da amostra e o sufixo \_PED indica um paciente pediátrico. O casal de seqüências de CRF02\_AG (06BRSQ-88 e 06BRSQ-90) também está indicado em destaque. A árvore foi construída usando o modelo de substituição nucleotídica GTR (que especifica todos os oito parâmetros da matriz Q: freqüências de base diferentes, com taxas distintas para cada transição e cada transversão), com diferenças de taxas de substituição nucleotídica ao longo dos sítios obedecendo a uma distribuição gama, bem como uma fração dos sítios suposta como invariável (modelo GTR+I+G). A robustez dos ramos foi avaliada por análise de *bootstrap* com 1.000 ciclos de replicação. Os parâmetros do modelo foram os seguintes: freqüências nucleotídicas,  $f_A=0,4125$ ,  $f_C=0,1310$ ,  $f_G=0,2117$ ,  $f_T=0,2448$ ; valores da matriz R,  $R_{A\leftrightarrow C}=2,8404$ ,  $R_{A\leftrightarrow G}=9,2035$ ,  $R_{A\leftrightarrow T}=0,7296$ ,  $R_{C\leftrightarrow G}=1,7363$ ,  $R_{C\leftrightarrow T}=15,0106$ ,  $R_{G\leftrightarrow T}=1$ . A proporção de sítios invariáveis foi de 46,16% e o parâmetro gama de variação de substituição ao longo dos sítios foi de 1,04. Os gráficos de *bootscanning* representando as relações de similaridade dos recombinantes intersubtipo BF1 a seqüências representativas de subtipos do grupo M (F1 em negro, B em cinza claro) também são mostrados. A análise foi conduzida sob uma janela com extensão de 400 nucleotídeos deslizando ao longo de um alinhamento de seqüências de referência através de incrementos de 40 nucleotídeos.

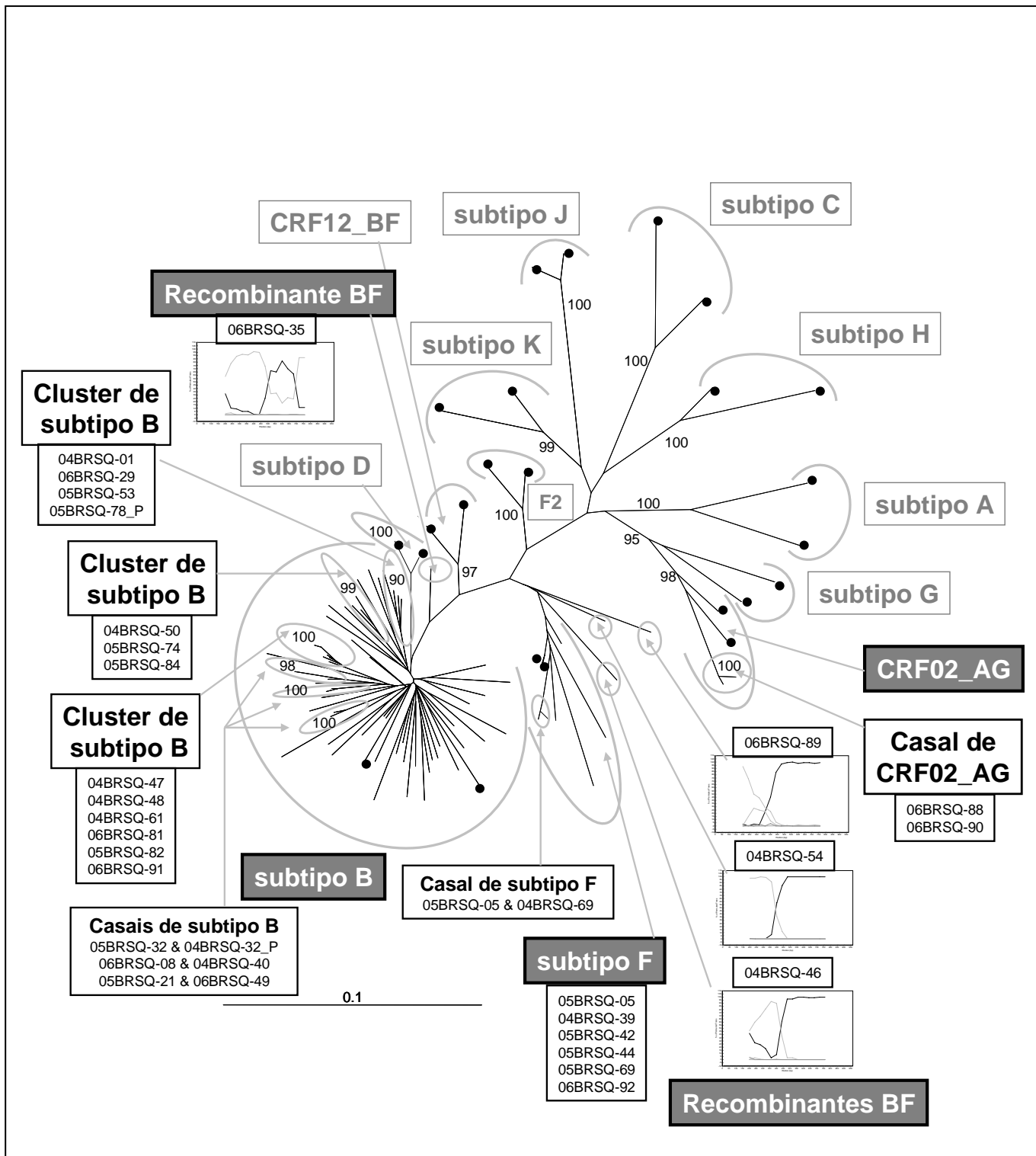


FIGURA 2

**Figura 3.** Análise filogenética baseada em uma matriz de distancia de DNA de 87 seqüências de polimerase do HIV-1 geradas a partir de amostras de pacientes em acompanhamento em Santo Antonio de Pádua, além de amostras de pacientes em falência virológica referidos de outras 26 cidades do interior do estado do Rio de Janeiro, entre 2003 e 2006. Duas seqüências identificadas como subtipo D estão indicadas: 04BRSAP19, de Santo Antonio de Pádua, e 05BRRJ095, de um paciente da sub-região norte do estado, pertencente a uma outra casuística de nosso laboratório. Os alinhamentos foram preparados com seqüências de referência do HIV-1, grupo M, obtidas do banco de dados do Laboratório de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). As seqüências de referencia estão representadas como pontos negros. Clusters filogenéticos com suporte de *bootstrap* superior a 80 estão circundados e as seqüências intracluster estão listadas. Os gráficos de *bootscanning* indicando a similaridade das formas recombinantes BF1 com as seqüências representativas dos subtipos de grupo M (F1 em negro, B em cinza claro) também são mostrados. A análise foi conduzida em uma janela deslizante de 400 nucleotídeos da seqüência em estudo movendo-se ao longo de um alinhamento das seqüências de referência através de incrementos de 40 nucleotídeos.

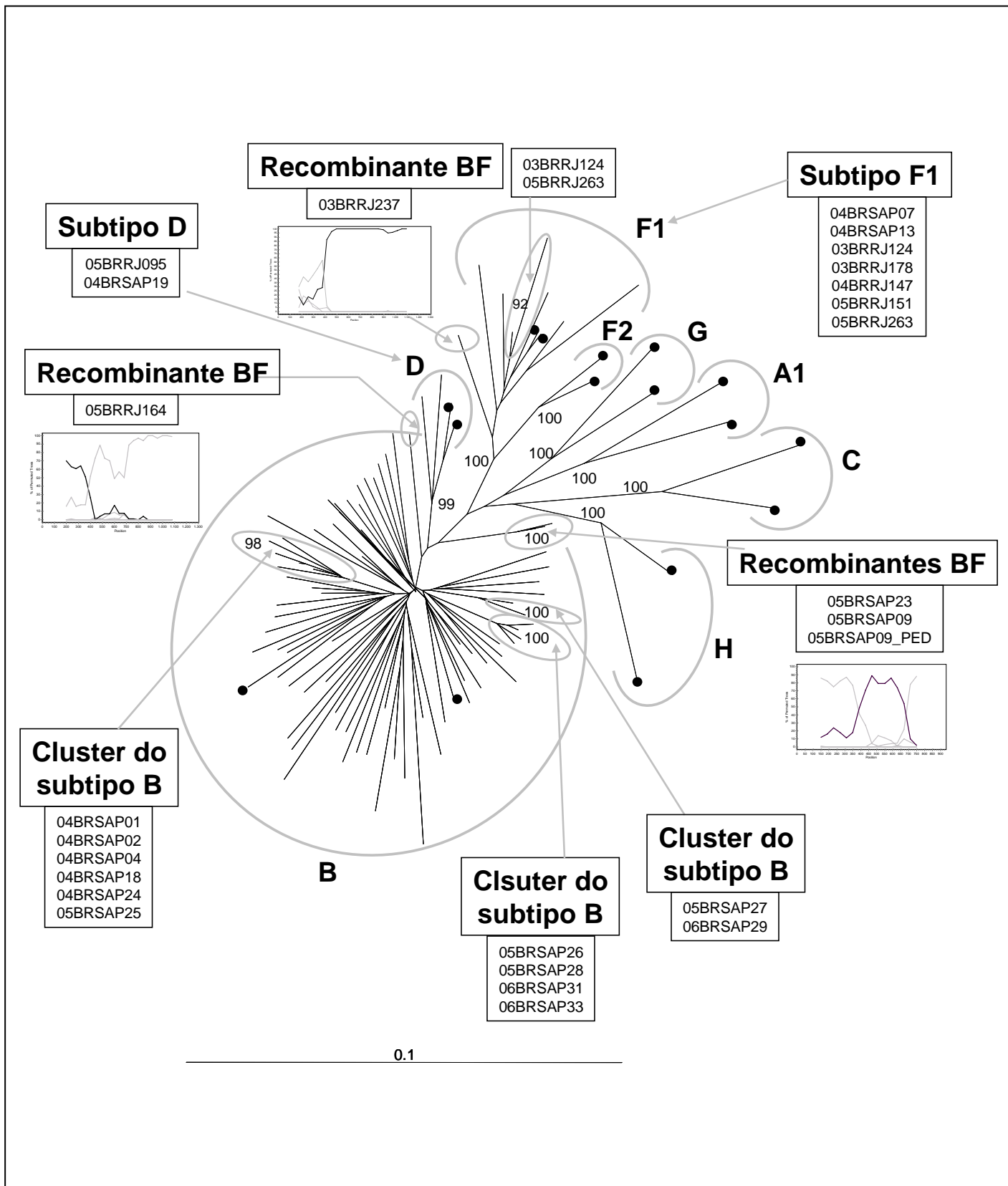


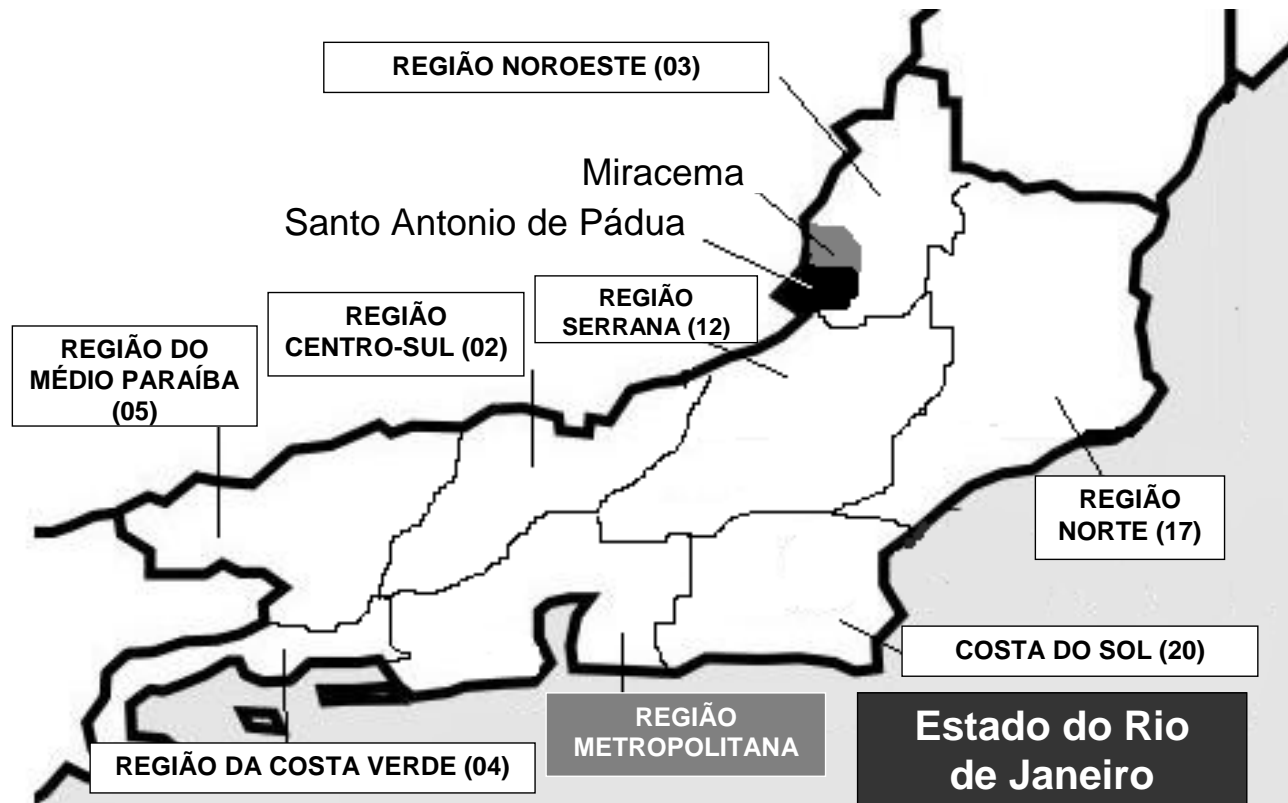
FIGURA 3

Por ocasião da análise filogenética das seqüências de Santo Antonio de Pádua, tivemos a oportunidade de estudar um conjunto adicional de 63 seqüências de polimerase oriundas de um estudo em curso em nosso laboratório, geradas de amostras de pacientes residentes em 26 cidades do interior do estado do Rio de Janeiro, que estavam em falência virológica aos seus esquemas anti-retrovirais entre os anos de 2003 e 2005 (Eyer-Silva 2007b). As Figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, a reconstrução filogenética resultante e a distribuição geográfica das seqüências analisadas. Observemos que outra seqüência de subtipo D, desta vez gerada de um paciente da sub-região norte do estado, também foi reconhecida.

#### ***Ocorrência de clusters monofiléticos (ANEXOS 3C, 3D e 3H)***

Obtivemos perfis moleculares polifiléticos, um indicativo de que múltiplas introduções virais ocorreram nas regiões estudadas. Adicionalmente, observamos nas casuísticas dos três municípios a ocorrência de clusters monofiléticos, consistentes com a introdução bem sucedida e subsequente disseminação de determinadas variantes virais. Um total de seis clusters foi registrado na casuística de Miracema, envolvendo amostras de 29 (46%) entre 63 pacientes, dois clusters na casuística de Santo Antonio de Pádua, envolvendo amostras de 10 (41,6%) entre 24 pacientes, e três clusters na casuística de Saquarema, envolvendo amostras de 13 (18,3%) entre 71 pacientes (Eyer-Silva & Morgado 2006, Eyer-Silva 2007b e ANEXO 3H). A Tabela 05 discrimina as amostras que vieram a gerar seqüências que se agruparam em algum cluster monofilético.

**Figura 4.** Mapa do estado do Rio de Janeiro com suas sete sub-regiões do interior. As 24 seqüências de polimerase de santo Antonio de Pádua foram estudadas em conjunto com 63 outras seqüências geradas de pacientes em tratamento em outras cidades do interior do estado. O número de amostras de cada sub-região está indicado.



**FIGURA 4**

**Tabela 05.** Amostras das casuísticas de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema que geraram seqüências que vieram a se agrupar em casais ou clusters filogenéticos. Amostras de pacientes cuja relação epidemiológica era previamente conhecida estão sublinhadas.

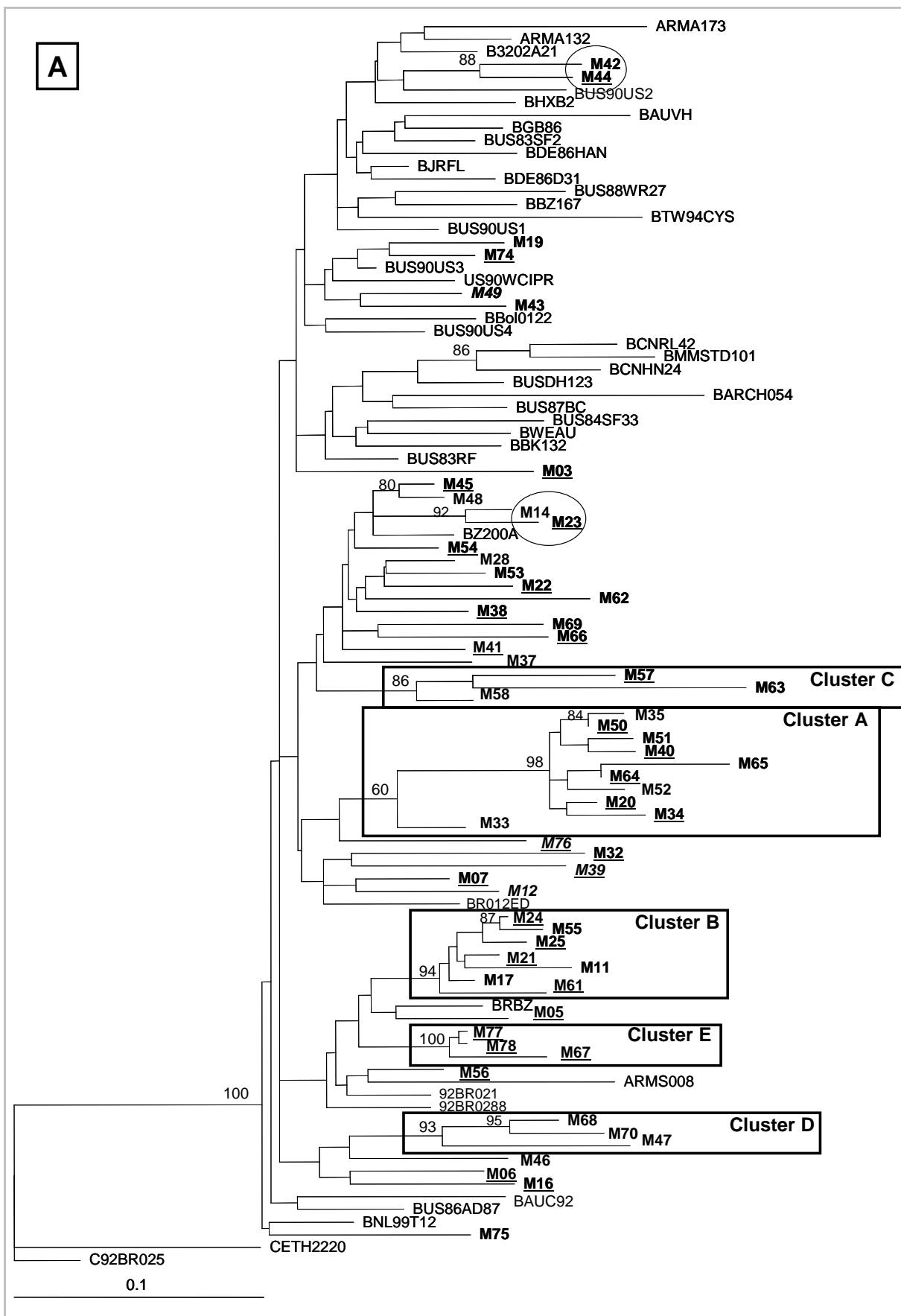
Município	Seqüências filogeneticamente relacionadas
<b>Miracema (n=63)</b>	
Cluster M-A (n=10)	M20, M33, M34, <u>M35, M50</u> , M40, M51, M52, <u>M64, M65</u>
Cluster M-B (n=7)	<u>M11, M21</u> , M17, M24, <u>M25, M55</u> , M61
Cluster M-C (n=3)	<u>M57, M58</u> , M63
Cluster M-D (n=3)	M47, <u>M68, M70</u>
Cluster M-E (n=3)	M67, M77, M78
Cluster M-F (n=3)	<u>M02, M08</u> , M31
Casal 1	<u>M14, M23</u>
Casal 2	<u>M42, M44</u>
<b>Sto. Ant. Pádua (n=24)</b>	
Cluster SAP-A (n=6)	04BRSAP01, 04BRSAP02, 04BRSAP04, 04BRSAP18, <u>04BRSAP24, 05BRSAP25</u>
Cluster SAP-B (n=4)	05BRSAP26, 05BRSAP28, <u>06BRSAP31, 06BRSAP33</u>
Casal 1	<u>05BRSAP27, 06BRSAP29</u>
Casal 2 e filho	<u>05BRSAP09, 05BRSAP23, 05BRSAP23_PED</u>
<b>Saquarema (n=71)</b>	
Cluster 1 (n=6)	<u>04BRSQ-47, 04BRSQ-48, 04BRSQ-61, 06BRSQ-81, 05BRSQ-82, 06BRSQ-91</u>
Cluster 2 (n=4)	<u>04BRSQ-01, 05BRSQ-53</u> , 06BRSQ-29, 05BRSQ-78_PED
Cluster 3 (n=3)	04BRSQ-50, 05BRSQ-74, 05BRSQ-84
Casal 1	<u>05BRSQ-32, 04BRSQ-32_PED</u>
Casal 2	<u>06BRSQ-08, 04BRSQ-40</u>
Casal 3	<u>05BRSQ-21, 06BRSQ-49</u>
Casal 4	<u>05BRSQ-05, 04BRSQ-69</u>
Casal 5	<u>06BRSQ-88, 06BRSQ-90</u>

### ***Comparação dos resultados dos estudos filogenéticos do envelope e da polimerase na casuística de Miracema (ANEXO 3D)***

Também comparamos os resultados dos ensaios filogenéticos conduzidos com seqüências nucleotídicas da região hipervariável do envelope com aqueles conduzidos com as seqüências do gene consideravelmente mais conservado da polimerase (Eyer-Silva & Morgado 2006). Embora sustentada por valores de *bootstrap* em geral menos robustos, o resultado da reconstrução filogenética do envelope se mostrou semelhante ao da polimerase, tanto para a topologia da árvore como para as inter-relações filogenéticas (Figura 5). A presença de mutações associadas a uma sensibilidade diminuída aos inibidores da transcriptase reversa e da protease tampouco pareceu obscurecer ou artificialmente criar relações filogenéticas.

**Figura 5.** Estudos filogenéticos sob o princípio da máxima verossimilhança das seqüências de envelope (A) e da polimerase (B) de subtipo B da casuística de Miracema. Os alinhamentos foram preparados com seqüências de referência representativas do subtipo B colhidas na base de dados do laboratório de Los Alamos e as árvores foram aterradas com duas seqüências de subtipo C. Para o alinhamento da polimerase, o conjunto controle incluiu 21 seqüências geradas de amostras do Rio de Janeiro (Brindeiro 2002). As árvores foram construídas usando-se o modelo GTR+I+G de substituição nucleotídica. A robustez dos ramos foi avaliada através de análise de *bootstrap* com 1000 ciclos de replicação. Os cinco clusters filogenéticos do subtipo B estão indicados. No estudo do envelope (**5A**), as seqüências geradas de pacientes do sexo feminino estão sublinhadas e as de pacientes residentes na cidade vizinha de Santo Antonio de Pádua estão em itálico. No estudo da polimerase (**5B**), as seqüências geradas de amostras de pacientes em estágios clínicos definidores de Aids estão indicadas com um asterisco e as mutações que conferem sensibilidade diminuída aos inibidores da transcriptase reversa e da polimerase estão indicadas nas caixas de fundo cinza claro e escuro, respectivamente.





**FIGURA 5A**

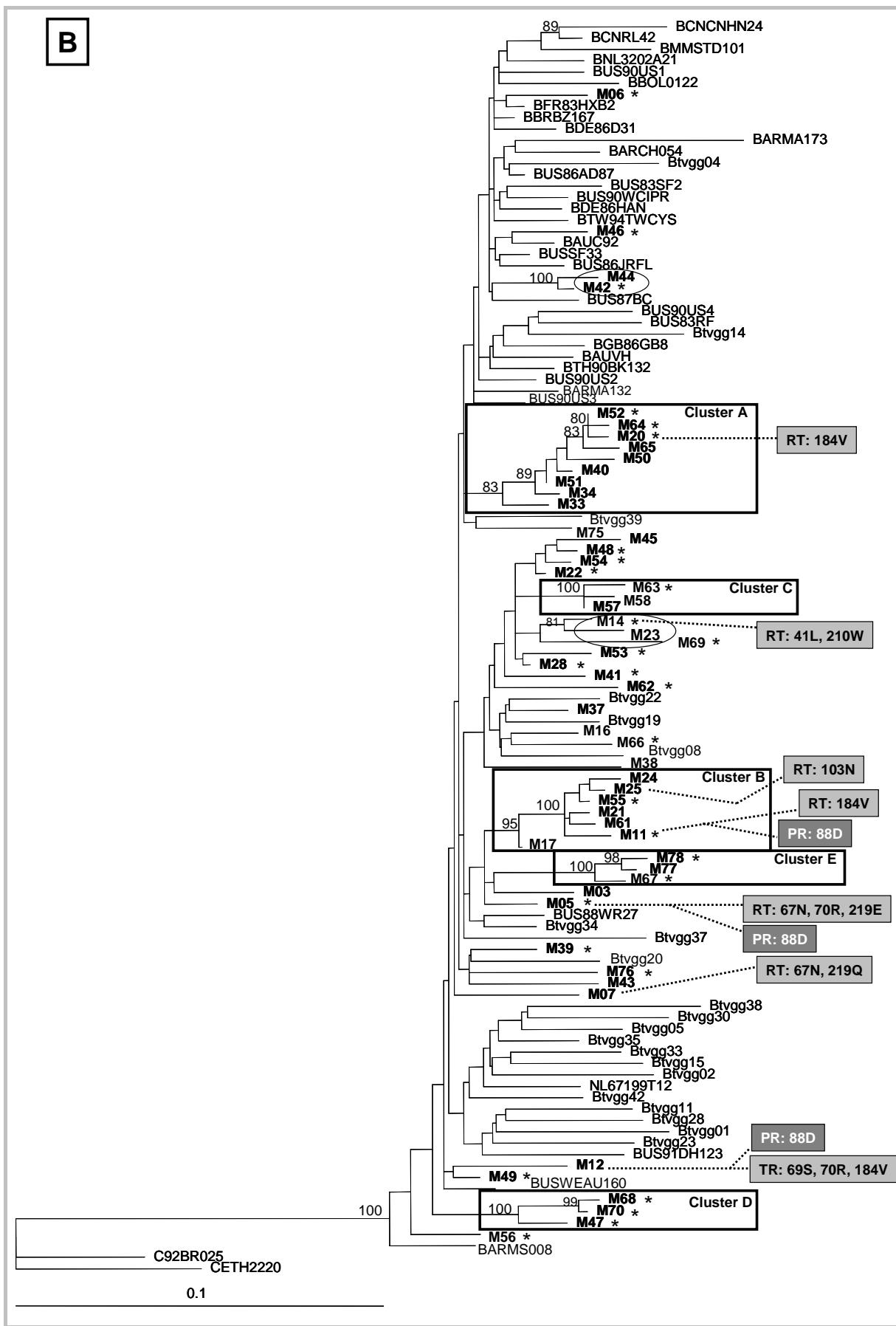


FIGURA 5B

***Inter-relações filogenéticas entre seqüências de municípios vizinhos (ANEXO 3E)***

A proximidade geográfica entre os municípios de Miracema e Santo Antonio de Pádua, cujos centros urbanos distam apenas 13Km, nos deu a oportunidade de comparar filogeneticamente seqüências geradas em duas cidades vizinhas e melhor entender as rotas de disseminação viral na região. Tivemos como objetivo investigar se os clusters da casuística de Santo Antonio de Pádua são filogeneticamente relacionados aos de Miracema, representando então redes de transmissão viral de amplitude geográfica maior, representativas da sub-região Noroeste do estado do Rio de Janeiro, ou alternativamente, se são cadeias de transmissão independentes, a sugerir que cada uma destas pequenas cidades abriga seus próprios conjuntos de linhagens micro-epidêmicas (Eyer-Silva 2007b).

Para tal, conduzimos análises filogenéticas utilizando o critério da máxima verossimilhança com um alinhamento que simultaneamente incluiu todas as polimerases representativas do subtipo B geradas nos dois municípios: 54 da coorte de Miracema e 18 de Santo Antonio de Pádua. Sendo vizinhas estas duas cidades, não poderíamos encontrar conjunto de seqüências de controle local mais conveniente do que as de um município representando o controle do outro.

Os resultados (Figura 6) mostram uma total independência filogenética entre os clusters de cada município, sugerindo que, apesar de serem tão próximas, cada uma destas duas cidades abriga suas próprias redes de transmissão, em um padrão molecular que sugere a existência de múltiplas micro-epidemias, cada qual originada pela introdução de variantes virais distintas.

**Figura 6.** Estudo filogenético conduzido segundo o critério da máxima verossimilhança das seqüências de Santo Antonio de Pádua identificadas como representativas do subtipo B, utilizando-se como controle as 54 seqüências de subtipo B da cidade vizinha de Miracema e duas seqüências de subtipo C como *outgroups*. A árvore foi construída usando o modelo TVM de substituição nucleotídica (que assume freqüências de base diferentes, bem como um viés transição-transversão, com taxas diferentes para cada uma das quatro transversões) com taxa de variação ao longo dos sítios obedecendo a uma distribuição gama, além de uma fração dos sítios tida como invariável (modelo TVM+I+G). A robustez da árvore foi avaliada através de análise de bootstrap com 1.000 ciclos de replicação. Os parâmetros do modelo foram os seguintes: freqüências de nucleotídeos,  $f_A=0,4035$ ,  $f_C=0,1571$ ,  $f_G=0,1936$ ,  $f_T=0,2458$ ; valores da matriz R,  $R_{A\leftrightarrow C}=2,0858$ ,  $R_{A\leftrightarrow G}=10,2819$ ,  $R_{A\leftrightarrow T}=0,7053$ ,  $R_{C\leftrightarrow G}=1,2288$ ,  $R_{C\leftrightarrow T}=10,2819$ ,  $R_{G\leftrightarrow T}=1$ . A proporção de sítios invariáveis foi de 48,8% e o parâmetro gama de 1,11. Os clusters filogenéticos de Santo Antonio de Pádua (SAP-A e SAP-B) e de Miracema (M-A a M-E) estão destacados. Os casais de seqüências filogeneticamente relacionadas estão circundados.

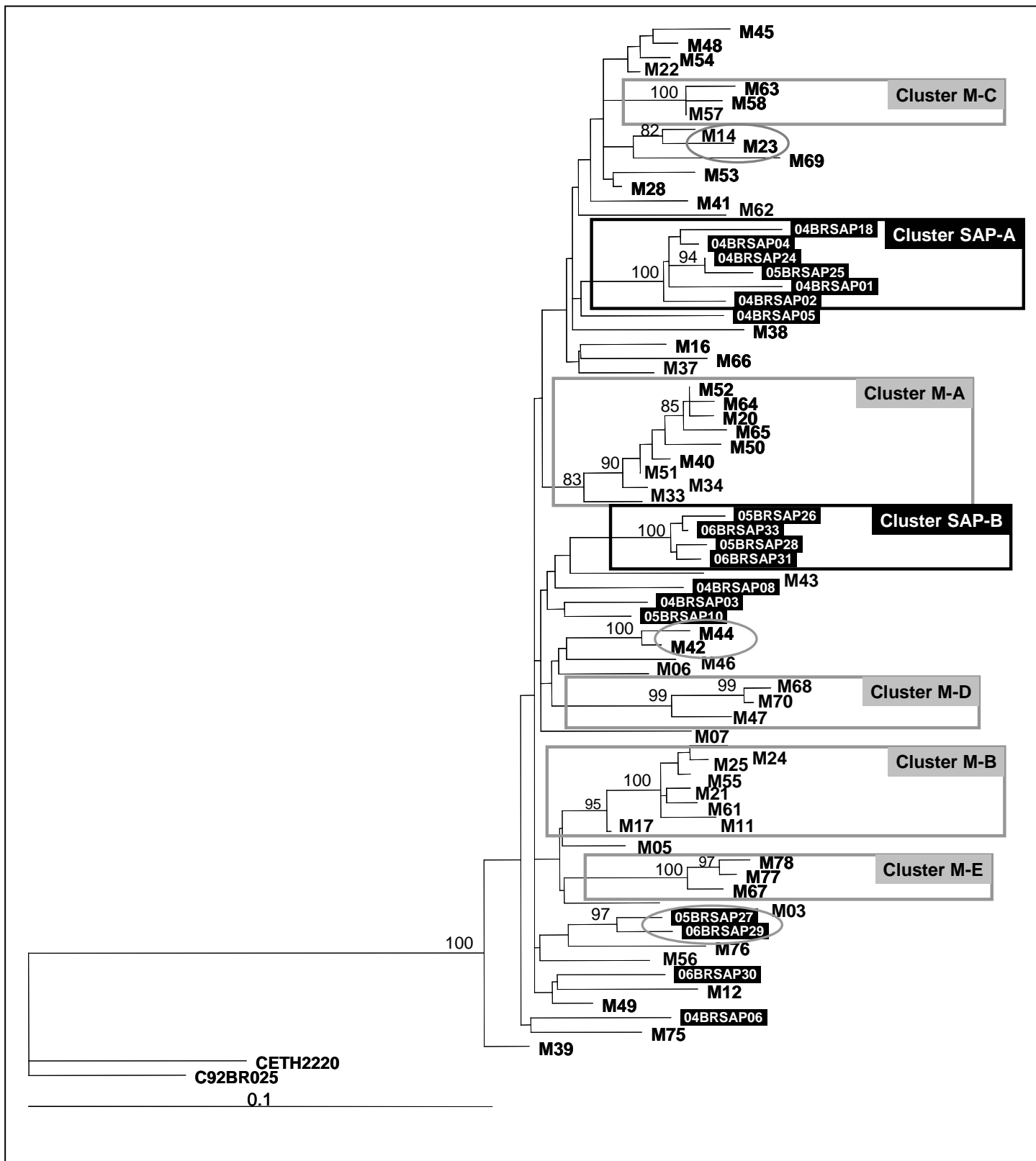


FIGURA 6

***Estimativa bayesiana da data em que existiram os ancestrais comuns mais recentes das variantes de subtipo B que desencadearam as duas maiores redes de transmissão de Miracema (ANEXO 3F)***

Lançando mão da metodologia bayesiana para análises de coalescência, procuramos estimar as taxas de substituição nucleotídica ( $\mu$ , substituições nucleotídicas por sítio e por ano, *subst/sítio/ano*) e as datas em que estavam em circulação os ancestrais comuns mais recentes ( $T_{mrca}$ , anos) que originaram os dois maiores clusters da casuística de Miracema (Eyer-Silva 2007a). Utilizamos o alinhamento das seqüências da região hipervariável do envelope, geradas de amostras colhidas entre 2001 e 2004. O alinhamento estava livre de *gaps* e não apresentava sinais de recombinação intersubtipo, saturação nucleotídica ou hipermutação G→A. As estimativas encontradas são mostradas na Tabela 06.

**Tabela 06.** Estimativas bayesianas das taxas de substituição nucleotídica ( $\mu$ , substituições sítio<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>) e da data em que existiram os ancestrais comuns mais recentes ( $T_{mrca}$ , ano) dos clusters A e B de Miracema.

	<b>Cluster A</b>	<b>Cluster B</b>
<b><math>\mu</math> (95%HPD)</b>	$5,2 \times 10^{-3}$ ( $4,1 \times 10^{-3}$ - $6,2 \times 10^{-3}$ )	$5,2 \times 10^{-3}$ ( $4,1 \times 10^{-3}$ - $6,2 \times 10^{-3}$ )
<b><math>T_{mrca}</math> (95%HPD)</b>	1991 (1986-1995)	1992 (1988-1996)

HPD: do inglês, *highest posterior probability* (intervalos extremos das estimativas da densidade posterior)

***Variáveis independentemente associadas aos clusters filogenéticos (ANEXOS 3D e 3H)***

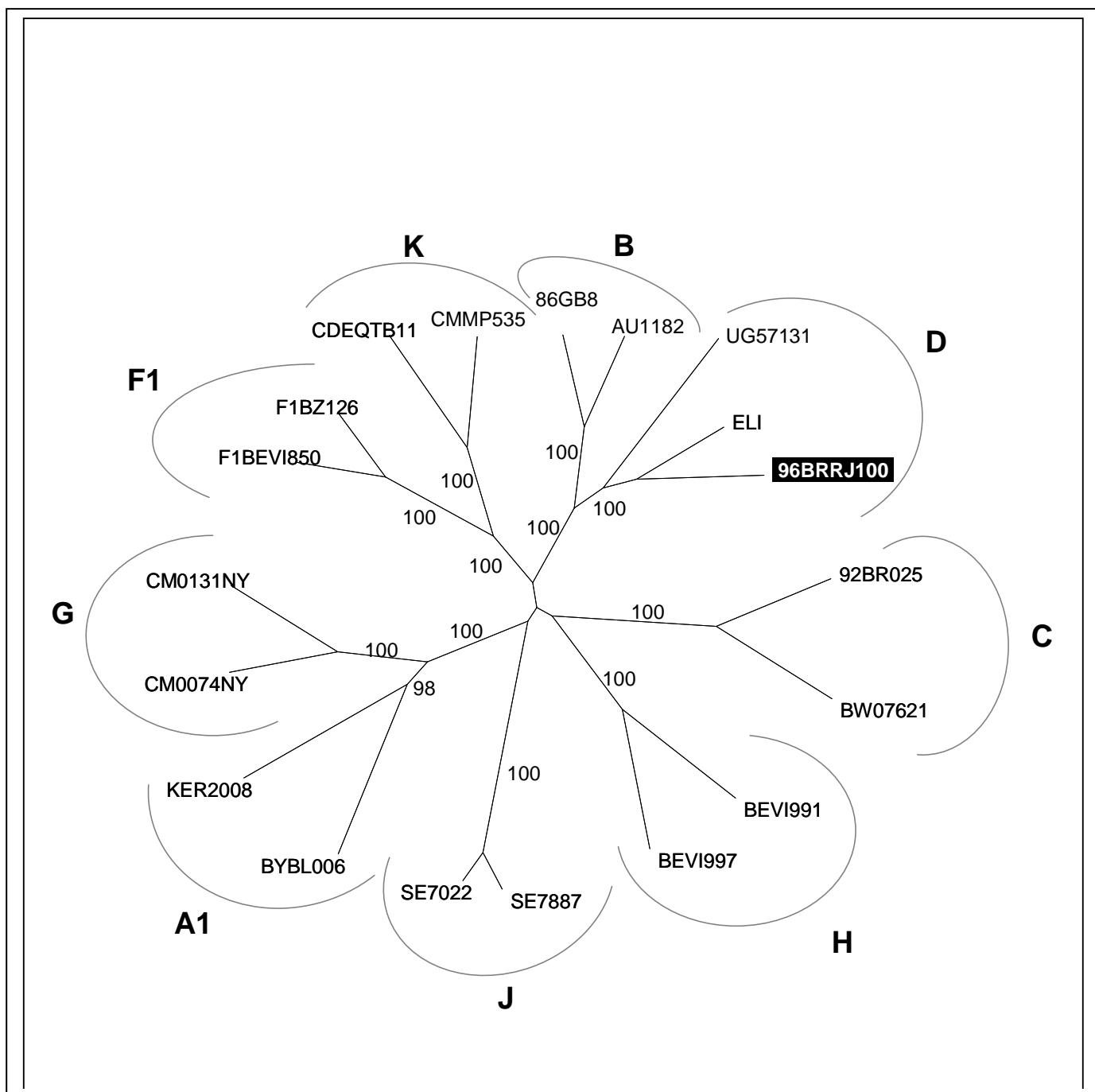
Os pacientes cujas amostras geraram seqüências que vieram a se agrupar em um dos clusters filogenéticos foram comparados com aqueles cujas amostras geraram seqüências não associadas aos clusters. Estas análises foram conduzidas para as duas maiores casuísticas do estudo: Miracema e Saquarema. Para ambas as coortes, as análises univariadas mostraram que

as seqüências abrigadas em cluster foram mais provavelmente geradas de amostras de pacientes jovens, cuja relação epidemiológica com outro membro da casuística era previamente conhecida e que sempre residiram no município. Em análises multivariadas de regressão logística, as variáveis *relação epidemiológica conhecida com outro membro da casuística* e *ter sempre residido no município* se mostraram independentemente associadas aos pacientes cujas amostras geraram seqüências contidas em um dos clusters (Eyer-Silva & Morgado 2006 e ANEXO 3H).

### ***Estudo genético das seqüências geradas da amostra 04BRSAP19 (ANEXO 3C)***

As seqüências geradas da amostra paduana 04BRSAP19 se mostraram representativas do subtipo D do grupo M, raríssima variante previamente descrita na capital do estado (Morgado 1998, Guimaraes 2002), e mereceram análises específicas com o objetivo de investigar sua origem e rotas de disseminação (Couto-Fernandez 2006). Para tal, as seqüências oriundas desta amostra foram estudadas conjuntamente com outras quatro variantes representativas do mesmo subtipo identificadas em outros estudos conduzidos em nosso laboratório. Ao todo tínhamos quatro variantes autóctones e uma não-autóctone. Esta última, 98BRRJ045, havia sido gerada de uma amostra colhida em 1998 na cidade do Rio de Janeiro de uma imigrante angolana (Guimaraes 2002). As demais seqüências autóctones foram obtidas de amostras colhidas de um paciente do Rio de Janeiro que estava em estágio avançado de Aids em 1996 (96BRRJ100) e de pacientes em falência virológica a seus esquemas terapêuticos no Rio de Janeiro em 2004 (04BRRJ135) e em um município da sub-região norte do estado em 1995 (05BRRJ095). O seqüenciamento completo da 96BRRJ100 confirmou sua natureza não-recombinante e sua representatividade ao subtipo D (Figura 7).

**Figura 7.** Estudo filogenético conduzido pelo princípio da máxima verossimilhança situa o genoma quase completo da seqüência 96BRRJ100 no ramo representativo do subtipo D. A árvore foi construída utilizando-se o modelo GTR+I+G de substituição nucleotídica e a robustez dos ramos foi inferida através de análise de *bootstrap* com 1.000 replicações.



**FIGURA 7**



As demais seqüências foram estudadas a partir da geração de grandes fragmentos nucleotídicos dos genes *gag*, *pol* (compreendendo as regiões da protease, transcriptase reversa e integrase), *env* (C2V3, gp41) e *nef*. Para obtenção do maior sinal filogenético possível, estes fragmentos foram concatenados em uma única seqüência de 3.902 bases de comprimento e alinhados frente ao maior número de seqüências de referência do subtipo D disponível no banco de dados do Laboratório de Los Alamos. O alinhamento foi previamente checado para nos certificarmos da ausência de interferências associadas a saturação nucleotídica, hipermutação G→A e recombinação intersubtipo.

A reconstrução filogenética do alinhamento concatenado mostrou que as seqüências autóctones brasileiras compartilham um ancestral comum relativamente recente com seqüências sul-africanas, um país onde este subtipo ocorre apenas em casos isolados (Figura 8). Formam um cluster monofilético sustentado por *bootstrap* de 100 e também parecem ter alguma ancestralidade com variantes descritas na República Democrática do Congo e, de forma mais distante, no Chade e na República dos Camarões. Já as seqüências descritas em países da África Oriental, como Uganda, Tanzânia e Quênia, pertencem a outro ramo filogenético sustentado por *bootstrap* de 99. Neste estudo concatenado a seqüência brasileira não-autóctone parece não guardar relação genética mais estreita com qualquer das demais (Figura 8).

Entretanto, o universo de seqüências de subtipo D conhecidas e disponíveis para análise vai muito além dos genomas completos ou quase completos. Para que nossas análises comparativas não ficassem restritas a estes, conduzimos estudos adicionais para cada fragmento genômico gerado, lançando mão do universo de seqüências parciais de subtipo D depositadas no banco de dados de Los Alamos. Cada região genômica contemplada em nosso estudo mereceu reconstruções filogenéticas próprias, tendo como seqüências de referência o

maior quantitativo numérico e a maior abrangência geográfica possível, incluindo as seqüências previamente selecionadas pela ferramenta de busca BLAST como sendo as de maior similaridade genética com as variantes brasileiras.

Estas análises mostraram, por exemplo, que diversas outras seqüências sul-africanas disponíveis apenas na região do envelope (85ZA500, 85ZA501, 85ZA505, 85ZA506 e 85ZA507) confirmavam a associação filogenética das variantes daquele país com as seqüências brasileiras autóctones e se agrupavam em um único cluster monofilético sustentado por valores significativos de *bootstrap* (árvore não apresentada). Também as distâncias nucleotídicas estimadas pelo programa MEGA confirmavam a similaridade genética entre as seqüências brasileiras autóctones e sul-africanas.

As análises das regiões genômicas parciais também mostraram uma inesperada relação filogenética entre a seqüência brasileira não-autoctone e uma seqüência *env* finlandesa (FI93178) gerada em 1993 de amostra de um paciente de origem africana cujo exato país de origem, infelizmente, não ficou registrado. A reconstrução filogenética deste estudo, um alinhamento concatenado C2V3/*env*-gp41/*env* é mostrada na Figura 9. Observamos que esta associação sustenta-se com um significativo *bootstrap* de 99.

**Figura 8.** Estudo filogenético pelo princípio da máxima verossimilhança do alinhamento concatenado contendo as regiões genômicas *gag*, protease, transcriptase reversa, integrase, *C2V3/env*, *gp41/env* e *nef* das cinco seqüências brasileiras representativas do subtipo D (indicadas em destaque), alinhadas frente a 43 seqüências de referência, disponíveis em genoma completo ou quase completo, colhidas no banco de dados do laboratório de Los Alamos, e aterradas com duas seqüências do subtipo C. A árvore foi construída utilizando-se o modelo GTR+I+G de substituição nucleotídica. Os parâmetros do modelo foram: frequência de bases,  $f_A=0,3802$ ,  $f_C=0,1731$ ,  $f_G=0,2211$ ,  $f_T=0,2256$ ; valores da matriz R,  $R_{A\leftrightarrow C}=1,9169$ ,  $R_{A\leftrightarrow G}=4,5312$ ,  $R_{A\leftrightarrow T}=0,8117$ ,  $R_{C\leftrightarrow G}=1,2073$ ,  $R_{C\leftrightarrow T}=6,6478$ ,  $R_{G\leftrightarrow T}=1$ . A proporção de sítios invariáveis foi de 31,75% e o parâmetro gama de variação das taxas de substituição ao longo dos sítios foi de 0,7122. A robustez dos ramos foi estimada através de análise de *bootstrap* com 1.000 ciclos de replicação. Pode-se observar o cluster monofilético formado entre as seqüências brasileiras autóctones e as seqüências sul-africanas (prefixo ZA). Observa-se ainda a similaridade genética entre duas seqüências brasileiras geradas a partir de amostras colhidas com intervalo de tempo de nove anos: 06BRRJ100 e 05BRRJ095.

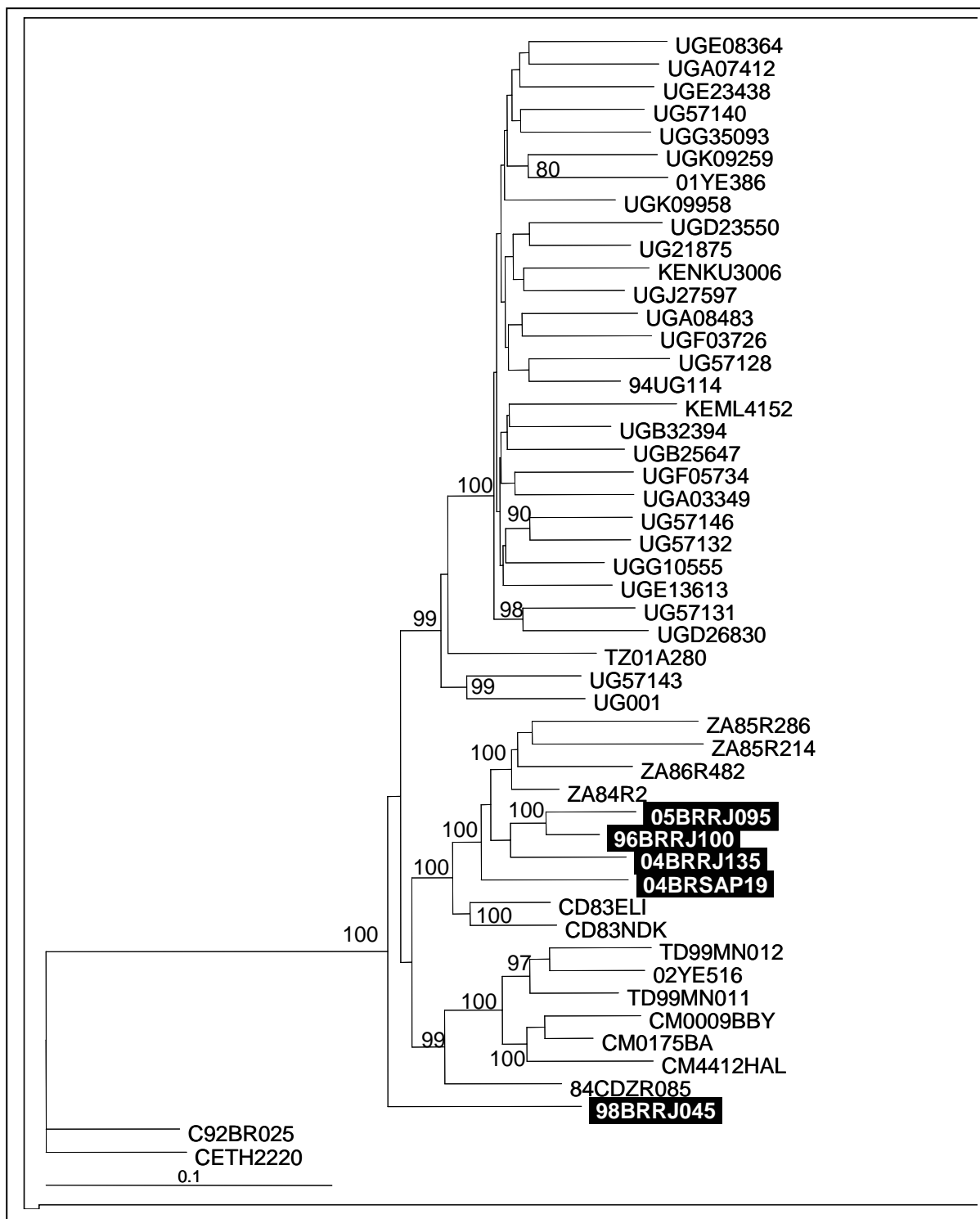
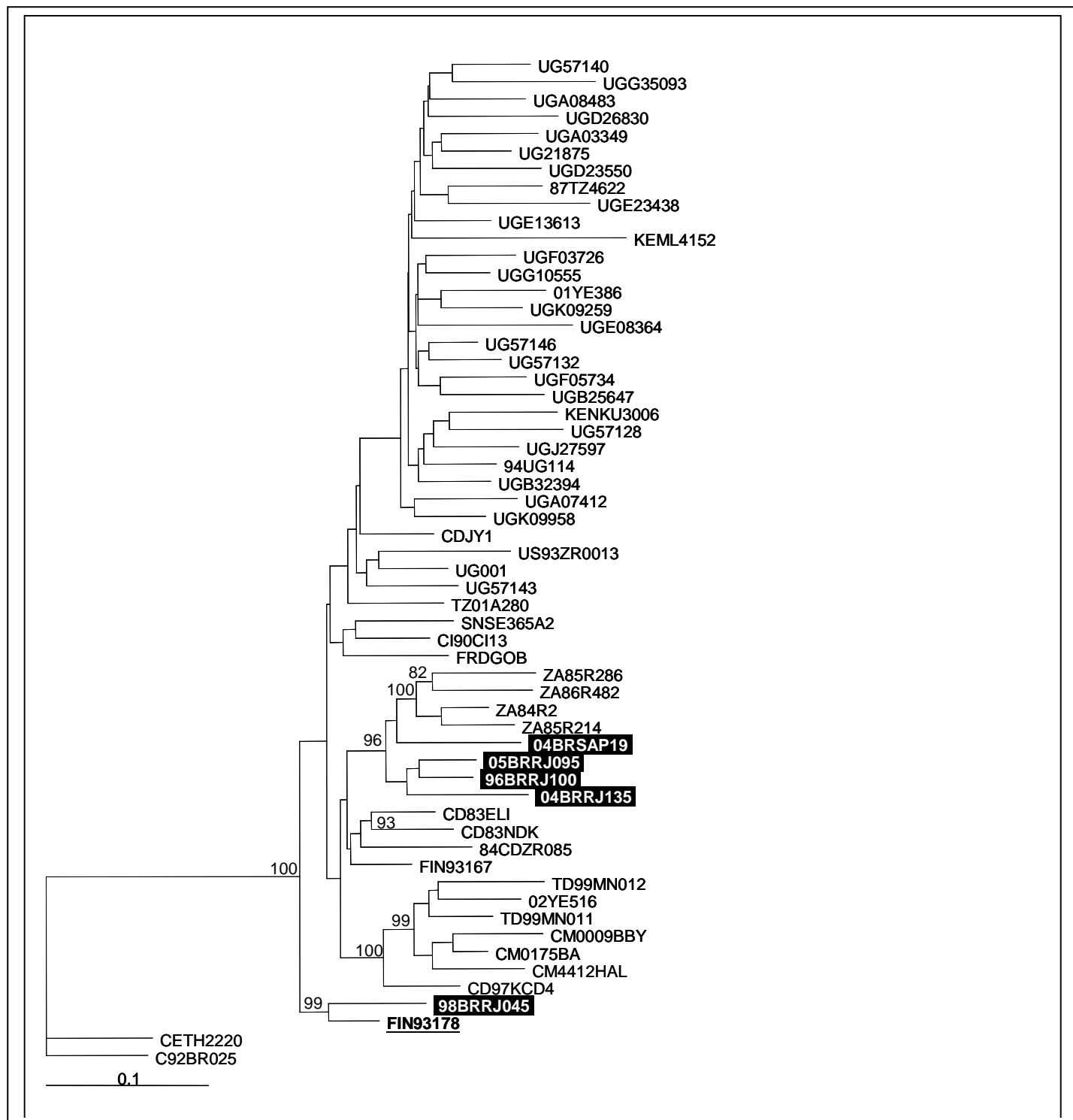


FIGURA 8

**Figura 9.** Estudo filogenético pelo princípio da máxima verossimilhança de um fragmento concatenado *C2V3/env-gp41/env* demonstrando a estreita relação filogenética entre a seqüência brasileira não-autóctone 98BRRJ045 e a seqüência finlandesa FI93178 (sublinhada). A árvore foi construída utilizando-se o modelo TVM+I+G de substituição nucleotídica.



**FIGURA 9**

### ***Estudo filogenético dos recombinantes BF1***

Extensas análises filogenéticas foram conduzidas para se comparar o perfil de recombinação das variantes BF1 observadas neste estudo com recombinantes BF1 gerados por diversos estudos paralelos em curso em nosso laboratório, bem como com variantes BF1, brasileiras ou não, previamente descritas e disponíveis no banco de dados de Los Alamos. O conjunto destas análises mostrou uma enorme diversidade de padrões de recombinação BF1 nas seqüências geradas neste e em outros estudos do nosso grupo.

A Figura 10, uma destas análises, mostra a reconstrução filogenética de seqüências de polimerase oriundas de diversos estudos distintos, pré-selecionadas por guardarem entre si um perfil de recombinação potencialmente similar, conforme revelado através de análises de *bootscanning*. Estas seqüências são comparadas com variantes não-recombinantes representativas dos subtipos B e F1, bem como de recombinantes BF1 previamente descritos. Além da grande diversidade de padrões de recombinação, podemos observar alguns clusters com significativo suporte estatístico e perfil de mosaicismos similar nesta região genômica.

Procedemos então ao seqüenciamento de regiões genômicas adicionais à polimerase, com o objetivo de verificar se o perfil de recombinação nestes clusters permaneceria similar. Observamos que para um destes clusters (em destaque na Figura 10) o perfil de recombinação permaneceu semelhante nas suas quatro seqüências mesmo após o seqüenciamento do genoma viral completo. Este cluster inclui a seqüência 04BRSQ-46, obtida da amostra de uma paciente da casuística de Saquarema, de sexo feminino, 27 anos, natural da cidade do Rio de Janeiro, que estava há dois anos em uso de seu primeiro esquema anti-retroviral e cuja carga viral plasmática vinha se mantendo, desde o início do tratamento, abaixo do limite de

detecção. O perfil recombinante se confirmou ainda pela representação gráfica das redes filogenéticas com o software *splitstree* (Figura 11). A representação esquemática do perfil recombinante do genoma da seqüência 04BRSQ-46 mostra uma estrutura complexa, com nove pontos de recombinação BF1 (Figura 12). Esta estrutura não guarda semelhança com os genomas CRF12\_BF, CRF28\_BF e CRF29\_BF.

Uma vez que os pacientes cujas amostras geraram estas quatro seqüências recombinantes BF1 não parecem ter qualquer ligação epidemiológica entre si, este conjunto de resultados sugere a ocorrência no estado do Rio de Janeiro de uma forma recombinante circulante intersubtipo BF1 previamente desconhecida (Guimarães et al., manuscrito em preparação).

**Figura 10.** Estudo filogenético pelo princípio da máxima verossimilhança de seqüências de polimerase do HIV-1, recombinantes intersubtipo BF1, geradas de diversos estudos em curso no Laboratório de Aids & Imunologia Molecular. Os alinhamentos foram preparados com seqüências de referência do subtipo B, do subtipo F1, além de exemplares recombinantes BF1, colhidas no banco de dados do Laboratório de Los Alamos (<http://hiv-web.lanl.gov>). As seqüências de referência estão representadas como pontos cinza. Clusters filogenéticos com suporte de *bootstrap* superior a 700 estão circundados e as seqüências intracluster estão listadas. A árvore foi construída usando o modelo TVM de substituição nucleotídica (que assume freqüências de base diferentes, bem como um viés transição-transversão, com taxas diferentes para cada uma das quatro transversões) com taxa de variação ao longo dos sítios obedecendo a uma distribuição gama, além de uma fração dos sítios tida como invariável (modelo TVM+I+G). A robustez da árvore foi avaliada através de análise de bootstrap com 1.000 ciclos de replicação. Os parâmetros do modelo foram os seguintes: freqüências de nucleotídeos,  $f_A=0.4119$ ,  $f_C=0.1591$ ,  $f_G=0.2271$ ,  $f_T=0.2016$ ; R matrix values,  $R_{A\leftrightarrow C}=2.2440$ ,  $R_{A\leftrightarrow G}=7.9113$ ,  $R_{A\leftrightarrow T}=0.9024$ ,  $R_{C\leftrightarrow G}=1.0281$ ,  $R_{C\leftrightarrow T}=10.3645$ ,  $R_{G\leftrightarrow T}=1$ . A proporção de sítios invariáveis foi de 42,45% e o parâmetro gama de 0,7111. Os gráficos de *bootscanning* indicando a similaridade das formas recombinantes BF1 com as seqüências representativas dos subtipos de grupo M (F1 em negro, B em cinza claro) também são mostrados. A análise foi conduzida em uma janela deslizante de 400 nucleotídeos da seqüência em estudo movendo-se ao longo de um alinhamento das seqüências de referência através de incrementos de 40 nucleotídeos. Em destaque, dois clusters que vieram a demonstrar um perfil de recombinação semelhante ao longo de todo o genoma viral, um dos quais engloba as seqüências 04BRRJ115, 05BRRJ055, 05BRRJ200 e 04BRSQ-46.



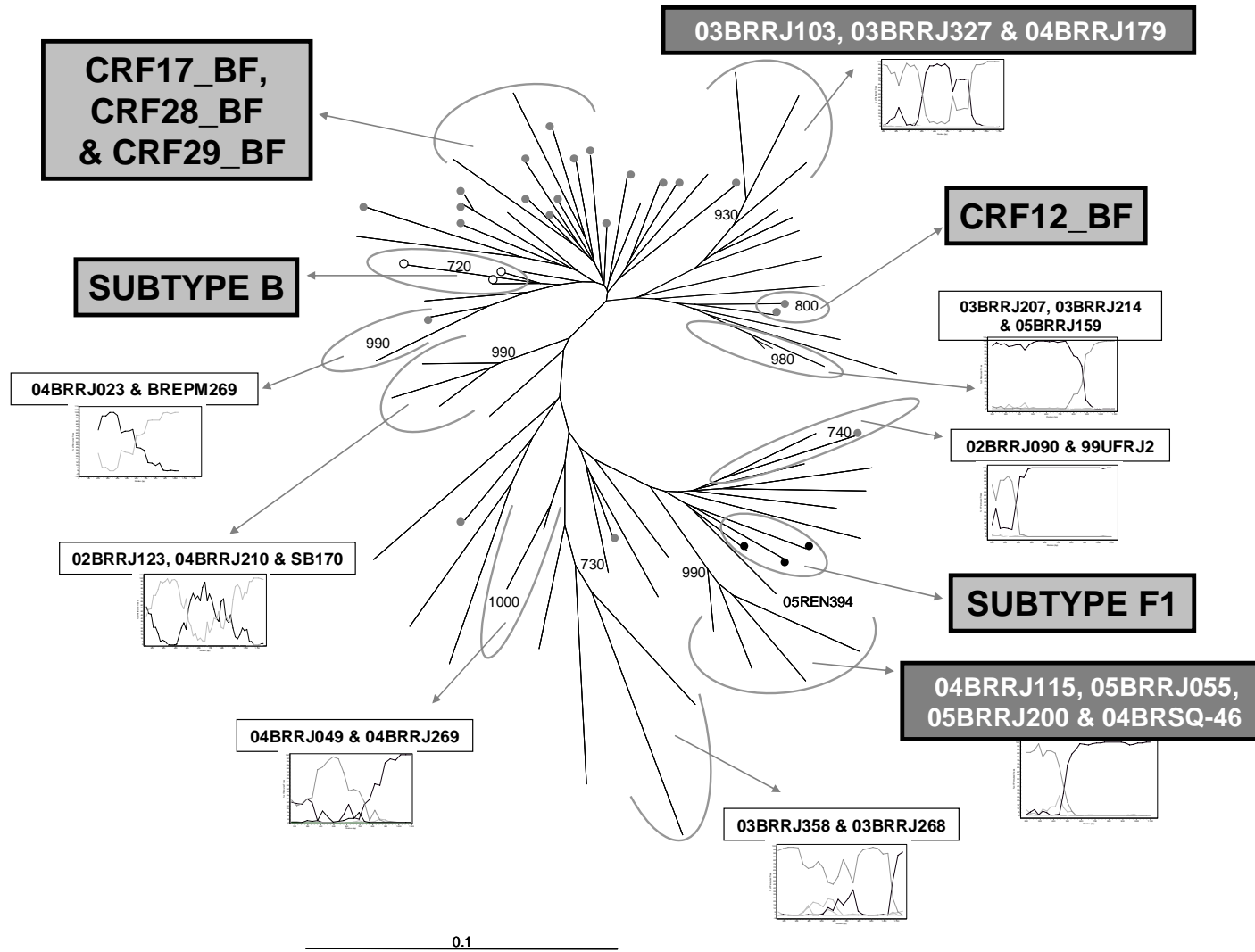
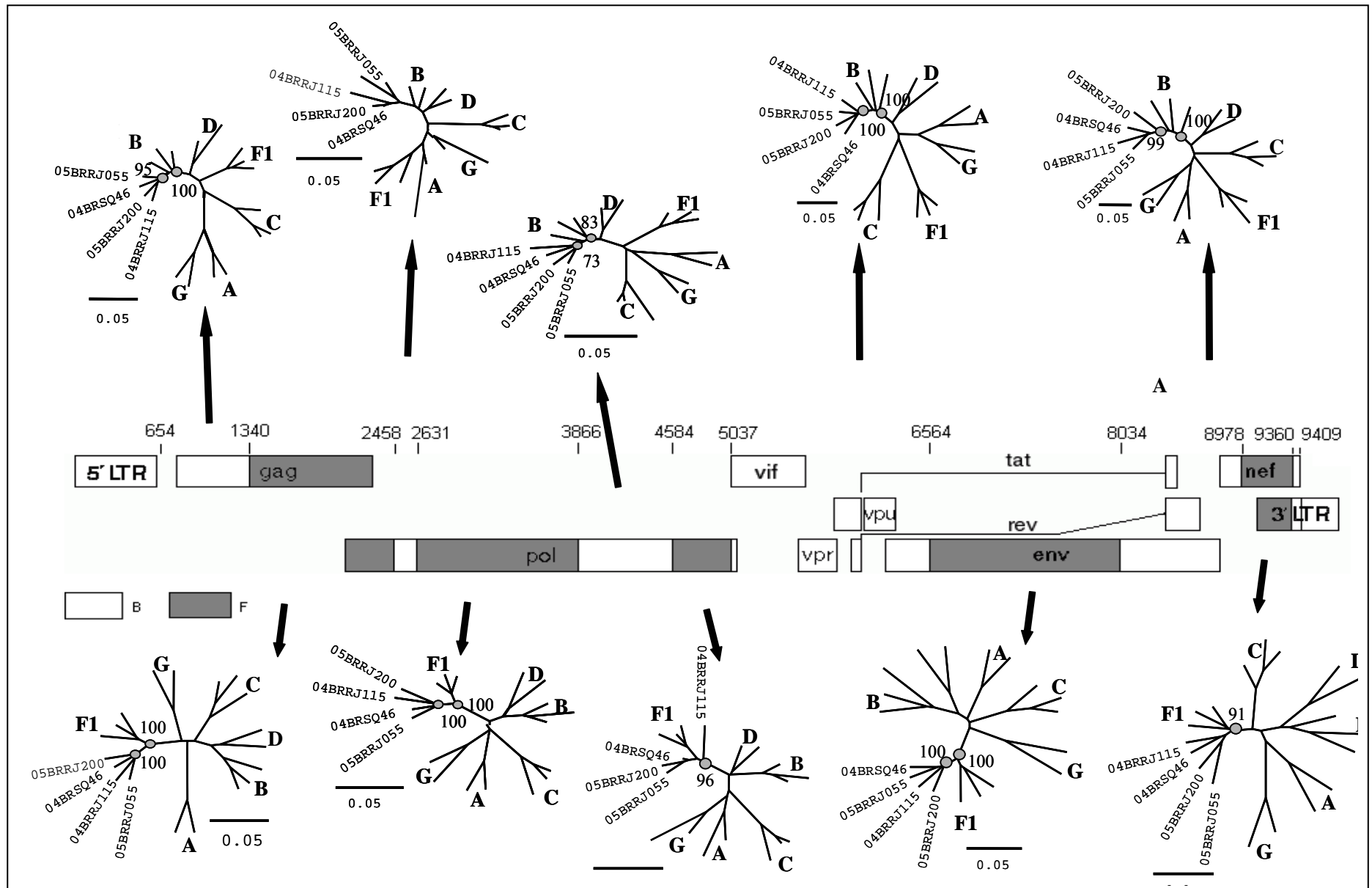


FIGURA 10



**Figura 12.** Representação esquemática da estrutura recombinante do genoma completo 04BRSQ-46. Os segmentos representativos do subtipo B são mostrados em branco os representativos do subtipo F1 em cinza claro. A numeração refere-se à posição correspondente no genoma HXB2.



## **Resistência genotípica aos anti-retrovirais nas casuísticas dos três municípios**

### ***Balanco geral da prevalência de mutações associadas a resistência e predição da susceptibilidade genotípica das variantes descritas no estudo (ANEXOS 3B e 3I)***

Amostras de um total de 156 pacientes (152 adultos e quatro casos pediátricos) em acompanhamento em Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema geraram seqüências para análise genotípica de resistência aos anti-retrovirais (Eyer-Silva & Morgado 2005 e ANEXO 3I). Deste total, 61 (39,1%) eram da casuística de Miracema, 24 (15,4%) de Santo Antonio de Pádua e 71 (45,5%) de Saquarema. Oitenta e quatro pacientes eram virgens de tratamento anti-retroviral e 72 haviam sido previamente expostos a fármacos usados nos esquemas anti-HIV-1. Deste último grupo, 61 estavam com seus esquemas terapêuticos em curso, ao passo que 11 os tinham interrompido por motivos os mais diversos, inclusive por serem ex-gestantes previamente expostas a profilaxia de transmissão vertical, sem indicação de manutenção das medicações (Tabelas 07 e 08).

Dentre as seqüências geradas das amostras dos 61 pacientes com seus esquemas terapêuticos vigentes quando da coleta, 23 (37,7%) apresentavam polimorfismos ou mutações em códons previamente associados a resistência (Tabela 07). As mutações ou polimorfismos resultaram em uma predição de um grau de resistência baixo, intermediário ou alto a um ou mais fármacos anti-retrovirais em 19 (31,1%) seqüências (Tabela 08).

Dentre as seqüências geradas das amostras dos 11 pacientes previamente expostos a esquemas anti-retrovirais, mas que não estavam em uso das medicações quando da coleta, três (27,3%) apresentavam mutações ou polimorfismos em códons previamente associados a resistência (Tabela 07). O algoritmo de Stanford previu que os polimorfismos P225L e V106I,

registrados para a seqüência M33, gerada da amostra de uma ex-gestante, não são indicativos de queda de sensibilidade. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que estes polimorfismos representem reversão de mutações associadas a resistência em uma ex-gestante previamente exposta a nevirapina, visto que são conhecidas, para ambos estes códons, mutações que conferem resistência aos não-nucleosídicos. As outras duas seqüências, 05BRSQ-21 e 05BRSQ-33, foram previstas como resistentes a agentes nucleosídicos e não-nucleosídicos, respectivamente (Tabelas 08 e 09).

Dentre as seqüências geradas das amostras dos 84 pacientes virgens de tratamento quando da coleta, 7 (8,3%) apresentavam polimorfismos ou mutações em códons previamente associados a resistência (Tabela 07). As mutações ou polimorfismos resultaram em uma predição de um grau de resistência intermediário para uma (1,2%) seqüência (Tabela 08), a 06BRSQ-94, ao passo que as demais foram consideradas sensíveis ou apenas com *potencial* para resistência de baixo grau (Tabelas 08 e 10). As seqüências geradas das amostras colhidas dos demais 77 pacientes virgens de tratamento não mostraram mutações ou polimorfismos em códons previamente associados a resistência (Tabela 11).

**Tabela 07.** Prevalência de polimorfismos e/ou mutações associadas a susceptibilidade diminuída aos anti-retrovirais entre 84 pacientes virgens de tratamento e 72 pacientes expostos a esquemas anti-retrovirais nos municípios de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, interior do estado do Rio de Janeiro Brasil, 2001-2006 (Eyer-Silva & Morgado 2005 e ANEXO 3I).

	n	Prevalência de mutações			Total
		Apenas na TR	Apenas na PR	TR e PR	
<b>Previamente expostos (n=72)</b>					
Em tratamento quando da coleta	61 (39,1%)	17 (27,8%)	1 (1,6%)	5 (8,2%)	<b>23 (37,7%)</b>
Tratamento previamente interrompido	11 (7%)	3 (27,3%)	-	-	<b>3 (27,3%)</b>
<b>Virgens de tratamento</b>	84 (53,8%)	7 (8,3%)	-	-	<b>7 (8,3%)</b>
<b>Total</b>	156	23 (14,7%)	1 (0,6%)	5 (3,2%)	<b>29 (18,6%)</b>

**Tabela 08.** Prevalência de resistência (de grau baixo, intermediário ou alto) a agentes anti-retrovirais, de acordo com a interpretação do algoritmo de Stanford, em 156 seqüências da casuística do interior do estado do Rio de Janeiro, Brasil, 2001-2006.

	n	Interpretação do algoritmo			Total
		Resistência na TR	Resistência na PR	Resistência na TR e PR	
<b>Previamente expostos (n=72)</b>					
Em tratamento quando da coleta	61 (39,1%)	14 (22,9%)	-	5 (8,2%)	<b>19 (31,1%)</b>
Tratamento previamente interrompido	11 (7%)	2 (18,2%)	-	-	<b>2 (18,2%)</b>
<b>Virgens de tratamento</b>	84 (53,8%)	1 (1,2%)	-	-	<b>1 (1,2%)</b>
<b>Total</b>	156	17 (10,9%)	-	5 (3,2%)	<b>22 (14,1%)</b>

**Tabela 09.** Dados clínicos, epidemiológicos, virológicos e de tratamento de 72 pacientes expostos a esquemas anti-retrovirais.

Paciente <sup>a</sup>	Sexo/id/ CDC	Drogas usadas no tratamento <sup>b</sup>	Tempo de tto <sup>c</sup>	CV <sup>d</sup>	Subtipo	TR/ PR <sup>e</sup>	Mutações na TR	Mutações na PR
<b>Pacientes em terapia anti-retroviral quando da coleta (n=61)</b>								
M02	F/21/A3	DDI, <u>ZDV, 3TC, NFV, NVP</u>	3.5 a	<u>D</u>	BF1	S/S	-	-
M05	F/47/C3	ZDV, DDI, SQV, IDV, RTV, <u>3TC, D4T, NFV</u>	4.5 a	<u>D</u>	B	<u>R/R</u>	D67N, K70R, K219E	N88D
M06	F/26/C2	<u>ZDV, 3TC, NFV</u>	3 m	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M07	F/28/A2	DDI, <u>ZDV, 3TC, LPV</u>	7 a	<i>ILD</i>	B	<u>R/S</u>	D67N, K219Q	-
M08	M/24/C3	ZDV, IDV, <u>3TC, D4T, NFV, NVP</u>	4.5 a	<u>D</u>	BF1	<u>R/S</u>	Y181C, G190A	-
M11	M/27/C3	<u>ZDV, 3TC, NFV</u>	2 a	<u>D</u>	B	<u>R/R</u>	M184V	N88S
M12	M/53/A2	ZDV, SQV, NFV, <u>3TC, D4T, LPV</u>	5 a	<i>ILD</i>	B	<u>R/R</u>	T69S, K70R, M184V	N88D
M14	M/34/C3	ZDV, DDI, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	3 a	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	M41L, L210W	-
M17	M/31/C3	ZDV, DDI, <u>3TC, D4T, EFV</u>	5 a	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M20	F/27/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	18 m	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	M184V	-
M22	F/35/C3	DDI, <u>ZDV, 3TC, NFV</u>	2.5 a	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M25	F/24/A2	DDI, ZDV, <u>3TC, D4T, NVP</u>	6 a	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	K103N	-
M28	M/33/C3	ZDV, DDI, SQV, NFV, <u>3TC, D4T, LPV, EFV</u>	4 a	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M31	F/60/B2	ZDV, DDI, RTV, <u>D4T, 3TC, NFV, EFV</u>	5 a	<u>D</u>	BF1	<u>R/S</u>	M184V	-
M36	F/38/A3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	1 a	<i>ILD</i>	BF1	S/S	-	-
M42	M/32/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	2 m	<i>ILD</i>	B	S/S	V118L	-
M46	M/37/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	6 m	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M48	M/41/C3	ZDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	3 m	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M49	M/30/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3 m	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M62	M/63/C3	ZDV, <u>D4T, 3TC, LPV</u>	18 m	<i>ILD</i>	B	S/S	T69S	-
M63	M/31/C3	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	1 a	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M64	F/26/C3	ZDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	5 m	<i>ILD</i>	B	S/S	-	-
M66	F/46/C2	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	2 m	<i>ILD</i>	B	S/S	V118I	-
04BRSAP01	F/23/C2	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	3 m	<i>ILD</i>	B	<u>R/S</u>	M184V	-
04BRSAP02	M/54/C3	ZDV, DDI, IDV, RTV, NFV, <u>D4T, 3TC, NVP, LPV</u>	6 a	<u>D</u>	B	<u>R/R</u>	M41L, Y181C	L24I, I54V, V82A

04BRSAP03	F/58/C3	DDI, IDV, <u>ZDV, 3TC, EFV</u>	7 a	ILD	B	S/S	-	-
04BRSAP04	F/30/C1	IDV, <u>ZDV, 3TC, EVZ</u>	6 a	ILD	B	S/S	-	-
04BRSAP07	F/49/C3	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	5 m	ILD	<b>F1</b>	<b>R/S</b>	T215Y	-
04BRSAP08	F/39/C2	ZDV, DDI, NVP, RTV, IDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	10 a	<b>D</b>	B	<b>R/S</b>	M41L, T215Y, K103N	-
04BRSAP13	M/36/A3	ZDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	1.5 a	ILD	<b>F1</b>	S/S	-	-
04BRSAP18	M/48/C3	DDI, RTV, IDV, <u>ZDV, 3TC, EFV</u>	2 a	<b>D</b>	B	<b>R/S</b>	M41L, M184V, T215Y, K103N, G190A	-
04BRSAP19	M/43/C3	<u>ZDV, 3TC, NVP</u>	2.5 a	ILD	<b>D</b>	S/S	-	-
05BRSAP23	M/39/A3	<u>ZDV, 3TC, NFV</u>	1.5 a	ILD	<b>BF1</b>	S/S	-	-
04BRSQ-01	M/32/A2	<u>ZDV, 3TC, NVP</u>	3.5 a	<b>D</b>	B	<b>R/S</b>	K103N, M184V	-
05BRSQ-05	M/42/C3	<u>ZDV, 3TC, NVP</u>	3 a	ILD	<b>F1</b>	S/S	-	-
04BRSQ-06	M/37/C3	ZDV, NVP, <u>D4T, 3TC, LPV</u>	4 a	ILD	B	S/S	-	L33F <sup>e</sup>
04BRSQ-07	F/42/A2	<u>D4T, 3TC, EFV</u>	3.5 a	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-14	M/44/C3	<u>D4T, 3TC, NFV</u>	4 a	<b>D</b>	B	<b>R/R</b>	M41L, M184V, T215Y	D30N, L33F, N88D
05BRSQ-15	M/37/A2	NVP, <u>ZDV, 3TC, ABC</u>	5 a	<b>D</b>	B	<b>R/S</b>	G190A	-
04BRSQ-20	F/65/C3	IDV, RTV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	4 a	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-24	M/21/C3	ZDV, IDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	9 a	<b>D</b>	B	<b>R/S</b>	M41L, M184V, L210W, T215Y	-
04BRSQ-25	F/21/A2	<u>ZDV, 3TC, NVP</u>	2.5 a	ILD	B	S/S	-	-
06BRSQ-26	M/33/A3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	2 a	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-31	M/21/C2	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3 a	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-32	F/34/C3	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	2 a	ILD	B	S/S	-	-
04BRSQ-39	M/35/C2	ZDV, IDV, <u>D4T, 3TC, LPV</u>	3 a	<b>D</b>	<b>F1</b>	S/S	-	-
04BRSQ-40	M/20/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3.5 a	<b>D</b>	B	<b>R/S</b>	Y188L	-
04BRSQ-41	F/28/A2	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3 m	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-42	M/50/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3 a	ILD	<b>F1</b>	S/S	-	-
05BRSQ-43	M/39/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3 a	ILD	B	S/S	-	-
04BRSQ-46	F/27/A2	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	2 a	ILD	<b>BF1</b>	S/S	-	-
04BRSQ-48	F/37/A3	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	8 m	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-53	F/35/B3	<u>ZDV, 3TC, NFV</u>	3 a	ILD	B	S/S	-	-
04BRSQ-54	M/29/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	3 m	ILD	<b>BF1</b>	S/S	-	-
05BRSQ-60	M/37/A2	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	7 m	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-65	M/38/A3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	6 m	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-66	M/32/C3	EFV, <u>ZDV, 3TC, ABC</u>	3.5 a	ILD	B	S/S	-	-



05BRSQ-67	F/32/C2	<u>ZDV, 3TC, NVP</u>	2.5 a	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-68	M/53/C2	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	5 m	ILD	B	S/S	-	-
05BRSQ-69	M/55/C3	<u>ZDV, 3TC, EFV</u>	1 a	ILD	<b>F1</b>	S/S	-	-
05BRSQ-70	M/40/C3	<u>ZDV, 3TC, LPV</u>	1 a	<b>D</b>	B	S/S	-	-
<b>Pacientes previamente expostos a anti-retrovirais, porém que não estavam em uso de terapia anti-retroviral quando da coleta (n=11)</b>								
M03	F/20/A1	ZDV, 3TC, NVP	<b>PTV</b>		B	S/S	-	-
M16	F/35/A1	ZDV, 3TC, NVP	<b>PTV</b>		B	S/S	-	-
M33	F/27/A1	ZDV, 3TC, NVP	<b>PTV</b>		B	S/S	V106I, P225L	-
M34	F/16/A1	ZDV, 3TC, NVP	<b>PTV</b>		B	S/S	-	-
04BRSQ-09	F/24/A2	ZDV, 3TC, NVP	<b>PTV</b>	-	B	S/S	-	-
05BRSQ-21	M/41/A2	ZDV, 3TC, NVP	INT	-	B	<b>R/S</b>	K103N	-
06BRSQ-27	M/31/A2	ZDV, 3TC, EFV	INT	-	B	S/S	-	-
06BRSQ-29	F/34/A2	ZDV, 3TC, NVP, LPV	INT	-	B	S/S	-	-
05BRSQ-33	M/44/C3	ZDV, 3TC, NFV	INT	-	B	<b>R/S</b>	M184V	-
05BRSQ-36	F/25/C3	ZDV, 3TC, NVP	<b>PTV</b>	-	B	S/S	-	-
05BRSQ-44	M/43/C2	ZDV, 3TC, EFV	INT	-	<b>F1</b>	S/S	-	-

<sup>a</sup> Para as amostras de Saquarema e Santo Antonio de Pádua, os primeiros dois dígitos indicam o ano da coleta da amostra.

<sup>b</sup> Fármacos em uso quando da coleta estão indicados em **negrito e sublinhados**. ABC (abacavir); ZDV (zidovudina); DDI (didanosina); 3TC (lamivudina); D4T (estavudina). NVP (nevirapina); EFV (efavirenz); SQV (saquinavir); IDV (indinavir); RTV (ritonavir); NFV (nelfinavir); LPV (co-formulação de lopinavir e ritonavir).

<sup>c</sup> Tempo de terapia anti-retroviral em anos (**a**) ou meses (**m**) quando da coleta. **PTV**: pacientes previamente expostos a profilaxia de transmissão vertical; **INT**: pacientes que estavam sob interrupção voluntária de seus esquemas terapêuticos quando da coleta..

<sup>d</sup> CV (carga viral plasmática do HIV-1 em um intervalo de 3 meses da coleta: inferior ao limite de detecção (*ILD*) ou detectável (**D**)).

<sup>e</sup> Predição da susceptibilidade aos inibidores da TR e da PR: S (suscetível ou baixo grau de resistência potencial); **R** (grau baixo, intermediário ou alto de resistência a qualquer dos fármacos). A mutação L33F, observada na seqüência 04BRSQ-06, era anteriormente tida como indutora de resistência de baixo grau ao inibidor da protease tipranavir. Atualmente o algoritmo de Stanford prevê sensibilidade aos inibidores de protease quando da ocorrência isolada desta mutação.

**Tabela 10.** Dados clínicos, epidemiológicos e virológicos 7 pacientes virgens de tratamento cujo estudo genotípico mostrou a presença de mutações associadas a susceptibilidade reduzida aos anti-retrovirais.

paciente <sup>a</sup>	sexo	idade	CDC	subtipo	RT/PR <sup>b</sup>	Mutações na TR <sup>c</sup>	Mutações na PR
05BRSAP26	F	32	A2	B	S/S	V179D	-
05BRSAP28	F	38	C3	B	S/S	V179D	-
06BRSAP30	M	32	A1	B	S/S	T69N	-
06BRSAP31	F	23	A2	B	S/S	V179D	-
06BRSAP33	M	23	A3	B	S/S	V179D	-
05BRSQ-83_PED	M	06	A2	B	S/S	V118I	-
06BRSQ-94	F	46	C3	B	<b>R</b> /S	D67N, K70S, T215D	-

<sup>a</sup> Os primeiros dois dígitos indicam o ano da coleta de sangue; o sufixo \_PED indica um paciente pediátrico.

<sup>b</sup> Predição da susceptibilidade aos inibidores da TR e da PR: S (suscetível ou potencial para resistência de baixo grau); **R** (resistência de grau baixo, intermediário ou alto para qualquer droga anti-retroviral).

<sup>c</sup> As quatro seqüências com mutação V179D foram geradas de amostras de pacientes epidemiologicamente relacionados, componentes do cluster SAP-B (Eyer-Silva 2007b).

**Tabela 11.** Dados clínicos, epidemiológicos e virológicos de 77 pacientes nunca expostos a esquemas anti-retrovirais, cuja avaliação genotípica não mostrou mutações associadas a resistência. Os 7 pacientes indicados com (\*), da casuística de Miracema, não foram previamente descritos no estudo Eyer-Silva & Morgado, 2005.

paciente <sup>a</sup>	sexo	idade	CDC	subtipo
M21	F	26	A2	B
M23	F	42	A2	B
M24	F	22	A1	B
M37	M	30	A1	B
M38	F	57	B2	B
M39	F	30	C3	B
M40	F	24	A2	B
M41	F	26	C3	B
M43	M	24	A1	B
M44	F	33	A1	B
M45	F	22	A1	B
M47	M	29	C2	B
M50	F	20	B2	B
M51	M	23	A2	B
M52	M	25	C3	B
M53	M	31	C3	B
M54	F	28	C3	B
M55	M	38	C2	B
M56	F	32	C2	B
M57	F	25	A2	B
M58	M	48	A1	B
(*) M59	F	48	A1	<b><u>F1</u></b>
M61	F	26	A2	B
M65	M	33	A2	B
M67	F	27	C3	B
M68	M	27	C3	B
M69	M	43	C3	B
M70	M2	22	A2	B
(*) M75	M2	22	A2	B
(*) M76	F	34	C3	B
(*) M77	F	27	A1	B
(*) M78	F	49	C1	B
(*) M79	F	22	A1	B
(*) M80	F	37	C3	B
04BRSAP05	M	56	C3	B
04BRSAP06	M	30	C2	B
05BRSAP09	F	23	A1	<b><u>BF1</u></b>
05BRSAP09_PED	M	06	B2	<b><u>BF1</u></b>
05BRSAP10	M	29	A2	B
04BRSAP24	M	49	C3	B
04BRSAP25	F	45	A1	B
05BRSAP27	F	30	C3	B

06BRSAP29	M	38	A2	B
04BRSQ-02	F	25	A1	B
04BRSQ-03	F	24	A1	B
06BRSQ-08	F	31	A1	B
05BRSQ-12	M	24	A2	B
04BRSQ-30	M	57	C1	B
04BRSQ-32_PED	F	06	B2	B
06BRSQ-35	M	43	A1	<b><u>BF1</u></b>
04BRSQ-47	M	48	A1	B
06BRSQ-49	F	29	A2	B
04BRSQ-50	M	23	A2	B
04BRSQ-56	M	37	A2	<b><u>BF1</u></b>
04BRSQ-57	M	47	C2	B
04BRSQ-58	F	32	B2	B
04BRSQ-61	M	24	C3	B
05BRSQ-71	M	42	C3	B
05BRSQ-72	F	56	B2	B
05BRSQ-73	M	44	C3	B
05BRSQ-74	F	18	A2	B
05BRSQ-75	M	31	C3	B
05BRSQ-76	M	47	C3	B
05BRSQ-77	M	26	C1	B
05BRSQ-78_PED	F	14	A2	B
05BRSQ-80	M	55	C3	B
06BRSQ-81	F	21	A2	B
05BRSQ-82	M	22	A3	B
05BRSQ-84	M	26	A3	B
06BRSQ-86	F	37	A2	B
06BRSQ-87	F	41	C3	B
06BRSQ-88	M	28	A3	<b><u>CRF02 AG</u></b>
06BRSQ-89	M	44	C3	<b><u>BF1</u></b>
06BRSQ-90	F	29	A2	<b><u>CRF02 AG</u></b>
06BRSQ-91	F	27	C3	B
06BRSQ-92	M	59	C3	<b><u>F1</u></b>
06BRSQ-93	M	56	C3	B

<sup>a</sup> Para as amostras de Saquarema e Santo Antonio de Pádua, os primeiros dois dígitos indicam o ano da coleta da amostra.

### ***Registro dos polimorfismos e mutações em códon de resistência (ANEXOS 3B e 3I)***

Dentre as 22 seqüências para as quais o algoritmo da Stanford previu diminuição da sensibilidade aos inibidores da transcriptase reversa (Tabela 08), a sensibilidade aos não-nucleosídicos estava diminuída em nove (amostras M08, M25, 04BRSAP02, 04BRSAP08, 04BRSAP18, 04BRSQ-01, 05BRSQ-15, 05BRSQ-21 e 04BRSQ-40). Destas nove, cinco

apresentavam resistência tanto aos inibidores nucleosídicos quanto aos não-nucleosídicos e quatro exclusivamente aos não-nucleosídicos. Em toda a casuística, apenas cinco amostras geraram seqüências com diminuição de sensibilidade prevista aos inibidores da protease, todas com sensibilidade também diminuída aos inibidores da transcriptase reversa (Tabela 08). Apenas uma seqüência (04BRSAP02) teve diminuição da susceptibilidade prevista para as três classes de anti-retrovirais utilizadas no período de estudo: inibidores da protease, nucleosídicos e não-nucleosídicos da transcriptase reversa (estes com resistência ao efavirenz prevista como de baixo grau) (Tabela 09). Para todos os pacientes em falência virológica por resistência genotípica tínhamos opções de desenhar esquemas terapêuticos de resgate com boas chances de sucesso.

Registramos como mutações no gene da transcriptase reversa: a) todas as mutações associadas à timidina, ditas TAMs (códon M41 [seis seqüências], D67 [três seqüências], K70 [três seqüências], L210 [duas seqüências], T215 [seis seqüências], K219 [duas seqüências]), que induzem a remoção do nucleosídeo já incorporado à cadeia de DNA (Meyer 2000); b) a mutação M184V (dez seqüências), que causa inibição estérica aos nucleosídeos (Sarafianos 1999); c) mutações não-aspartato (D) no códon T69SN (três seqüências), eventualmente (T69N) associadas com potencial para resistência de baixo grau (Winters & Merigan 2001); d) mutações no códon 118 (V118IL; três seqüências), polimorfismos que podem contribuir para resistência, mas que mais recentemente não vêm sendo considerados como indicativos de diminuição da sensibilidade quando não associados à mutação E44D (Booth 2007); e) mutações associadas com resistência aos não-nucleosídicos, como a K103N (cinco seqüências), V106I (uma seqüência), V179D (quatro seqüências), Y181C (duas seqüências), Y188L (uma seqüência), G190A (três seqüências) e P225L (uma seqüência). Não registramos mutações associadas ao complexo Q151M, nem tampouco inserções no códon 69. Dentre as mutações associadas a queda de sensibilidade aos inibidores de protease, encontramos L24I

(uma seqüência), D30N (uma seqüência), L33F (duas seqüências), I54V (uma seqüência), V82A (uma seqüência), and N88D/S (quatro seqüências). A Tabela 12 lista as mutações nas regiões da transcriptase reversa e da protease.

**Tabela 12.** Frequência com que mutações em códons associados a resistência foram registradas entre 156 análises genótípicas de amostras colhidas nos de Miracema, Santo Antonio de Pádua e Saquarema, interior do estado do Rio de Janeiro, 2001-2006 (Eyer-Silva & Morgado 2005 e ANEXO 3I).

<b>classe de agente anti-retroviral</b>	<b>n</b>
<i>Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa</i>	
M41L	06
D67N	03
T69S/N	03
K70R/S	03
V118I/L	03
M184V	10
L210W	02
T215Y/D	06
K219E/Q	02
<i>Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa</i>	
K103N	05
V106I	01
V179D	04
Y181C	02
Y188L	01
G190A	03
P225L	01
<i>Inibidores da protease</i>	
L24I	01
D30N	01
L33F	02
I54V	01
V82A	01
N88D/S	04

### ***Mutações secundárias no gene da protease em pacientes virgens de tratamento***

Encontramos mutações secundárias no gene da protease em 68 (81%) dentre 84 polimerases geradas de amostras de pacientes virgens de tratamento. Ao todo, foram seis posições comprometidas: L10I/V em 12 (14,2%), K20R em duas (2,4%), M36I em 15 (17,8%), L63P em 39 (46,4%), A71I/T/V em seis (7,1%) e V77I em 19 (22,6%). Em 31 (37%) seqüências observamos uma única mutação secundária, ao passo que 27 (32,1%), nove (10,7%) e uma (1,2%) seqüência encerravam, respectivamente, duas, três e quatro mutações secundárias. O algoritmo de Stanford previu sensibilidade preservada para todas estas seqüências, mesmo para a que abrigava quatro mutações secundárias (05BRSAP27).

### ***Sucesso do esquema anti-retroviral (ANEXO 3I)***

O cruzamento das informações do padrão genotípico (Tabela 09) com o resultado da quantificação da carga viral plasmática de cada um dos 61 pacientes em tratamento quando da coleta da amostra (Tabela 13) nos permite estimar informações importantes como a não adesão aos esquemas terapêuticos e o sucesso do tratamento. Observamos que para três (4,9%) pacientes em falência virológica (M02, 04BRSQ-39 e 04BRSQ-70) o perfil de mutações se nos apresentou inteiramente indicativo de sensibilidade preservada aos fármacos anti-retrovirais. Este perfil é sugestivo de falência virológica por falta de adesão ao tratamento ou falência farmacocinética.

Observamos ainda que 43 pacientes estavam com a carga viral plasmática abaixo do limite de detecção, demonstrando uma freqüência de sucesso virológico da ordem de 70% (Tabela 13). Quatro destes pacientes mantinham a carga viral indetectável apesar de registrarmos a presença de mutações associadas a resistência. Em dois destes pacientes, M07

e M12, havia um conjunto de mutações (respectivamente, D67N-K219Q e T69S-K70R-M184V-N88D) que podem ter se fixado durante esquemas anteriores, hoje tidos como obsoletos pela atividade antiviral relativamente baixa. Para os outros dois pacientes, 04BRSAP01 e 04BRSAP07, as mutações M184V e T215Y, respectivamente, foram documentadas durante a vigência do primeiro esquema terapêutico. Não temos como saber se estas mutações emergiram durante o tratamento ou se variantes resistentes foram transmitidas a estes pacientes. Todos estes quatro pacientes mantinham, apesar das mutações registradas, carga viral plasmática abaixo do limite de detecção às custas de esquemas de alta atividade que continham a co-formulação de lopinavir e ritonavir.

Observamos ainda a ocorrência de falência virológica associada a resistência genotípica em cerca de um quarto da casuística (15 pacientes). A maioria destes pacientes (10 casos) já havia sido medicada com esquemas anti-retrovirais anteriores aos que estavam em curso quando da coleta. Alguns destes casos traziam história medicamentosa de exposição a sete (M31), oito (M05, 04BRSAP08) ou mesmo nove (04BRSAP02) fármacos anti-retrovirais diferentes.

**Tabela 13.** Associação entre a interpretação do algoritmo de sensibilidade e o resultado da carga viral plasmática colhida dentro de um intervalo de três meses da coleta da genotipagem.

	Interpretação do algoritmo		Total
	<i>sensível</i>	<i>sensibilidade diminuída</i>	
<b>Carga viral plasmática</b>			
<i>detectável</i>	03 (4,9%)	15 (24,6%)	18 (29,5%)
<i>abaixo do limite de detecção</i>	39 (63,9%)	04 (6,5%)	43 (70,5%)
<b>Total</b>	41 (67,2%)	20 (32,8%)	61



## DISCUSSÃO

O conjunto de dados que emerge deste estudo é indicativo de um perfil de epidemia heterossexual (Eyer-Silva 2005b, Eyer-Silva 2007c), com evidências moleculares sugestivas de alta incidência (Eyer-Silva & Morgado 2006, Eyer-Silva 2007b) e padrão genotípico indicativo de boa taxa de sucesso terapêutico e baixa frequência de mutações que conferem resistência aos anti-retrovirais (Eyer-Silva & Morgado 2005 e ANEXO 3I).

Nos primeiros anos da epidemia de Aids no Brasil, a razão de sexos homem-mulher alcançou a cifra de 28:1 (Brasil 2000b). Seguiu-se um progressivo declínio da razão de sexos com uma crescente representatividade de casos femininos (Brito 2001, Fonseca 2002). No presente estudo, a razão de sexos de casos de infecção pelo HIV-1 para os 208 pacientes adultos que receberam atenção médica nos programas municipais dos três municípios em foco foi de 1,1, o que significa que 46,4% de todos os adultos atendidos no período de estudo eram mulheres (Tabela 02). A maior cifra obtida para a razão de sexos em casos de Aids (1,7) é indicativa de uma mais recente onda de disseminação da epidemia brasileira em direção ao sexo feminino. O intervalo de alguns anos que a história natural da infecção pelo HIV-1 costuma interpor entre a aquisição da infecção e o surgimento de suas complicações clínicas faz com que a razão de sexos para casos de Aids, diferentemente da razão de casos de infecção pelo HIV-1, seja um indicativo do perfil epidemiológico que tínhamos há alguns anos atrás. Nas cidades de Miracema e Santo Antonio de Pádua, a representatividade do sexo feminino entre os adultos iguala ou supera a de casos masculinos. Já em Saquarema, mais de 60% dos pacientes eram homens.

Encontramos algumas diferenças epidemiológicas entre as casuísticas destas três cidades (Eyer-Silva 2007c). Quando comparados aos pacientes das coortes das duas cidades

do noroeste do estado, os pacientes de Saquarema eram mais freqüentemente naturais de outros municípios e tinham uma maior chance de ter iniciado acompanhamento em outra cidade. De fato, sabemos que Saquarema é uma cidade que atrai pessoas de todo o Brasil. Também observamos que as razões de sexo homem-mulher para infecção pelo HIV-1 e para Aids foram maiores em Saquarema. Já os pacientes dos municípios do noroeste do estado tinham uma maior probabilidade de estar em acompanhamento em sua cidade natal e onde as razões de sexo homem-mulher eram menores. Curiosamente, observamos que os pacientes de Miracema eram mais freqüentemente solteiros, quando comparados às duas outras casuísticas. Embora a explicação para este resultado inesperado possa ser encontrada na menor média de idade dos pacientes daquela cidade (Tabela 02), não encontramos diferenças estatisticamente significativas para a variável *idade* entre as três coortes. De forma que o significado desta diferença de estado civil permanece obscuro.

Observamos ainda que quase 60% dos pacientes iniciaram acompanhamento em estágios clínicos definidores de Aids (Tabela 02), o que sugere a existência de um importante reservatório de casos de infecção pelo HIV-1 ainda por serem diagnosticados na comunidade. Estes números reforçam a necessidade de se conduzir estudos de prevalência de infecção pelo HIV-1 nos pequenos municípios brasileiros. Acreditamos que a apresentação clínica em estágios avançados de infecção pelo HIV-1 representa uma das facetas mais dramáticas da expansão da epidemia de Aids em direção às pequenas comunidades e áreas rurais do país. Os profissionais da área de saúde nestes locais estão se vendo na situação de ter que lidar com um número crescente de pacientes a exigir a instituição imediata de procedimentos de diagnóstico e tratamento. Sabemos que a abordagem clínica a estes casos requer o conhecimento e a *expertise* muitas vezes inexistentes nos pequenos municípios. Com muita freqüência, ainda, estes pacientes estão epidemiologicamente ligados a outros indivíduos que, por sua vez, também necessitarão de aconselhamento e testagem sorológica anti-HIV.

Observamos que as variáveis *sexo* (masculino) e *idade* (maior) mostraram-se independentemente associadas ao diagnóstico de estágio clínico definidor de Aids quando da apresentação. A associação com o sexo masculino parece ser compatível, como vimos, com uma mais recente onda de disseminação da epidemia em direção às mulheres. Já a variável idade também parece estar associada ao diagnóstico de Aids quando da apresentação, por geralmente necessitar a infecção pelo HIV de muitos anos de curso assintomático antes que ocorram suas complicações clínicas e a depleção periférica de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Registramos ainda como uma freqüente característica comportamental nas três coortes deste estudo o uso (ou os antecedentes de uso) de cocaína inalada. Apenas casos isolados (cinco pacientes) atribuíram a infecção pelo HIV-1 ao uso de drogas intravenosas. De fato, sabemos que no estado do Rio de Janeiro a cocaína é mais comumente usada por via inalada do que por via intravenosa (Bastos 1999). Registramos ainda uma alta freqüência de abuso de bebidas alcoólicas nas três casuísticas (dados não apresentados). Consideramos que o uso de cocaína e o abuso de bebidas alcoólicas representam fatores comportamentais de alta importância na disseminação de doenças sexualmente transmissíveis e que seu papel no avanço da epidemia de Aids em direção ao interior do Brasil ainda está a espera de investigações apropriadas.

Observamos que 90,9% dos 99 pacientes masculinos investigados eram incircuncisos (Eyer-Silva 2007c). Esta cifra não deve de maneira nenhuma ser interpretada como uma estimativa da freqüência de circuncisão masculina na população em geral. Sugere, entretanto, que a prevalência de circuncisão masculina deve ser baixa entre os residentes destas cidades do interior do estado do Rio de Janeiro. Sabemos que a presença do prepúcio é uma importante determinante da transmissibilidade heterossexual do HIV, ao menos na África

subsaariana (revisto em Eyer-Silva 2003). Desconhecemos a frequência de circuncisão masculina nas diversas regiões do Brasil e sua eventual interação com a transmissibilidade heterossexual do HIV-1 no país.

Entre os pacientes com complicações clínicas definidoras de estágio C do CDC, observamos a alta frequência de neurocriptococose nas cidades do noroeste do estado. Embora esta desordem fúngica não seja uma complicação rara da infecção pelo HIV-1 no Brasil, desconhecemos estudos que tenham chegado a frequências tão altas. Por ocasião da notificação de caso de Aids ao Ministério da Saúde, as complicações clínicas causadas pelo *Cryptococcus neoformans* constaram com uma frequência de 4,4% (Brasil 2000a). Em uma série de 100 casos de Aids examinados em autópsia, seis (6%) apresentavam esta infecção oportunista (Basílio-de-Oliveira 1997). Já entre pacientes em estágio C do CDC das coortes de Miracema e Santo Antonio de Pádua, cidades de forte componente rural, 14,5% tiveram, o diagnóstico microbiológico de neurocriptococose em algum ponto de sua evolução clínica. Sabemos que o espectro de complicações clínicas da Aids pode variar enormemente entre países vizinhos e regiões vizinhas dentro de um mesmo país (Chariyalertsak 2001). Precisamos investigar se os residentes de áreas rurais e semi-rurais com imunodepressão relacionada à Aids apresentam uma maior chance de desenvolver esta micose profunda por terem, talvez, uma maior probabilidade de exposição ambiental aos propágulos infectantes de seu agente etiológico. Este conhecimento é tão mais urgente por sabermos que a evolução clínica da meningoencefalite criptocócica depende diretamente do pronto diagnóstico e rápida instituição terapêutica.

Registramos que mais de 90% (189 dentre 208 adultos) dos pacientes adultos destas casuísticas eram residentes das cidades estudadas. Estes números demonstram uma grande demanda local por serviços de saúde ligados ao aconselhamento, testagem e tratamento da

infecção pelo HIV-1 e suas complicações. Muitos municípios vizinhos às três cidades deste estudo, inclusive no lado mineiro da divisa de Miracema e Santo Antonio de Pádua, não dispõem de programas municipais e, portanto, precisarão referir pacientes a outras unidades sempre que um caso de infecção pelo HIV-1 for diagnosticado. Todos os esforços devem, portanto, ser empenhados na implementação do maior número possível de programas municipais de HIV/Aids, de forma que os pacientes dos pequenos e médios municípios do interior possam se beneficiar do melhor do conhecimento e assistência médica em sua própria cidade de residência. Em nosso modo de ver, os programas municipais desempenham um papel de grande relevância para o aconselhamento, prevenção (incluindo a profilaxia de transmissão vertical), diagnóstico e tratamento. São, dessa forma, estruturas importantes nos esforços de controle da interiorização da epidemia no país e devem receber todo o suporte logístico por parte das autoridades municipais e toda a atenção das autoridades estaduais. Os programas municipais também são indispensáveis a uma ampla notificação de casos ao Ministério da Saúde e podem nos ajudar a minorar o grave problema da subnotificação. Um estudo que se debruçou sobre as declarações de óbito de casos de Aids no estado do Rio de Janeiro entre 1991 e 1995 concluiu que mais da metade não foi notificada ao Ministério da Saúde (Valente de Lemos & Valente 2001). Segundo o Boletim Epidemiológico do estado do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro 2005), municípios como Italva, São José de Ubá, e Aperibé, todos no noroeste do estado, notificaram, desde o início da epidemia, quatro, três e nenhum caso de Aids, respectivamente. Dessa forma, acreditamos que os programas municipais de HIV/Aids podem ser importantes aliados contra a subnotificação.

A extrema variação nucleotídica do HIV-1 (Bonhoeffer 1995, Rambaut 2004) nos permite traçar os perfis epidemiológicos de disseminação viral entre populações, grupos e indivíduos (Kuiken 2000). Buscamos fazer com que essa variabilidade genética, responsável por tantas dificuldades ao diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas, possa ser

aqui nossa aliada para uma melhor compreensão do perfil epidemiológico e das vias de disseminação do HIV-1 nas cidades estudadas.

A diversidade genética do HIV-1 na Região Sudeste do Brasil é extremamente complexa. Caracteriza-se pelo predomínio do subtipo B, com suas variantes ditas B e B<sup>BR</sup>, e do subtipo F1, com uma miríade de formas mosaicas intersubtipo BF1, incluindo a recente descrição das formas recombinantes circulantes CRF28\_BF e CRF29\_BF (Morgado 1994, Sabino 1994, Covas 1998, Morgado 1998, Tanuri 1999, Guimaraes 2002, Couto-Fernandez 2005, Sa Filho 2005, De Sa Filho 2006, Sanabani 2006a). Temos ainda registro de diversas variantes minoritárias, como os subtipos A (Caride 2000, Caride 2001), D (Morgado 1998, Guimaraes 2002, Couto-Fernandez 2006), C (Soares 2003, Barreto 2006, Sanabani 2006b), CRF02\_AG (Pires 2004, Couto-Fernandez 2005 e ANEXO 3H), além de outras formas recombinantes diversas, como BC e AGH (Guimaraes 2002, Sa-Ferreira 2007), inclusive o CRF31\_BC (Santos 2006).

Nossos estudos de epidemiologia molecular encontraram, nos três municípios, um perfil polifilético sugestivo de múltiplas introduções virais. A frequência com que cada subtipo foi demonstrado deve ser interpretada tendo em mente que o estudo de fragmentos genômicos parciais tende a subestimar a presença de variantes recombinantes intersubtipo. Registramos a ocorrência dos dois subtipos prevalentes no sudeste brasileiro, B e F1, bem como algumas de suas variações recombinantes intersubtipo. Registramos ainda a presença de dois subtipos adicionais, CRF02\_AG e D (Couto-Fernandez 2006, Eyer-Silva & Morgado 2006, Eyer-Silva 2007b e ANEXO 3H), cuja circulação até então acreditava-se restrita a casos isolados da capital (Morgado 1998, Guimaraes 2002, Pires 2004, Couto-Fernandez 2005). A diversidade genética do HIV-1 encontrada nestas cidades do interior é um indicativo adicional da complexidade da epidemia de Aids no Brasil. O estudo de epidemiologia molecular de

Saquarema proporciona ainda a primeira evidência molecular de transmissão autóctone no Brasil do CRF02\_AG (ANEXO 3H), uma variante de enorme importância global (Leitner 2005). Ainda na casuística de Saquarema, observamos a presença de uma variante BF1 cujo genoma completo forma, em conjunto com outras três seqüências oriundas de diferentes estudos em curso em nosso laboratório, um cluster candidato a um novo CRF\_BF brasileiro. Estes resultados mostram que, embora os pequenos municípios apresentem seus próprios perfis moleculares, também parecem rapidamente absorver e refletir a diversidade genética registrada na capital do estado.

Nos dois municípios do noroeste fluminense registramos que mais de 40% das amostras colhidas geraram seqüências que vieram a se agrupar em algum cluster monofilético (Eyer-Silva & Morgado 2006, Eyer-Silva 2007b). Os pacientes dos quais colhemos estas amostras, mesmo aqueles que aparentemente não tinham ligação epidemiológica direta entre si, provavelmente participaram da mesma cadeia de transmissão viral. A alta freqüência destes clusters sugere a existência de redes de interação sexual na comunidade e a grande similaridade entre as seqüências de um agente etiológico que se caracteriza pela grande variabilidade genética é um indicativo de que múltiplas novas infecções ocorreram em um intervalo de tempo relativamente curto. Este perfil molecular é sugestivo de alta incidência e chama a atenção para a necessidade urgente de conduzirmos estudos de prevalência no interior do Brasil para começarmos a estimar a real extensão da epidemia nestes locais.

Na casuística de Saquarema, observamos uma menor freqüência de amostras que geraram seqüências que vieram a se agrupar em algum cluster monofilético (ANEXO 3H). Esta menor freqüência está provavelmente relacionada a diferenças nas características das três coortes. Quando comparados aos pacientes do noroeste do estado, vimos que os pacientes de Saquarema eram mais provavelmente naturais de outras cidades que não o município em

estudo (Tabela 02). Tinham ainda uma maior chance de ter iniciado seu acompanhamento médico em outro local (Eyer-Silva 2007c). Enquanto que 60,2% dos pacientes de Saquarema nasceram em outros municípios, apenas 20,6% e 11,1% dos pacientes de Miracema e Santo Antonio de Pádua, respectivamente, não eram naturais daquelas cidades. Acreditamos, portanto, que estas casuísticas apresentam importantes diferenças epidemiológicas e demográficas que se manifestaram em sua epidemiologia molecular.

Nossos resultados também sugerem que a disseminação do HIV-1 nestas cidades não parece ser um evento iniciado no século XXI. Utilizando métodos bayesianos de coalescência, estimamos que os ancestrais comuns mais recentes que desencadearam as cadeias de transmissão que resultaram nos dois maiores clusters da casuística de Miracema estavam em circulação por volta dos anos de 1991 (1986-1995) e 1992 (1988-1996). Uma vez que todos os pacientes que compunham os clusters eram residentes do município, e que alguns destes pacientes estavam em estágios avançados de infecção pelo HIV-1 no início do século XXI, parece plausível que, por ocasião do seu surgimento, estas variantes fundadoras já estavam em circulação na própria cidade de Miracema. Estes números sugerem que no início da década de 1990, uma época em que pouco ou nada se falava sobre a interiorização da epidemia de Aids no país, duas cadeias de disseminação de linhagens distintas de subtipo B já tinham sido desencadeadas em Miracema. Não temos motivo para acreditar que redes de disseminação semelhante não tenham ocorrido, e que não estejam ocorrendo neste justo momento, em muitas outras pequenas cidades da região, do estado do Rio de Janeiro e do Brasil. Embora estes resultados devam ser interpretados tendo em mente as limitações de tamanho de amostra e estreito intervalo de tempo em que foram colhidas, acreditamos que contribuem para fazer com que a Aids seja definitivamente considerada um sério problema de saúde pública nestas localidades.



O estudo conjunto das seqüências de subtipo B dos municípios de Miracema e Santo Antonio de Pádua demonstrou a total independência das suas redes de transmissão (Eyer-Silva 2007b). Os resultados sugerem que cada um destes municípios vizinhos, cujos centros urbanos distam apenas 13Km, experimentou a introdução independente, com subsequente disseminação, de diferentes linhagens de subtipo B, em um padrão que não é indicativo de redes de transmissão comprometendo toda a sub-região noroeste fluminense, mas sim de múltiplas micro-epidemias difusamente distribuídas. A comparação dos clusters do noroeste do estado com os de Saquarema (dados não apresentados) também chegou a resultados semelhantes. De forma que as redes de transmissão estão se desenrolando, neste momento, no ambiente municipal, com características que devem ser próprias a cada cidade. O conjunto destas análises nos soa como uma grande sirene de alerta de que a disseminação do HIV-1 está ocorrendo em ambiente intramunicipal e de que é chegado o momento de mobilizar os esforços para desacelerar a transmissão sexual do HIV-1 nos pequenos municípios brasileiros.

Tivemos a oportunidade de conduzir investigações filogenéticas adicionais envolvendo a seqüência paduana 04BRSAP19, representativa do subtipo D, grupo M (Couto-Fernandez 2006). Em conjunto com quatro outras seqüências fluminenses que se agruparam com este subtipo, observamos uma estreita associação das variantes autóctones brasileiras com seqüências descritas, ainda na década de 1980, na África do Sul, país onde este subtipo ocorre apenas em casos isolados. O subtipo D ocorre principalmente em países da África oriental, notadamente Uganda, onde as prevalências de infecção pelo HIV-1 estão entre as maiores do planeta, e onde o subtipo A e suas formas recombinantes AD também são extremamente comuns (Rayfield 1998, Harris 2002). O subtipo D também ocorre como variante minoritária em países do sul e da costa ocidental da África (Bikandou 2000, Toure-Kane 2000). Já na África do Sul, o subtipo C foi incriminado como a variante predominante, com uma proporção de casos de infecção pelo subtipo B, sobretudo na população

homossexual (van Harmelen 1997, Bessong 2005). As seqüências sul-africanas de subtipo D disponíveis para análise foram geradas na década de 1980, no que talvez tenha sido um surto autolimitado desta variante naquele país. A estreita associação filogenética das seqüências sul-africanas com as variantes autóctones brasileiras sugere terem origem em um ancestral comum relativamente recente, anterior a década de 1990 e que provavelmente foi introduzido no Brasil, dando origem, por efeito fundador, a esta variante minoritária até o momento descrita apenas no estado do Rio de Janeiro. Sua ocorrência em três municípios fluminenses, inclusive na nossa Santo Antonio de Pádua, a partir de amostras colhidas com nove anos de intervalo (1996-2005), sugere que a introdução desta variante no país foi bem sucedida e que, embora não mostre sinal de disseminação epidêmica, precisa continuar a ser acompanhada através de estudos de diversidade genética do HIV-1 no Brasil.

A incrível diversidade de formas recombinantes BF1 registrada em outras casuísticas brasileiras (Sabino 1994, Thomson 2004, Brigido 2005, Sa Filho 2005, Sanabani 2006b) foi reproduzida em nossas análises. Esta é uma característica, aliás, da epidemiologia molecular do HIV-1 no Cone Sul (Carr 2001, Gomez Carrillo 2002). Esta extrema variedade de perfis recombinantes é indicativa de uma alta freqüência de infecções simultâneas, em um mesmo hospedeiro, envolvendo os subtipos B, F1 e suas formas mosaicas BF1. O instrumento da recombinação pode contrabalançar o efeito prejudicial de altas taxas replicativas pela recriação de genomas desprovidos de mutações deletérias (Chao 1990) e contribuir para a seleção de variantes com melhores capacidades adaptativas (Kellam & Larder 1995, Burke 1997). A emergência no Brasil dos subtipos CRF28\_BF e CRF29\_BF (De Sa Filho 2006) e a presente descrição de um cluster candidato a um novo CRF\_BF brasileiro indicam a contínua necessidade de se monitorar a epidemiologia molecular do HIV-1 no país.

O estudo das seqüências nucleotídicas virais da casuística de Miracema envolveu reconstruções filogenéticas obtidas de duas regiões genômicas diferentes, o envelope e a polimerase, possuidoras de taxas de evolução nucleotídica marcadamente distintas. Esta rara oportunidade de analisar uma casuística de “vida real” envolvendo 63 indivíduos, em circunstâncias talvez inéditas, nos permitiu comparar o resultado da filogenia destas duas regiões genômicas (Eyer-Silva & Morgado 2006). Sabemos que a introdução do exame de genotipagem do HIV para fins de decisões terapêuticas vem gerando uma crescente disponibilidade de seqüências da polimerase nos diversos bancos de dados eletrônicos (Hirsch 2003). Eis que esta região do genoma viral sempre foi tida como extremamente conservada e desprovida de sinal filogenético suficiente para encontrar aplicação em estudos epidemiológicos. A presença de mutações associadas a resistência genotípica aos anti-retrovirais também poderia gerar associações espúrias ou obscurecer associações verdadeiras, dependendo do conjunto de mutações entre os diversos *taxa* incluídos no alinhamento de estudo. O debate em torno de qual região do genoma viral melhor se aplica a estudos de cunho epidemiológico reúne extensa lista de artigos, eventualmente crivados de diatribes as mais violentas (Hue 2005).

Em condições ideais, as melhores inferências epidemiológicas seriam obtidas com a utilização de seqüências de genoma completo ou quase completo. Entretanto, fatores como o custo da geração das seqüências, a intensa carga computacional necessária para as análises filogenéticas, bem como a carência de um conjunto quantitativo e qualitativamente satisfatório de genomas completos para controle impossibilitam, em geral, o seu uso. Os estudos epidemiológicos com fragmentos genômicos parciais utilizaram mais comumente a região do envelope viral, possuidora das mais altas taxas de substituição nucleotídica (Kleim 1991, Ou 1992, Wolfs 1992, Arnold 1995, Oelrichs 2000, Nguyen 2002, French 2003). Alguns autores consideram esta alta taxa mutacional do gene do envelope a sua serventia, ao

passo que outros enxergam ali sua desvantagem. Há quem considere que a região hipervariável do envelope retém suas características mesmo após cinco anos de infecção (Kuiken 1996), embora outros investigadores tenham manifestado preocupação de que suas altas taxas evolutivas podem vir a obscurecer as inter-relações epidemiológicas após um certo período de tempo ter transcorrido entre a transmissão da infecção e a coleta da amostra para análise (Burger 1991, Arnold 1995, Holmes 1995, Lorenzo 1996). Outros investigadores optaram pelo gene *gag*, associado (Holmes 1995, Leitner 1996, Liitsola 1998, Yu 2001, Robbins 2002) ou não (Holmes 1993, Brown 1997, Yirell 1998) a inferências filogenéticas do envelope. Ainda o gene *tat* teve seus defensores (Lorenzo 1996, Lorenzo 2001).

Alguns pesquisadores chegaram a resultados que desacreditaram a viabilidade do gene da polimerase para estudos filogenéticos com fins de responder questões epidemiológicas (Albert 1994, Palmer 2002, Sturmer 2004). No nosso modo de ver, seus resultados desabonadores a esta região genômica se devem ao uso de fragmentos nucleotídicos de curta extensão (Albert 1994), ao uso de seqüências de pacientes usuários de drogas intravenosas - que talvez tenham sido receptores de múltiplas variantes virais (Palmer 2002) - ou a problemas metodológicos (Sturmer 2004), como pudemos constatar através de nossas próprias análises das seqüências publicadas (dados não apresentados). As inferências têm seus resultados comprometidos quando não há um sinal filogenético apropriado, uma correta escolha da metodologia filogenética (Hillis 1994, Leitner 1996, Hillis 1999, Posada & Crandall 2001), quando não se reúne um conjunto de seqüências-controle quantitativa e qualitativamente satisfatório (Learn & Mullins 2003), quando eventos de evolução (como hipermutação, saturação ou recombinação) se interpõem entre a transmissão viral e a coleta da amostra, ou simplesmente quando há viés associado a contaminação laboratorial, erros de edição de seqüências ou mesmo identificação equivocada de amostras (Korber 1995, Learn 1996).

Em contrapartida, outros investigadores descreveram a aplicabilidade do gene da polimerase para a determinação do subtipo viral (Cornelissen 1997) e observaram que esta região do genômica se mostrou tão útil à determinação de ligações epidemiológicas quanto o gene do envelope (Goujon 2000, Metzker 2002). Em um elegante ensaio, Hué e colaboradores (Hue 2004) pré-selecionaram 140 amostras que haviam gerado seqüências de polimerase de estreita distancia genética, geraram seus fragmentos *gag* e *env*, e demonstraram que todos os clusters visualizados no estudo da polimerase também estavam representados nas inferências filogenéticas dos demais fragmentos genômicos. Concluíram dessa forma que a semelhança genética das amostras pré-selecionadas não estava relacionada ao fato de ser este gene extremamente conservado: eram semelhanças representativas de uma real proximidade epidemiológica.

Os resultados que ora apresentamos se sustentam como uma oportunidade única, em nosso modo de ver, de se investigar a aplicabilidade do gene da polimerase a estudos de associações epidemiológicas. Como vimos, as investigações até então disponíveis ou versavam sobre amostras de um número limitado de pacientes ou foram conduzidas com base na pré-seleção de seqüências de grande similaridade genética entre si, expediente não isento de viés de seleção. Alternativamente, tivemos a oportunidade de estudar amostras de dezenas de pacientes posicionados em diferentes graus de proximidade nas diversas cadeias de transmissão e demonstramos que as reconstruções filogenéticas do envelope e da polimerase resultaram semelhantes. Ainda em conformidade com os resultados de Hué e colaboradores (Hue 2004), observamos que a presença de mutações associadas a resistência aos anti-retrovirais não introduziram viés às análises. Entretanto, ressaltamos que em situações em que as inter-relações epidemiológicas precisam ser investigadas com alto grau de refinamento (Lemey 2005a), ficam os investigadores com a possibilidade de remover do alinhamento os

códons onde sabidamente ocorrem mutações de resistência, de forma a evitar a ocorrência de um padrão de evolução paralela quando da presença de um conjunto similar de mutações entre dois *taxa*.

Outra cautela deverá ser observada quando a investigação envolver pacientes que possam ter sido infectados por múltiplas variantes virais, uma vez que a transmissão seletiva de certas cepas, a compartimentalização da infecção e as pressões seletivas *in vivo*, bem como eventos de recombinação entre as variantes simultaneamente presentes, mesmo que variantes intra-subtipo, podem vir a obscurecer, ou mesmo impedir, o estabelecimento da ligação epidemiológica. Em um estudo filogenético do envelope, por exemplo, o estabelecimento da ligação epidemiológica entre dois pacientes que haviam compartilhado seringas e equipamento de injeção só pôde ser feito após a geração e análise de diversas seqüências recuperadas tanto do compartimento plasmático como do proviral (Song 1999). Registremos como observação interessante o fato de que em nossa casuística de Miracema, a única situação em que não conseguimos demonstrar a associação filogenética das seqüências geradas de amostras de pacientes com ligação epidemiológica conhecida envolveu exatamente um usuário de drogas intravenosas (paciente M48) e suas parceiras sexuais (M45 e M54). Curiosamente, os previamente citados estudos que depuseram contra a aplicabilidade do gene da polimerase às investigações epidemiológicas também envolveram pacientes usuários de drogas intravenosas (Albert 1994, Palmer 2002). Devemos considerar a possibilidade de que o obscurecimento das relações epidemiológicas nestes estudos tenha sido causado pelo fato de envolver pacientes que tenham se infectado múltiplas vezes, com variantes independentes de HIV-1.

O conjunto de estudos aqui apresentado é primeira iniciativa de se estudar o perfil de resistência genotípica de coortes não situadas em grandes centros urbanos do país. Por

transcorrerem em cidades do interior com índices de desenvolvimento humano relativamente baixos, nossos resultados proporcionam uma oportunidade de se investigar em situações de “vida real” a eficácia dos esquemas terapêuticos e a ocorrência de variantes resistentes ao tratamento em comunidades relativamente pouco privilegiadas sócio-economicamente, porém com amplo acesso aos esquemas terapêuticos (Eyer-Silva & Morgado 2005 e ANEXO 3I). O pioneirismo do Brasil na ampla disponibilização destes esquemas terapêuticos como que nos obriga a conduzir ensaios desta natureza.

Os estudos de prevalência de mutações associadas a resistência anti-retroviral são muitas vezes de difícil comparação entre si. Seus resultados devem ser interpretados tendo em mente o grau de acesso ao tratamento pelos que dele necessitam na região do estudo, os padrões locais de recomendação e elegibilidade e as condutas terapêuticas de combinações de drogas específicas. Adicionalmente, devemos considerar as características inerentes da casuística estudada, que pode ser composta exclusivamente de pacientes em falha virológica, ou, por outra, nunca antes expostos às medicações, amostras com indicadores sorológicos de infecção recente ou estabelecida, etc. Além disso, devemos observar o compartimento do qual foram geradas as seqüências, como o RNA viral extraído do plasma ou do líquido cefalorraquidiano, o DNA viral extraído das células mononucleares do sangue periférico, ou ainda dos mais diversos tecidos. As análises de resistência podem ainda seguir protocolos genotípicos ou fenotípicos, além de poderem ser interpretadas tendo em mente a diversidade de grupos e subtipos virais (Wainberg 2004) e os diversos algoritmos de interpretação disponíveis (Vercauteren & Vandamme 2006). De fato, o estudo da resistência aos anti-retrovirais caminha a passos largos para se tornar uma especialidade dentro da especialidade.

Uma vez que desejávamos estudar genotipicamente amostras de todos os pacientes da casuística, mesmo daqueles com carga viral plasmática muito baixa ou inferior ao limite de

detecção, situação que impossibilita a amplificação do RNA plasmático, optamos por amplificar seqüências de DNA proviral do compartimento celular, mais especificamente das células mononucleares circulantes no sangue periférico. Embora estejamos cientes de que as mutações associadas a resistência podem ser detectadas mais precocemente no compartimento plasmático do que no celular (Kaye 1995, Bi 2003), temos substanciais dados de literatura que demonstram que o compartimento celular é suficientemente representativo do espectro de *quasispecies* para que seja utilizado em análises genótípicas (Devereux 2000, Sarmati 2003, Chew 2005, Parisi 2007, Vicenti 2007). Adicionalmente, as seqüências provirais podem ser úteis na detecção de mutações arquivadas, previamente selecionadas por esquemas terapêuticos anteriores (Sarmati 2003, Parisi 2005) e demonstraram ter maior sensibilidade na detecção de mutações em amostras de pacientes que não estejam em tratamento quando da coleta, porém previamente expostos a esquemas terapêuticos (Venturi 2002). De fato, neste estudo demonstramos a presença de mutações associadas a resistência em quatro pacientes com carga viral abaixo do limite de detecção (pacientes M07, M12, 04BRSAP01, e 04BRSAP07) e dois pacientes que haviam interrompido seus esquemas de tratamento (05BRSQ-21 e 05BRSQ-33). E certamente, as seqüências provirais são a alternativa para o estudo genotípico de amostras com carga viral plasmática muito baixa ou abaixo do limite de detecção, e, nestes casos, podem encontrar aplicações clínicas quando esteja sendo considerada a troca, por intolerância ou comodidade posológica, de esquemas de tratamento.

Entre 84 seqüências de pacientes virgens de tratamento, uma (1,2%) foi considerada resistente a análogos timidínicos da transcriptase reversa (com resistência de baixo grau ao abacavir, didanosina e tenofovir). Esta seqüência (06BRSQ-94) contava uma mutação TAM (D67N), associada a duas modificações não convencionais em códons também associados ao grupo TAM: K70S e T215D. A mutação K70S já foi descrita em pacientes com extenso uso de análogos nucleosídicos (Lawrence 1999). Já a mutação T215D é descrita em pacientes



virgens de tratamento como sendo uma reversão parcial das mutações T215Y ou T215F (Miller 2000), estas sim, definitivamente TAMs. Esta mutação T215D parece surgir como uma adaptação de uma variante resistente visando a melhora do *fitness* viral na ausência de análogos timidínicos. Embora a T215D não diminua a sensibilidade viral aos fármacos, sua presença pode levar a uma mais rápida aquisição de mutações de resistência no códon 215, sob a pressão seletiva de análogos timidínicos (Garcia-Lerma 2001, Violin 2004). Estes resultados implicam que uma variante resistente foi transmitida a esta paciente da casuística de Saquarema, ou que o uso anterior de agentes anti-retrovirais foi deliberadamente omitido.

Outras seis seqüências geradas de amostras de pacientes virgens de tratamento apresentaram polimorfismos ou mutações em códons associados a resistência. A seqüência 05BRSQ-83\_PED abrigava a mutação V118I, que ocorre em cerca de 2% dos pacientes nunca tratados e vem sendo descrita em pacientes brasileiros virgens de tratamento (Dumans 2002, Brindeiro 2003). Este polimorfismo não vem sendo atualmente considerado indicativo de resistência quando não acompanhado da mutação E44D (Booth 2007). O algoritmo de Stanford previu sensibilidade mantida para esta seqüência. Quatro seqüências traziam o polimorfismo V179D (05BRSAP26, 05BRSAP28, 06BRSAP31 e 06BRSAP33), que ocorre em 3% dos indivíduos virgens de tratamento infectados com o subtipo B e leva a resistência potencial de baixo grau a cada agente não-nucleosídico atualmente disponível (Rhee 2005). As análises filogenéticas (Figuras 3 e 6) mostram que estas quatro seqüências formam um forte cluster monofilético e foram geradas de amostras de indivíduos que provavelmente estão muito próximos na cadeia de transmissão viral. Não sabemos se este cluster da casuística de Santo Antonio de Pádua representa um reservatório de variantes potencialmente resistentes a agentes não-nucleosídicos e com potencial para disseminação. A seqüência 06BRSAP30 continha a mutação T69N, interpretada como um potencial para resistência de baixo grau a inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (Winters & Merigan 2001). Esta mutação

vem ser a alteração não aspartato mais comum no códon 69 e também já foi registrada em pacientes brasileiros virgens de tratamento (Pires 2004).

Entre os 61 pacientes em uso de terapia anti-retroviral por ocasião da coleta da genotipagem, observamos que 43 (70,5%) estavam com a carga viral plasmática abaixo do limite de detecção. Destes, 39 (63,9%) não tinham sinais de resistência genotípica aos fármacos. Esta taxa de sucesso terapêutico nos parece satisfatória, sobretudo por muitos dos casos de falência virológica estarem associados ao uso prévio de esquemas hoje tidos como obsoletos. Em toda a casuística, apenas cinco seqüências mostraram sensibilidade reduzida aos inibidores da protease. Apenas uma teve diminuição da sensibilidade a representantes de todas as três classes de anti-retrovirais utilizadas no período de estudo.

A freqüência de 81% de mutações secundárias no gene da protease entre as seqüências geradas de amostras de pacientes virgens de tratamento se mostrou similar a registrada em outros estudos brasileiros: 85% entre doadores de sangue no Rio de Janeiro (Dumans 2002), 85,7% em um hospital militar no Rio de Janeiro (Pires 2004), 79,8% entre pacientes acompanhados em Pernambuco (Medeiros 2006). O número relativamente pequeno de polimerases não-B em nossa casuística não nos permitiu estimar se a freqüência de mutações secundárias na protease difere em relação às polimerases representativas do subtipo B. Entretanto, sabemos que variantes não-B, como, por exemplo, o subtipo C (Soares 2003), tendem a apresentar um maior número de mutações secundárias. Alguns autores levantaram a hipótese de que o registro de sua presença antes do início do tratamento diminui a barreira genética e pode estar associado a um risco maior de subsequente emergência de mutações primárias e falência virológica (Perno 2001), embora este tema mantenha-se controverso (Frater 2002). Recentemente, a presença prévia das mutações M36I e L10I/V foi associada à subsequente emergência da mutação primária L90M (Perno 2004). Outros investigadores

apontaram a mutação M89I/V nos subtipo F (para este subtipo, o aminoácido metionina é considerado o códon selvagem na posição 89, em contraste com a leucina no subtipo B) deve ser considerada uma importante mutação secundária, com grande impacto na susceptibilidade ao nelfinavir quando da presença de L90M (Abecasis 2005). Como nosso país registra um crescente e diversificado elenco de subtipos não-B, o estudo das mutações secundárias na protease deve continuar merecendo nossa atenção.

Dentre as limitações deste nosso inquérito sobre resistência anti-HIV-1 em três cidades do interior do estado do Rio de Janeiro, devemos destacar a pouca sensibilidade dos estudos genotípicos tradicionais, sustentados no seqüenciamento de populações de *quasispecies*, para a detecção de variantes minoritárias. Desta forma, as análises podem deixar escapar populações virais selecionadas por esquemas terapêuticos anteriores ou ainda variantes resistentes, não mais majoritárias, transmitidas a indivíduos ainda virgens de tratamento. Um painel representativo de toda a abrangência de populações virais clinicamente importantes só seria possível com extensos seqüenciamentos clonais dos produtos de amplificação da reação da polimerase em cadeia. Conforme discutido acima, o compartimento proviral é apenas um dos compartimentos virais que podem ser alvos dos estudos de resistência. A população proviral pode não ser representativa de variantes emergentes no plasma e ainda não freqüentes no compartimento celular. Destacamos ainda a abrangência geograficamente restrita deste inquérito, bem como seu número limitado de pacientes.

As relativamente baixas freqüências de resistência primária e secundária nas presentes casuísticas do interior do estado do Rio de Janeiro contribuem para o debate sobre a conveniência de proporcionar acesso universal e gratuito de terapia anti-retroviral em países em desenvolvimento. Não há evidências de que a terapia anti-retroviral de alta atividade, com toda a sua complexidade, seja, nestes locais, mais propensa ao desenvolvimento e

disseminação de variantes virais resistentes (Lange 2004). As legítimas preocupações com uma adequada adesão ao tratamento não devem ser um obstáculo a que os pacientes que habitam regiões menos favorecidas deixem de se lhe beneficiar.

Os números da epidemia de Aids no Brasil apontam para uma expansão da epidemia dos grandes centros urbanos para os pequenos municípios do interior. Pouco se sabe sobre as características clínicas, epidemiológicas e virológicas associadas à infecção pelo HIV-1 no interior do país. O conjunto de estudos aqui apresentado será talvez uma tímida tentativa inicial de melhor compreender esta disseminação, de forma a podermos reunir nosso melhor arsenal para combatê-la. São inúmeros os desafios de ordem médica, social e logística que temos pela frente. As pequenas comunidades brasileiras contam, em geral, com infra-estrutura médica menos abrangente e lhes faltam profissionais com experiência no tratamento da infecção pelo HIV-1. Precisamos entender melhor o espectro de complicações clínicas da Aids no interior. Precisamos melhor estudar as barreiras que se nos irão interpor ao controle da epidemia, como a complexa questão da confidencialidade nas pequenas comunidades. Precisamos de estudos adicionais sobre a epidemiologia molecular e a prevalência de resistência aos fármacos anti-retrovirais. Precisamos, sobretudo, de campanhas educativas que informem com cristalina clareza que a Aids não é mais (e talvez nunca tenha sido, como vimos) um problema restrito aos grandes centros urbanos do país. Os moradores das pequenas cidades precisam ser urgentemente informados que acreditar que o HIV-1 é um problema longe de si apenas contribuirá para um considerável aumento de sua vulnerabilidade à aquisição da infecção.

## CONCLUSÕES

# A infecção pelo HIV-1 nestes três municípios do interior do estado do Rio de Janeiro se caracteriza pelo perfil predominantemente heterossexual, com uma razão de sexos homem-mulher de 1,1;

# Quase 60% dos pacientes iniciaram acompanhamento em estágios avançados de infecção pelo HIV-1, o que sugere a existência de um grande reservatório de casos não diagnosticados na comunidade;

# A *idade* e o *sexo masculino* foram variáveis que se mostraram independentemente associadas a um estágio definidor de Aids quando da apresentação;

# Mais de 90% dos pacientes eram residentes nas cidades em estudo, o que demonstra uma grande demanda local por serviços de aconselhamento, testagem e tratamento da infecção pelo HIV-1 e suas complicações. Dessa forma, acreditamos que o estabelecimento do maior número possível de programas municipais de HIV-1/Aids, dotados de equipe multidisciplinar comprometida com a causa, será parte importante da luta contra a interiorização da epidemia no Brasil;

# Entre os pacientes em estágio C do CDC nas duas cidades do noroeste fluminense, 14,5% desenvolveram meningoencefalite por *Cryptococcus neoformans*;

# Dentre as seqüências geradas de amostras de um total de 221 pacientes, registramos a ocorrência dos subtipos B em 190 (86%), F1 em 14 (6,3%), CRF02\_AG em duas (0,9%), D em duas (0,9%), além de variantes recombinantes intersubtipo com regiões representativas

dos subtipos B e F1 em 13 (5,9%) amostras. Embora os subtipos B e F1 sejam os mais prevalentes no sudeste do Brasil, as variantes D e CRF02\_AG haviam sido até então descritas apenas em casos isolados na capital fluminense;

# Uma das seqüências recombinantes BF1 pertence, em conjunto com outras três seqüências de nosso laboratório, a um cluster candidato a um novo CRF\_BF brasileiro;

# Apresentamos a primeira evidência molecular de transmissão autóctone do CRF01\_AG, uma variante de HIV-1 de grande importância global;

# O conjunto destes resultados indica que, embora tenham seu próprio perfil de epidemiologia molecular, as pequenas cidades do interior tendem a rapidamente absorver e refletir a diversidade genética registrada nos grandes centros urbanos;

# As seqüências brasileiras autóctones de subtipo D guardam grande similaridade genética com seqüências deste subtipo descritas na África do Sul ao longo da década de 1980, um país onde esta variante ocorre apenas em casos isolados. Nossos resultados sugerem a introdução bem sucedida desta variante no sudeste brasileiro a partir do efeito fundador de uma seqüência ancestral de provável origem sul-africana;

# Os estudos de eficácia dos esquemas anti-retrovirais mostraram que 70% dos pacientes em tratamento quando da coleta da amostra estavam com a carga viral plasmática abaixo do limite de detecção;

# Os estudos de prevalência de resistência genotípica aos fármacos inibidores da transcriptase reversa e da protease mostraram um caso (1,2%) de resistência primária entre 84

pacientes virgens de tratamento. Entre aqueles que estavam em uso de esquemas anti-retrovirais quando da coleta, 31,1% apresentavam diminuição da sensibilidade a algum agente anti-retroviral. Apenas cinco casos de diminuição da sensibilidade aos inibidores da protease foram registrados em toda a casuística;

# A baixa prevalência de resistência anti-retroviral nestas comunidades pouco privilegiadas economicamente, porém com amplo acesso às medicações componentes dos esquemas terapêuticos, contribui para o debate sobre a conveniência de acesso universal da terapia anti-retroviral em países do terceiro mundo;

# Nossos dados sustentam que, por mais complexos que sejam os esquemas de tratamento, comunidades menos favorecidas economicamente não devem deixar de se beneficiar da terapia anti-retroviral e que não há evidências de que estejam mais propensas a emergência e disseminação de variantes resistentes às drogas;

# As reconstruções filogenéticas mostraram perfis polifiléticos, sugestivos de múltiplas introduções virais nas cidades estudadas. Mostraram ainda a ocorrência de clusters monofiléticos de seqüências que guardam grande similaridade genética entre si e que foram geradas de amostras de pacientes que provavelmente tomaram parte na mesma cadeia de transmissão viral;

# Análises de regressão logística identificaram que *ter sempre residido na cidade em estudo* e *ter uma relação epidemiológica conhecida com algum outro componente da casuística* são variáveis independentemente associadas a ser um paciente cuja amostra gerou seqüências que se abrigaram em algum cluster monofilético;

# A alta frequência de seqüências que vieram a se agrupar em algum cluster monofilético sugere a existência de redes de interação sexual nas comunidades e é um indicativo de que múltiplas novas infecções estão ocorrendo em um intervalo de tempo relativamente curto. Este perfil molecular é sugestivo de alta incidência e chama a atenção para a necessidade urgente de se conduzir estudos de prevalência nas pequenas cidades do interior do Brasil;

# Análises de coalescência sugerem que os ancestrais comuns mais recentes que desencadearam as duas cadeias de transmissão que resultaram nos dois maiores clusters de Miracema já estavam em circulação no início da década de 1990. A demonstração de que a disseminação dessas variantes fundadoras já estava em curso em uma época em que pouco ou nada se falava sobre a interiorização da epidemia no Brasil pode ter importantes implicações de saúde pública;

# Ao compararmos os clusters monofiléticos dos dois municípios vizinhos de Miracema e Santo Antonio de Pádua observamos a total independência dessas redes de transmissão. Os resultados sugerem que cada uma dessas cidades experimentou a introdução independente, com subsequente disseminação, de diferentes linhagens de subtipo B, em um padrão indicativo, não de redes de transmissão comprometendo toda a sub-região noroeste fluminense, mas sim de múltiplas micro-epidemias difusamente distribuídas e desenrolando-se em ambiente municipal;

# As reconstruções filogenéticas dos genes do envelope e da polimerase produziram resultados em todo similares, demonstrando que, apesar de ser uma região genômica extremamente conservada, a crescente disponibilidade de seqüências de polimerase geradas



para fins de estudos de resistência genotípica pode encontrar aplicabilidade adicional para estudos de cunho epidemiológico;

# Acreditamos que o conjunto de estudos aqui apresentado é indicativo de que a Aids não poderá mais deixar de ser considerada um grave problema de saúde pública restrito aos grandes centros urbanos do país. Necessitamos urgentemente de estratégias de controle da interiorização da Aids no Brasil, incluindo campanhas que informem com clareza aos residentes das pequenas cidades do interior que acreditar que o HIV-1 é um problema longe de si somente irá aumentar sua vulnerabilidade de aquisição da infecção.

## REFERÊNCIAS

- Abecasis AB, Deforche K, Snoeck J, Bachelier LT, McKenna P, Carvalho AP, Gomes P, Camacho RJ, Vandamme AM. Protease mutation M89I/V is linked to therapy failure in patients infected with the HIV-1 non-B subtypes C, F or G. *AIDS* 2005; 19:1799-806.
- Alaeus A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:455-63.
- Albert J, Wahlberg J, Leitner T, Escanilla D, Uhlen M. Analysis of a rape case by direct sequencing of the human immunodeficiency virus type 1 pol and gag genes. *J Virol* 1994; 68:5918-24.
- Anderson RM, Schwartlander B, McCutchan F, Hu D. Implications of genetic variability in HIV for epidemiology and public health. *Lancet* 1996; 347:1778-9.
- Andreo SM, Barra LA, Costa LJ, Sucupira MC, Souza IE, Diaz RS. HIV type 1 transmission by human bite. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:349-50.
- Arnold C, Balfe P, Clewley JP. Sequence distances between env genes of HIV-1 from individuals infected from the same source: implications for the investigation of possible transmission events. *Virology* 1995; 211:198-203.
- Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970; 226:1209-11.
- Banaschak S, Werwein M, Brinkmann B, Hauber I. Human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual abuse: value of nucleic acid sequence analysis in identifying the offender. *Clin Infect Dis* 2000; 31:1098-100.
- Barre-Sinoussi F. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 1996; 348:31-5.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:868-71.

- Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:338-41.
- Basílio-de-Oliveira CA. Infecções oportunistas pulmonares em necropsias na síndrome de imunodeficiência adquirida. Academia Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, Brazil 1997;
- Bastos FI, Strathdee AS, Derriço M, Pina MF. Drug use and the spread of HIV/AIDS in South America and the Caribbean. *Drugs: Education, Prevention and Policy* 1999; 6:29-49.
- Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SL, Morgado MG. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol* 2007; 7:263-270.
- Bessong PO, Larry Obi C, Cilliers T, Choge I, Phoswa M, Pillay C, Papathanasopoulos M, Morris L. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 from a previously unexplored region of South Africa with a high HIV prevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21:103-9.
- Bi X, Gatanaga H, Ida S, Tsuchiya K, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, Oka S. Emergence of protease inhibitor resistance-associated mutations in plasma HIV-1 precedes that in proviruses of peripheral blood mononuclear cells by more than a year. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34:1-6.
- Bikandou B, Takehisa J, Mboudjeka I, Ido E, Kuwata T, Miyazaki Y, Moriyama H, Harada Y, Taniguchi Y, Ichimura H, Ikeda M, Ndolo PJ, Nzoukoudi MY, M'Vouenze R, M'Pandi M, Parra HJ, M'Pele P, Hayami M. Genetic subtypes of HIV type 1 in Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:613-9.
- Blackard JT, Cohen DE, Mayer KH. Human immunodeficiency virus superinfection and recombination: current state of knowledge and potential clinical consequences. *Clin Infect Dis* 2002; 34:1108-14.
- Blanchard A, Ferris S, Chamaret S, Guetard D, Montagnier L. Molecular evidence for nosocomial transmission of human immunodeficiency virus from a surgeon to one of his patients. *J Virol* 1998; 72:4537-40.

- Bonhoeffer S, Holmes EC, Nowak MA. Causes of HIV diversity. *Nature* 1995; 376:125.
- Booth CL, Garcia-Diaz AM, Youle MS, Johnson MA, Phillips A, Geretti AM. Prevalence and predictors of antiretroviral drug resistance in newly diagnosed HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2007;
- Brasil, Ministério da Saúde. Tendência da epidemia. *Boletim epidemiológico AIDS*, XI, no. 01. 1998;
- Brasil, Ministério da Saúde. *Boletim Epidemiológico AIDS*, Ano XIII, no. 01, 2000a.
- Brasil, Ministério da Saúde. *Boletim epidemiológico AIDS*, XIII, no. 03, 2000b.
- Brasil, Ministério da Saúde. Diagnóstico Sorológico da Infecção pelo HIV. (Comentários sobre a Portaria nº 488/98 do Ministério da Saúde). Disponível no sítio: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS4AAA6ADAPTBRIE.htm> , 2003.
- Brasil, Ministério da Saúde. *Boletim epidemiológico AIDS*, janeiro a junho de 2006, 2006.
- Brigido LF, Franco HM, Custodio RM, Oliveira CA, JL PF, Eira M, Bergel F, Araujo F, Carvalheiro JR, Rodrigues R. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21:673-82.
- Brindeiro PA, Brindeiro RM, Mortensen C, Hertogs K, De Vroey V, Rubini NP, Sion FS, De Sa CA, Machado DM, Succi RC, Tanuri A. Testing genotypic and phenotypic resistance in human immunodeficiency virus type 1 isolates of clade B and other clades from children failing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4512-9.
- Brindeiro R, Vanderborcht B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, Stuyver L, Tanuri A. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1674-80.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17:1063-9.

- Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34:207-17.
- Brown AJ, Lobidel D, Wade CM, Rebus S, Phillips AN, Brettle RP, France AJ, Leen CS, McMennamin J, McMillan A, Maw RD, Mulcahy F, Robertson JR, Sankar KN, Scott G, Wyld R, Peutherer JF. The molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 in six cities in Britain and Ireland. *Virology* 1997; 235:166-77.
- Burger H, Weiser B, Flaherty K, Gulla J, Nguyen PN, Gibbs RA. Evolution of human immunodeficiency virus type 1 nucleotide sequence diversity among close contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:11236-40.
- Burke DS. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. *Emerg Infect Dis* 1997; 3:253-9.
- Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* 2000; 132:71-91.
- Campos DP, Ribeiro SR, Grinsztejn B, Veloso VG, Valente JG, Bastos FI, Morgado MG, Gadelha AJ. Survival of AIDS patients using two case definitions, Rio de Janeiro, Brazil, 1986-2003. *AIDS* 2005; 19 Suppl 4:S22-6.
- Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, de Sa CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2000; 275:107-15.
- Caride E, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Brindeiro R, Machado E, de Sa CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A. Genotypic and phenotypic evidence of different drug-resistance mutation patterns between B and non-B subtype isolates of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virus Genes* 2001; 23:193-202.
- Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M, Salomon H, Hierholzer J, Watanaveeradej V, Pando MA, Negrete M, Russell KL, Sanchez J, Birx DL, Andrade R, Vinales J, McCutchan FE. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 2001; 15:F41-7.

- Carr JK, Salminen MO, Albert J, Sanders-Buell E, Gotte D, Birx DL, McCutchan FE. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants. *Virology* 1998; 247:22-31.
- Carré H, Vallé H. Sur l'anémie infectieuse du cheval. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de la Académie des Sciences* 1904; 139:1239-1241.
- CDC. Follow-up on Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981a; 30:409-10.
- CDC. Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981b; 30:305-8.
- CDC. *Pneumocystis pneumonia*--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981c; 30:250-2.
- CDC. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992; 41:961-962.
- Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99:877-82.
- Chao L. Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* 1990; 348:454-5.
- Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Saengwonloey O, Nelson KE. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994--1998: regional variation and temporal trends. *Clin Infect Dis* 2001; 32:955-62.
- Chew CB, Potter SJ, Wang B, Wang YM, Shaw CO, Dwyer DE, Saksena NK. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. *J Clin Virol* 2005; 33:206-16.
- Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995; 267:483-9.
- Colton T (1974). "Statistics in Medicine." Little, Brown and Company, Boston.

- Cornelissen M, van den Burg R, Zorgdrager F, Lukashov V, Goudsmit J. pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J Virol* 1997; 71:6348-58.
- Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:207-11.
- Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJ, Morgado MG. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:73-8.
- Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19:74-9.
- Crawley MJ (2005). "Statistics - An introduction using R." John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, England.
- De Sa Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006; 22:1-13.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996; 273:1856-62.
- Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rubsamen-Waigmann H, Mullins JI. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993; 262:1257-61.

- Desrosiers RC (2001). Nonhuman lentiviruses. *In* "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Devereux HL, Loveday C, Youle M, Sabin CA, Burke A, Johnson M. Substantial correlation between HIV type 1 drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells in treatment-experienced patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:1025-30.
- Dietrich U, Grez M, von Briesen H, Panhans B, Geissendorfer M, Kuhnel H, Maniar J, Mahambre G, Becker WB, Becker ML, et al. HIV-1 strains from India are highly divergent from prototypic African and US/European strains, but are linked to a South African isolate. *AIDS* 1993; 7:23-7.
- Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, Mori J, Rickett G, Smith-Burchnell C, Napier C, Webster R, Armour D, Price D, Stammen B, Wood A, Perros M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4721-32.
- Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 2002; 161:1307-20.
- BEAST v1.0, Disponível em [http://beast.bio.ed.ac.uk/Main\\_Page](http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page).
- Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, Kalish ML, De Vroey V, Hertogs K, Tanuri A. 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* 2002; 46:3075-9.
- Eyer-Silva WA. Infecção pelo HIV-1 e Aids em Miracema, Noroeste fluminense - Tese de Mestrado. Departamento de Medicina Tropical, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz (RJ) 2002; 179pp.
- Eyer-Silva WA. [Male circumcision and HIV heterosexual transmission]. *Rev Saude Publica* 2003; 37:678-86.



- Eyer-Silva WA. A origem zoonótica dos agentes etiológicos da Aids. *In* "ATLAIDS - Atlas de patologia da síndrome de imunodeficiência adquirida" (C. A. Basilio-de-Oliveira, Ed.). Editora Atheneu, São Paulo, 2005a.
- Eyer-Silva WA, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG. HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. *Rev Saude Publica* 2005b; 39:950-5.
- Eyer-Silva WA, Bello G, Morgado MG. Molecular evidence that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) dissemination in a small Brazilian city was already taking place in the early 1990s. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, no prelo 2007a.
- Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007b; 23:303-8.
- Eyer-Silva WA, Freire MAL, Gayão ML, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG. Epidemiologic features of HIV infection in 3 small cities in inner Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, no prelo 2007c.
- Eyer-Silva WA, Morgado MG. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:869-73.
- Eyer-Silva WA, Morgado MG. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:664-70.
- Felsenstein J. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Am J Hum Genet* 1973; 25:471-92.
- Felsenstein J. Distance methods for inferring phylogenies. *Evolution* 1984; 38:16-24.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; 39:783-91.
- Felsenstein J. PHYLIP: phylogenetic inferencepackage (version 3.2). *Cladistics* 1989; 5:164-166.

- Felsenstein J (2004a). Distance matrix methods. *In* "Inferring phylogenies" (J. Felsenstein, Ed.). Sinauer associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Felsenstein J (2004b). Finding the best tree by heuristic search. *In* "Inferring phylogenies" (J. Felsenstein, Ed.). Sinauer associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Fonseca MG, Szwarcwald CL, Bastos FI. [A sociodemographic analysis of the AIDS epidemic in Brazil, 1989-1997]. *Rev Saude Publica* 2002; 36:678-85.
- Fox J (2002). "An R and S-Plus Companion to Applied Regression." Sage Publications, Thousand Oaks, California.
- Frater J, Dunn D, Weber JN, McClure MO. Association between secondary mutations in human immunodeficiency virus type 1 protease and therapeutic outcome. *J Infect Dis* 2002; 185:1376; author reply 1376-7.
- Freed EO, Martin MA (2001). HIVs and their replication. *In* "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- French MA, Herring BL, Kaldor JM, Sayer DC, Furner V, de Chaneet CC, Dwyer DE. Intrafamilial transmission of HIV-1 infection from individuals with unrecognized HIV-1 infection. *AIDS* 2003; 17:1977-81.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220:865-7.
- Gao F, Robertson DL, Morrison SG, Hui H, Craig S, Decker J, Fultz PN, Girard M, Shaw GM, Hahn BH, Sharp PM. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996; 70:7013-29.
- Garcia-Lerma JG, Nidtha S, Blumoff K, Weinstock H, Heneine W. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naive persons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:13907-12.

- Goff SP (2001). Retroviridae: retroviruses and their replication. *In* "Fields Virology" (D. M. Knipe, and P. M. Howley, Eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Gomez Carrillo M, Avila M, Hierholzer J, Pando M, Martinez PL, McCutchan FE, Carr JK. Mother-to-child HIV type 1 transmission in Argentina: BF recombinants have predominated in infected children since the mid-1980s. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:477-83.
- Goncalves AP, De Sa CA, Rubini N. [HIV/AIDS infection. The Brazilian view. AIDS in Brazil]. *An R Acad Nac Med (Madr)* 1996; Spec No:145-56.
- Goujon CP, Schneider VM, Grofti J, Montigny J, Jeantils V, Astagneau P, Rozenbaum W, Lot F, Frocrain-Herchkovitch C, Delphin N, Le Gal F, Nicolas JC, Milinkovitch MC, Deny P. Phylogenetic analyses indicate an atypical nurse-to-patient transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2000; 74:2525-32.
- Gross L. "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 76:27-32.
- Guimaraes ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:1261-9.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95-98.
- Harris ME, Serwadda D, Sewankambo N, Kim B, Kigozi G, Kiwanuka N, Phillips JB, Wabwire F, Meehen M, Lutalo T, Lane JR, Merling R, Gray R, Wawer M, Birx DL, Robb ML, McCutchan FE. Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:1281-90.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1985; 22:160-74.
- Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20:W13-23.

- Hendrix CW, Collier AC, Lederman MM, Schols D, Pollard RB, Brown S, Jackson JB, Coombs RW, Glesby MJ, Flexner CW, Bridger GJ, Badel K, MacFarland RT, Henson GW, Calandra G. Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2004; 37:1253-62.
- Hillis DM (1999). Phylogenetics and the study of HIV. *In "The Evolution of HIV"* (K. A. Crandall, Ed.). The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Hillis DM, Huelsenbeck JP, Cunningham CW. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 1994; 264:671-7.
- Hirsch MS, Brun-Vezinet F, Clotet B, Conway B, Kuritzkes DR, D'Aquila RT, Demeter LM, Hammer SM, Johnson VA, Loveday C, Mellors JW, Jacobsen DM, Richman DD. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. *Clin Infect Dis* 2003; 37:113-28.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-6.
- Holmes EC, Zhang LQ, Robertson P, Cleland A, Harvey E, Simmonds P, Leigh Brown AJ. The molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 in Edinburgh. *J Infect Dis* 1995; 171:45-53.
- Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Rogers AS, Brown AJ. Molecular investigation of human immunodeficiency virus (HIV) infection in a patient of an HIV-infected surgeon. *J Infect Dis* 1993; 167:1411-4.
- Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, Luo CC, Kalish ML, Weniger BG, Pau CP, Schable CA, Curran JW. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *Jama* 1996; 275:210-6.
- Hue S, Clewley JP, Cane PA, Pillay D. HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18:719-28.

- Hue S, Clewley JP, Cane PA, Pillay D. Investigation of HIV-1 transmission events by phylogenetic methods: requirement for scientific rigour. *AIDS* 2005; 19:449-50.
- Huson DH. SplitsTree: analyzing and visualizing evolutionary data. *Bioinformatics* 1998; 14:68-73.
- Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol* 2006; 23:254-67.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Censo Demográfico de 2000, 2007.
- Ihaka R, Gentleman R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 1996; 5:299-314.
- IPEA - Instituto de Pesquisas Econômicas e Aplicadas - Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil, 2003.
- Jaffe HW, McCurdy JM, Kalish ML, Liberti T, Metellus G, Bowman BH, Richards SB, Neasman AR, Witte JJ. Lack of HIV transmission in the practice of a dentist with AIDS. *Ann Intern Med* 1994; 121:855-9.
- Janssens W, Buve A, Nkengasong JN. The puzzle of HIV-1 subtypes in Africa. *AIDS* 1997; 11:705-12.
- Jarrett WF, Crawford EM, Martin WB, Davie F. A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 1964a; 202:567-9.
- Jarrett WF, Martin WB, Crighton GW, Dalton RG, Stewart MF. Transmission Experiments with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 1964b; 202:566-7.
- Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. *Top HIV Med* 2006; 14:125-30.
- Kaplan AH, Zack JA, Knigge M, Paul DA, Kempf DJ, Norbeck DW, Swanstrom R. Partial inhibition of the human immunodeficiency virus type 1 protease results in aberrant virus assembly and the formation of noninfectious particles. *J Virol* 1993; 67:4050-5.

- Kato K, Shiino T, Kusagawa S, Sato H, Nohtomi K, Shibamura K, Nguyen TH, Pham KC, Truong XL, Mai HA, Hoang TL, Bunyaraksyotin G, Fukushima Y, Honda M, Wasi C, Yamazaki S, Nagai Y, Takebe Y. Genetic similarity of HIV type 1 subtype E in a recent outbreak among injecting drug users in northern Vietnam to strains in Guangxi Province of southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15:1157-68.
- Kaye S, Comber E, Tenant-Flowers M, Loveday C. The appearance of drug resistance-associated point mutations in HIV type 1 plasma RNA precedes their appearance in proviral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:1221-5.
- Kellam P, Larder BA. Retroviral recombination can lead to linkage of reverse transcriptase mutations that confer increased zidovudine resistance. *J Virol* 1995; 69:669-74.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16:111-20.
- Kleim JP, Ackermann A, Brackmann HH, Gahr M, Schneweis KE. Epidemiologically closely related viruses from hemophilia B patients display high homology in two hypervariable regions of the HIV-1 env gene. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7:417-21.
- Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, Sigal IS. Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:4686-90.
- Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S, Bhattacharya T. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 2000; 288:1789-96.
- Korber BT, Learn G, Mullins JI, Hahn BH, Wolinsky S. Protecting HIV databases. *Nature* 1995; 378:242-4.
- Kuiken C, Thakallapalli R, Esklid A, de Ronde A. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol* 2000; 152:814-22.
- Kuiken CL, Lukashov VV, Baan E, Dekker J, Leunissen JA, Goudsmit J. Evidence for limited within-person evolution of the V3 domain of the HIV-1 envelope in the amsterdam population. *AIDS* 1996; 10:31-7.

- Lange JM, Perriens J, Kuritzkes D, Zewdie D. What policymakers should know about drug resistance and adherence in the context of scaling-up treatment of HIV infection. *AIDS* 2004; 18 Suppl 3:S69-74.
- Lawrence J, Schapiro J, Winters M, Montoya J, Zolopa A, Pesano R, Efron B, Winslow D, Merigan TC. Clinical resistance patterns and responses to two sequential protease inhibitor regimens in saquinavir and reverse transcriptase inhibitor-experienced persons. *J Infect Dis* 1999; 179:1356-64.
- Learn GH, Jr., Korber BT, Foley B, Hahn BH, Wolinsky SM, Mullins JI. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. *J Virol* 1996; 70:5720-30.
- Learn GH, Mullins JI (2003). The microbial forensic use of HIV sequences. *In* "HIV Sequence Compendium 2003" (T. Leitner, B. Foley, B. H. Hahn, P. Marx, F. McCutchan, J. W. Mellors, S. M. Wolinsky, and B. T. Korber, Eds.). Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos.
- Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Uhlen M, Albert J. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:10864-9.
- Leitner T, Foley B, Hahn BH, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, Korber BT, eds. (2005). "HIV Sequence Compendium 2005." Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 06-0680 ed.
- Lemey P, Derdelinckx I, Rambaut A, Van Laethem K, Dumont S, Vermeulen S, Van Wijngaerden E, Vandamme AM. Molecular footprint of drug-selective pressure in a human immunodeficiency virus transmission chain. *J Virol* 2005a; 79:11981-9.
- Lemey P, Van Dooren S, Van Laethem K, Schrooten Y, Derdelinckx I, Goubau P, Brun-Vezinet F, Vaira D, Vandamme AM. Molecular testing of multiple HIV-1 transmissions in a criminal case. *AIDS* 2005b; 19:1649-58.
- Levi GC, Vitoria MA. Fighting against AIDS: the Brazilian experience. *AIDS* 2002; 16:2373-83.

- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984; 225:840-2.
- Liitsola K, Tashkinova I, Laukkanen T, Korovina G, Smolskaja T, Momot O, Mashkilleysen N, Chaplinskias S, Brummer-Korvenkontio H, Vanhatalo J, Leinikki P, Salminen MO. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS* 1998; 12:1907-19.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellmann NS, Richman DD. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 2002; 347:385-94.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.
- Lorenzo E, Collins T, Fisher E, Herrera RJ. The use of tat and env sequences from human immunodeficiency virus 1 in phylogenetic epidemiological studies. *Electrophoresis* 2001; 22:438-44.
- Lorenzo E, Herrera RJ, Lai S, Fischl MA, Hill MD. The Tat and C2-V3 envelope genes in the molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1. *Virology* 1996; 221:310-7.
- Maia Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Guimaraes ML, Morgado MG. Trends in drug resistance mutations in antiretroviral-naive intravenous drug users of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 2006; 78:764-9.
- Maindonald J, Braun J (2003). "Data analysis and graphics using R - An example-based approach." Cambridge Series in Statistical and Probabilistic Mathematics Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, Chequer P, Teixeira PR, Hearst N. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003; 17:1675-82.



- Matapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. *Nature* 2005; 434:1093-7.
- McCutchan FE, Hegerich PA, Brennan TP, Phanuphak P, Singharaj P, Jugsudee A, Berman PW, Gray AM, Fowler AK, Burke DS. Genetic variants of HIV-1 in Thailand. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:1887-95.
- McCutchan FE, Salminen MO, Carr JK, Burke DS. HIV-1 genetic diversity. *AIDS* 1996; 10 Suppl 3:S13-20.
- Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AMS, Albuquerque MFPM. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101:845-9.
- Mehandru S, Poles MA, Tenner-Ractz K, Horowitz A, Hurley A, Hogan C, Boden D, Racz P, Markowitz M. *J Exp Med* 2004; 200:761-70.
- Metzker ML, Mindell DP, Liu XM, Ptak RG, Gibbs RA, Hillis DM. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:14292-7.
- Meyer PR, Matsuura SE, Schinazi RF, So AG, Scott WA. Differential removal of thymidine nucleotide analogues from blocked DNA chains by human immunodeficiency virus reverse transcriptase in the presence of physiological concentrations of 2'-deoxynucleoside triphosphates. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3465-72.
- Miller V, Ait-Khaled M, Stone C, Griffin P, Mesogiti D, Cutrell A, Harrigan R, Staszewski S, Katlama C, Pearce G, Tisdale M. HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *AIDS* 2000; 14:163-71.
- Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I, Jr., Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvao-Castro B, Bongertz V. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18:488-94.

- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MD, Castilho EA, Galvao-Castro B, Mullins JI, Hendry RM, et al. 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* 1994; 10:569-76.
- Nguyen L, Hu DJ, Choopanya K, Vanichseni S, Kitayaporn D, van Griensven F, Mock PA, Kittikraisak W, Young NL, Mastro TD, Subbarao S. Genetic analysis of incident HIV-1 strains among injection drug users in Bangkok: evidence for multiple transmission clusters during a period of high incidence. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 30:248-56.
- Oelrichs RB, Shrestha IL, Anderson DA, Deacon NJ. The explosive human immunodeficiency virus type 1 epidemic among injecting drug users of Kathmandu, Nepal, is caused by a subtype C virus of restricted genetic diversity. *J Virol* 2000; 74:1149-57.
- Oliveira T, Pybus OG, Rambaut A, Salemi M, Cassol S, Cicozzi M, Rezza G, Gattinara GC, D'Arrigo R, Amicosante M, Perrin L, Colizzi V, Perno CF, Benghazi Study Group. *Nature* 2006;444: 836-7.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). *AIDS Epidemic Update - Dezembro de 2006*.
- OMS (Organização Mundial da Saúde). *World Health Report 2004: changing history*.
- Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo CC, Korber BT, Mullins JI, Schochetman G, Berkelman RL, Economou AN, et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* 1992; 256:1165-71.
- Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, Luo CC, Kalish ML, Auwanit W, Yamazaki S, Gayle HD, Young NL, Schochetman G. Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet* 1993; 341:1171-4.
- Pádua, Santo Antonio de (2003). *Perfil sócio-econômico e sanitário*. Secretaria Municipal de Saúde.
- Page RD. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 1996; 12:357-8.

- Palmer S, Vuitton D, Gonzales MJ, Bassignot A, Shafer RW. Reverse transcriptase and protease sequence evolution in two HIV-1-infected couples. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31:285-90.
- Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, Nicolini G, Cerbaro I, Manfrin V, Dal Bello F, Franchin E, Franzetti M, Rossi MC, Cattelan AM, Romano L, Zazzi M, Andreoni M, Giorgio P. Both HIV Cellular DNA and Plasma RNA Sequencing are Useful for Detection of Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Naive Patients. *J Clin Microbiol* 2007;
- Parisi SG, Mazzi R, Zazzi M, Manfrin V, Nicolini G, Carolo G, Boldrin C, Franchin E, Dal Bello F, Gatti F, Palù G (2005). *3rd IAS International Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, Rio de Janeiro*.
- Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, Brites C. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 45:251-253.
- Perno CF, Cozzi-Lepri A, Balotta C, Forbici F, Violin M, Bertoli A, Facchi G, Pezzotti P, Cadeo G, Tositti G, Pasquinucci S, Pauluzzi S, Scalzini A, Salassa B, Vincenti A, Phillips AN, Dianzani F, Appice A, Angarano G, Monno L, Ippolito G, Moroni M, d' Arminio Monforte A. Secondary mutations in the protease region of human immunodeficiency virus and virologic failure in drug-naive patients treated with protease inhibitor-based therapy. *J Infect Dis* 2001; 184:983-91.
- Perno CF, Cozzi-Lepri A, Forbici F, Bertoli A, Violin M, Stella Mura M, Cadeo G, Orani A, Chirianni A, De Stefano C, Balotta C, d'Arminio Monforte A. Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients for whom their first protease-inhibitor antiretroviral regimens failed. *J Infect Dis* 2004; 189:1983-7.
- Pilcher CD, Perkins MD, Fiscus SA, Johnston DM, Dietze R, Duque UH, Zago AM, Assad-Antunes F, Eron JJ. Genotypic resistance and the treatment of HIV-1 infection in Espirito Santo, Brazil. *J Infect Dis* 1999; 179:1259-63.
- Pires IL, Soares MA, Speranza FA, Ishii SK, Vieira MC, Gouvea MI, Guimaraes MA, de Oliveira FE, Magnanini MM, Brindeiro RM, Tanuri A. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2004; 42:426-30.

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77:7415-9.
- Poignard P, Saphire EO, Parren PW, Burton DR. gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:253-74.
- Popp D, Fisher JD. First, do no harm: a call for emphasizing adherence and HIV prevention interventions in active antiretroviral therapy programs in the developing world. *AIDS* 2002; 16:676-8.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998; 14:817-8.
- Posada D, Crandall KA. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol* 2001; 18:897-906.
- Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 2004; 5:52-61.
- Rayfield MA, Downing RG, Baggs J, Hu DJ, Pieniazek D, Luo CC, Biryahwaho B, Otten RA, Sempala SD, Dondero TJ. A molecular epidemiologic survey of HIV in Uganda. HIV Variant Working Group. *AIDS* 1998; 12:521-7.
- Rhee SY, Fessel WJ, Zolopa AR, Hurley L, Liu T, Taylor J, Nguyen DP, Slome S, Klein D, Horberg M, Flamm J, Follansbee S, Schapiro JM, Shafer RW. HIV-1 Protease and reverse-transcriptase mutations: correlations with antiretroviral therapy in subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance. *J Infect Dis* 2005; 192:456-65.
- Rio de Janeiro. Secretaria estadual de saúde. Boletim Epidemiológico DST/Aids 2005. Rio de Janeiro, 2005.
- Robbins KE, Lemey P, Pybus OG, Jaffe HW, Youngpairoj AS, Brown TM, Salemi M, Vandamme AM, Kalish ML. U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol* 2003; 77:6359-66.

- Robbins KE, Weidle PJ, Brown TM, Saekhou AM, Coles B, Holmberg SD, Folks TM, Kalish ML. Molecular analysis in support of an investigation of a cluster of HIV-1-infected women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18:1157-61.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, Gao F, Hahn BH, Kuiken C, Learn GH, Leitner T, McCutchan F, Osmanov S, Peeters M, Pieniazek D, Kalish ML, Salminen M, Sharp PM, Wolinsky S, Korber B. HIV-1 Nomenclature Proposal. *HIV Sequence Compendium*, Los Alamos National Laboratory 1999; 492-505.
- Robertson DL, Sharp PM, McCutchan FE, Hahn BH. Recombination in HIV-1. *Nature* 1995; 374:124-6.
- Rodrigues R, Custodio RM, Bueno SM, Eira M, Ferreira JL, Jamal L, Duarte AJ, Brigido LF. Prevalence of ARV resistance mutations and impact of genotyping test in HIV patients with advance disease in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 2005a; 32:336-7.
- Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhacke RD, Ferreira JL, Castro SM, Stella IM, Brigido LF. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006; 116:201-7.
- Rodrigues R, Vazquez CM, Colares JK, Custodio RM, Bonasser Filho F, Souza Ldo R, Gianna MC, Marques CC, Brigido LF. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, Sao Paulo, Brazil: preliminary results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005b; 100:97-102.
- Rogers AS, Froggatt JW, 3rd, Townsend T, Gordon T, Brown AJ, Holmes EC, Zhang LQ, Moses H, 3rd. Investigation of potential HIV transmission to the patients of an HIV-infected surgeon. *Jama* 1993; 269:1795-801.
- Rose PP, Korber BT. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics* 2000; 16:400-1.
- Rous P. A transmissible avian neoplasm (a sarcoma of the common fowl). *Journal of Experimental Medicine* 1910; 12:696-705.

- Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *Journal of Experimental Medicine* 1911; 13:397-411.
- Sa Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, Janini LM. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21:145-51.
- Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, Cavalcante S, Galvao-Castro B, Mullins JI, Mayer A. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol* 1994; 68:6340-6.
- Sa-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naive Brazilian blood donors. *Transfusion* 2007; 47:97-102.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4:406-25.
- Salemi M, Lamers SL, Yu S, de Oliveira T, Fitch WM, McGrath MS. Phylodynamic analysis of human immunodeficiency virus type 1 in distinct brain compartments provides a model for the neuropathogenesis of AIDS. *J Virol* 2005; 79:11343-52.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:1423-5.
- Sanabani S, Kleine Neto W, Kalmar EM, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 2006a; 6:368-77.
- Sanabani S, Neto WK, de Sa Filho DJ, Diaz RS, Munerato P, Janini LM, Sabino EC. Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006b; 22:171-6.

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

Saquarema. Prefeitura Municipal (2003). Disponível em <http://www.saquarema.rj.gov.br/>. 2003.

Sarafianos SG, Das K, Clark AD, Jr., Ding J, Boyer PL, Hughes SH, Arnold E. Lamivudine (3TC) resistance in HIV-1 reverse transcriptase involves steric hindrance with beta-branched amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:10027-32.

Sarmati L, Nicastrì E, Uccella I, D'Ettorre G, Parisi SG, Palmisano L, Galluzzo C, Concia E, Vullo V, Vella S, Andreoni M. Drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected patients for whom highly active antiretroviral therapy is failing. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1760-2.

Shafer RW, Jung DR, Betts BJ, Xi Y, Gonzales MJ. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database. *Nucleic Acids Res* 2000; 28:346-8.

Shankarappa R, Chatterjee R, Learn GH, Neogi D, Ding M, Roy P, Ghosh A, Kingsley L, Harrison L, Mullins JI, Gupta P. Human immunodeficiency virus type 1 env sequences from Calcutta in eastern India: identification of features that distinguish subtype C sequences in India from other subtype C sequences. *J Virol* 2001; 75:10479-87.

Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73:10489-502.

Sigel DJ, Castellan NJ (1988). "Nonparametric statistics for the behavioral sciences." 2nd edition ed. McGraw-Hill, Inc., New York, NY.

Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19 Suppl 4:S81-6.

Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS* 2004; 18 Suppl 3:S9-13.

- Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, Pires IL, Morgado MG, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003; 17:11-21.
- Song JZ, Wang B, Ge YC, Dwyer DE, Cunningham AL, Saksena NK. Significance of plasma and peripheral blood mononuclear cell derived HIV-1 sequences in establishing epidemiologic linkage between two individuals multiply exposed to HIV-1. *Microb Pathog* 1999; 26:287-98.
- Speth C, Dierich MP, Sopper S. *Mol Immunol* 2005; 42:213-28.
- Strizki JM, Tremblay C, Xu S, Wojcik L, Wagner N, Gonsiorek W, Hipkin RW, Chou CC, Pugliese-Sivo C, Xiao Y, Tagat JR, Cox K, Priestley T, Sorota S, Huang W, Hirsch M, Reyes GR, Baroudy BM. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4911-9.
- Sturmer M, Preiser W, Gute P, Nisius G, Doerr HW. Phylogenetic analysis of HIV-1 transmission: pol gene sequences are insufficient to clarify true relationships between patient isolates. *AIDS* 2004; 18:2109-13.
- Su L, Graf M, Zhang Y, von Briesen H, Xing H, Kostler J, Melzl H, Wolf H, Shao Y, Wagner R. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol* 2000; 74:11367-76.
- Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC, Castelo A, Page-Shafer K, Diaz RS. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007; 21:116-28.
- PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0. Saunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc., 1999.
- Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saude Publica* 2000; 16:7-19.
- Szwarcwald CL, Junior PRBS. Estimativa da prevalência da infecção pelo HIV na população brasileira de 15 a 49 anos, 2004. *Boletim epidemiológico AIDS*, janeiro a junho de 2006 2006;



- Tanuri A, Caride E, Dantas MC, Morgado MG, Mello DL, Borges S, Tavares M, Ferreira SB, Santoro-Lopes G, Martins CR, Esteves AL, Diaz RS, Andreo SM, Ferreira LA, Rodrigues R, Reuter T, Cavalcanti AM, de Oliveira SM, de Barbosa HB, Teixeira PR, Chequer PN. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J Clin Virol* 2002; 25:39-46.
- Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20:60-6.
- Teixeira PR, Vitoria MA, Barcarolo J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS* 2004; 18 Suppl 3:S5-7.
- Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226:1211-3.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-82.
- Thomson MM, Delgado E, Herrero I, Villahermosa ML, Vazquez-de Parga E, Cuevas MT, Carmona R, Medrano L, Perez-Alvarez L, Cuevas L, Najera R. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2002a; 83:107-19.
- Thomson MM, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global AIDS pandemic: an update. *AIDS Rev* 2005; 7:210-24.
- Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002b; 2:461-71.
- Thomson MM, Sierra M, Tanuri A, May S, Casado G, Manjon N, Najera R. Analysis of near full-length genome sequences of HIV type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Brazil reveals their independent origins and their lack of relationship to CRF12\_BF. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004; 20:1126-33.

- Thomson MM, Villahermosa ML, Vazquez-de-Parga E, Cuevas MT, Delgado E, Manjon N, Medrano L, Perez-Alvarez L, Contreras G, Carrillo MG, Salomon H, Najera R. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS* 2000; 14:897-9.
- Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndoye I, Gaye-Diallo A, Delaporte E, Peeters M, Mboup S. Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16:603-9.
- Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U, Chen Y, Meleth S, Kasolo F, Musonda R, Hunter E, Gao F, Allen S, Hahn BH. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 transmission in a heterosexual cohort of discordant couples in Zambia. *J Virol* 2002; 76:397-405.
- Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, Peeters M. 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* 2000; 16:139-51.
- UFF - Universidade Federal Fluminense. Santo Antônio de Pádua (<http://www.coseac.uff.br/cidades/padua.htm>), 2003.
- Valente de Lemos KR, Valente JG. [Death certificates as a marker for under-recording of AIDS cases]. *Cad Saude Publica* 2001; 17:617-26.
- van Harmelen J, Wood R, Lambrick M, Rybicki EP, Williamson AL, Williamson C. An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS* 1997; 11:81-7.
- Venturi G, Romano L, Carli T, Corsi P, Pippi L, Valensin PE, Zazzi M. Divergent distribution of HIV-1 drug-resistant variants on and off antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2002; 7:245-50.
- Vercauteren J, Vandamme AM. Algorithms for the interpretation of HIV-1 genotypic drug resistance information. *Antiviral Res* 2006; 71:335-42.

- Vicenti I, Razzolini F, Saladini F, Romano L, Zazzi M. Use of peripheral blood DNA for genotype antiretroviral resistance testing in drug-naive HIV-infected subjects. *Clin Infect Dis* 2007; 44:1657-61.
- Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 2000; 74:10498-507.
- Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Vincenti A, D'Elia S, Chiodo F, Ghinelli F, Bertoli A, d'Arminio Monforte A, Perno CF, Moroni M, Balotta C. Risk of failure in patients with 215 HIV-1 revertants starting their first thymidine analog-containing highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18:227-35.
- Violin M, Forbici F, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Bertoli A, Riva C, Giannella S, Manconi PE, Lazzarin A, Pasquinucci S, Tacconi L, Carnevale G, Mazzotta F, Bonazzi L, Montroni M, Chirianni A, Capobianchi M, Ippolito G, Moroni M, Perno CF, D'Arminio-Monforte A. Primary HIV-1 resistance in recently and chronically infected individuals of the Italian Cohort Naive for Antiretrovirals. *J Biol Regul Homeost Agents* 2002; 16:37-43.
- Wainberg MA. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *AIDS* 2004; 18 Suppl 3:S63-8.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-22.
- Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, Asjo B, Balotta C, Boeri E, Camacho R, Chaix ML, Costagliola D, De Luca A, Derdelinckx I, Grossman Z, Hamouda O, Hatzakis A, Hemmer R, Hoepelman A, Horban A, Korn K, Kucherer C, Leitner T, Loveday C, MacRae E, Maljkovic I, de Mendoza C, Meyer L, Nielsen C, Op de Coul EL, Ormaasen V, Paraskevis D, Perrin L, Puchhammer-Stockl E, Ruiz L, Salminen M, Schmit JC, Schneider F, Schuurman R, Soriano V, Stanczak G, Stanojevic M, Vandamme AM, Van Laethem K, Violin M, Wilbe K, Yerly S, Zazzi M, Boucher CA. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis* 2005; 192:958-66.

- Winters MA, Merigan TC. Variants other than aspartic acid at codon 69 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene affect susceptibility to nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:2276-9.
- Wolfs TF, Zwart G, Bakker M, Goudsmit J. HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission. *Virology* 1992; 189:103-10.
- Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 2001; 92:371-3.
- Yirrell DL, Pickering H, Palmarini G, Hamilton L, Rutemberwa A, Biryahwaho B, Whitworth J, Brown AJ. Molecular epidemiological analysis of HIV in sexual networks in Uganda. *AIDS* 1998; 12:285-90.
- Yu XF, Liu W, Chen J, Kong W, Liu B, Yang J, Liang F, McCutchan F, Piyasirisilp S, Lai S. Rapid dissemination of a novel B/C recombinant HIV-1 among injection drug users in southern China. *AIDS* 2001; 15:523-5.
- Zhang L, Diaz RS, Ho DD, Mosley JW, Busch MP, Mayer A. Host-specific driving force in human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo. *J Virol* 1997; 71:2555-61.
- Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391:594-7.

# **ANEXOS**

**ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu, \_\_\_\_\_, nascido no dia \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_, autorizo que sejam colhidos dados clínicos e epidemiológicos, bem como uma amostra (10ml) de meu sangue para o estudo das características da infecção pelo HIV-1 na região onde moro. A minha participação neste estudo é voluntária, não remunerada, e em hipótese alguma está condicionada à continuidade do meu tratamento ou do fornecimento das medicações que necessito ou venha a necessitar. Minha participação também não envolve qualquer despesa para mim. Fui informado que existem vários subtipos de HIV e que o conhecimento do subtipo específico com o qual entrei em contato provavelmente não trará qualquer utilidade para o meu tratamento, mas poderá ajudar na compreensão de como o vírus está se disseminando pelo Brasil. Fui informado ainda que também será pesquisada a presença de mutações virais que o tornam mais resistente aos medicamentos que tomo ou poderei vir a tomar para combatê-lo. Estas informações, sim, poderão ter grande valia para o meu tratamento. Autorizo a testagem do meu sangue para os vírus da hepatite B e C, que podem causar doença hepática crônica, mas que muitas vezes podem ser tratados com sucesso. Autorizo a testagem do meu sangue para os vírus HTLV-I/II, que podem causar uma forma de leucemia e uma forma de doença neurológica que cursa com dificuldade para andar. Fui informado ainda que os riscos que corro pela participação neste estudo são mínimos, e se limitam a eventuais complicações no local da coleta de sangue e que há total garantia de confidencialidade e privacidade das informações a serem geradas. Autorizo que os resultados sejam divulgados em publicações biomédicas de qualidade indiscutível. Fui esclarecido que os dados a serem publicados não permitirão a identificação dos pacientes. Autorizo também que parte do meu sangue seja conservada pelo Laboratório de Aids & Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, para estudos futuros, desde que estes venham a ser autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, da Fundação Oswaldo Cruz.

Caso os resultados dos exames discriminados acima apontem a necessidade de investigações adicionais ou tratamento específico, estes serão conduzidos pelo meu médico assistente e responsável pelo estudo, o Dr. Walter de Araújo Eyer-Silva (0xx21 99537051), ou por um serviço de referência que ele se encarregará de contactar e de me encaminhar.

***Consentimento para pacientes com idade inferior a 18 anos:***

Eu, \_\_\_\_\_, nascido no dia \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_, autorizo que sejam colhidos dados clínicos e epidemiológicos do(a) menor \_\_\_\_\_, nascido no dia \_\_\_\_\_, em \_\_\_\_\_, bem como uma amostra (10ml) de seu sangue para o estudo das características da infecção pelo HIV-1 na região onde moro. A participação neste estudo é voluntária, não remunerada e em hipótese alguma está condicionada à continuidade do tratamento e do fornecimento das medicações que o(a) menor necessita ou venha a necessitar. A participação no estudo também não envolve qualquer despesa para mim.

***Consentimento para pacientes com distúrbio do nível de consciência:***

Eu, \_\_\_\_\_, nascido no dia \_\_\_\_\_ em \_\_\_\_\_, autorizo que sejam colhidos dados clínicos e epidemiológicos do(a) Sr. (Sra.) \_\_\_\_\_, nascido(a) no dia \_\_\_\_\_, em \_\_\_\_\_, para o estudo das características da infecção pelo HIV-1/Aids no nosso município. Fui informado de que o estudo não incluirá coleta de amostra de sangue de pacientes com distúrbio do nível de consciência.

Local e data: \_\_\_\_\_ .Assinatura: \_\_\_\_\_

**ANEXO 2: QUESTIONÁRIO DO ESTUDO CLÍNICO E EPIDEMIOLÓGICO DA INFECÇÃO PELO HIV-1**

paciente número: \_\_\_\_\_; data do preenchimento: \_\_/\_\_/\_\_; município de tratamento: Miracema ( ); Pádua ( ); Saquarema ( ).

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: F ( ) M ( ) Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_

1º atendimento: \_\_/\_\_/\_\_; Idade quando do 1º atendimento: \_\_/\_\_/\_\_; 1ª sorologia anti-HIV-1 reativa: \_\_/\_\_/\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Raça: negra ( ); branca ( ); parda ( ); amarela ( )

Residência: município \_\_\_\_\_; sede ( ); distrito de \_\_\_\_\_.

Antecedentes de residência em outro município: \_\_\_\_\_

Estado civil: solteiro ( ); casado ( ); viúvo ( ); separado ( ); ignorado ( ); não aplicável ( )

Escolaridade: \_\_\_\_\_ nenhuma ( ); ≤ 8 anos ( ); >8 anos ( ); superior ( ) graduado em \_\_\_\_\_; ignorado ( )

Categoria de exposição: heterossexual ( ); homossexual ( ); bissexual masculino ( ); parenteral ( ) especificar \_\_\_\_\_; vertical ( ); ignorado ( )

Ocupação: \_\_\_\_\_. CD4 inicial: \_\_\_\_\_; data \_\_\_\_\_; Carga viral inicial: \_\_\_\_\_; data \_\_\_\_\_

Estágio clínico do CDC: A ( ); B ( ); C ( ); 1 ( ); 2 ( ); 3 ( ); X ( )

Diagnóstico de Aids? sim ( ); não ( ); Data do diagnóstico de Aids: \_\_/\_\_/\_\_

Aderência (A) ao tratamento anti-retroviral nos últimos 30 dias: A=100% das doses ( ); 100<A≤80%; 80<A≤50% ( ); A<50% ( ); ã aplicável ( )

Esquema anti-retroviral atual: zidovudina ( ); didanosina ( ); lamivudina ( ); estavudina ( ); nevirapina ( ); efavirenz ( ); ritonavir ( );

indinavir ( ); nelfinavir ( ); saquinavir ( ); lopinavir/r ( )

Exames laboratoriais subseqüentes (resultado e data): CD4 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ ; Carga viral \_\_\_\_\_

Anti-HCV: +( ) ; -( ) HbsAg: +( ) ; -( ) Anti-HBs: +( ) ; -( ) Atividade sérica das enzimas hepáticas: normal ( ) elevada ( )

**Quadro clínico:** assintomático (  ); sintomático (  ) descrever: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Óbito?** não (  ); sim (  ) data \_\_/\_\_/\_\_ *causa mortis* \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Antecedentes de alcoolismo:** não (  ); sim (  ) **Antecedentes de uso de cocaína:** não (  ); sim, venosa (  ); sim, inalada (  )

**Ligação epidemiológica com outros pacientes da casuística:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Circuncisão masculina:** sim (  ); não (  ); não aplicável (  ); ignorado (  )

**Observações:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



LISTA DE ARTIGOS QUE COMPÕEM ESTA TESE – PUBLICADOS,  
APROVADOS OU SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

***Artigos publicados***

Eyer-Silva WA, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG. HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. ***Revista de Saúde Pública*** 2005;39(6):950-5.

Eyer-Silva WA, Morgado MG. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. ***Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*** 2005;100(8):869-73.

Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. ***AIDS Research and Human Retroviruses*** 2006;22(2):207-11.

Eyer-Silva WA, Morgado MG. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. ***Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*** 2006;15;41(5):664-70.

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection in Inner Rio de Janeiro State, Brazil. ***AIDS Research and Human Retroviruses*** 2007; 23:303-8.

## ***Artigos Aprovados Para Publicação***

Eyer-Silva WA, Bello G, Morgado MG. Molecular evidence that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) dissemination in a small Brazilian city was already taking place in the early 1990s. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, no prelo.

Eyer-Silva WA, Freire MAL, Gayão ML, Basílio-de-Oliveira CA, Morgado MG. Epidemiologic features of HIV infection in 3 small cities in inner Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, no prelo.

## ***Artigos Submetidos Para Publicação***

Eyer-Silva WA, Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by an HIV-1 diversity survey in a small city in inner Rio de Janeiro State, Southeast Brazil.

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Morgado MG. Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Resistance Mutations among Drug-Naïve and Experienced Patients in Two Small Brazilian Cities with Universal Access to Antiretroviral Therapy.

## **ANEXO 3A:**

Eyer-Silva WA, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG. HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2005;39(6):950-5.

# HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil

## Infecção pelo HIV e Aids em um pequeno município no Sudeste brasileiro

Walter A Eyer-Silva<sup>a</sup>, Carlos Alberto Basílio-de-Oliveira<sup>b</sup> and Mariza G Morgado<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Aids e Imunologia Molecular. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

<sup>b</sup>Hospital Universitário Gaffrée e Guinle. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil

---

### Keywords

Acquired immunodeficiency syndrome, epidemiology. HIV infection, epidemiology. Small counties/municipalities. Brazil.

### Abstract

#### Objective

Studies on the aspects of HIV infection in small Brazilian municipalities are invaluable to appropriately design control strategies, better allocate resources, and improve health care services. The objective of the study was to assess the clinical and epidemiological aspects of HIV infection in a small municipality.

#### Methods

A descriptive study was carried out in Miracema, a small municipality in the northwestern area of the state of Rio de Janeiro, Brazil, between July 1999 and December 2003. All HIV-infected adult patients followed up at the local HIV/AIDS Program were included. Clinical and epidemiologic characteristics were prospectively assessed through standardized questionnaires.

#### Results

A total of 65 adult patients who attended the local HIV/AIDS Program were analyzed. Most (34) were women (male to female ratio: 0.9). An absolute predominance of patients who were born in Miracema or neighboring municipalities (94%), lived in Miracema (90.7%), were single (70.8%), attributed the acquisition of HIV infection to unprotected heterosexual intercourse (72.3%) and had a past history of snorting cocaine (27.7) was found Central nervous system disorders (including five cases of cryptococcal meningitis) and acute pulmonary pneumocystosis-like respiratory failure were major causes of morbidity. Most patients (56.9%) were at presented in advanced stages of HIV infection.

#### Conclusions

The predominance of patients on advanced stages of HIV infection suggest the existence of a large pool of undiagnosed cases in the community. A major feature of the cohort was an inverted male to female ratio. Further investigations over a broader geographic area are urgently needed for better understanding the clinical and epidemiological characteristics of HIV infection in small Brazilian municipalities and rural areas.

### Resumo

#### Objetivo

Estudos sobre as características da infecção pelo HIV em pequenos municípios brasileiros são de grande importância para o desenho de estratégias de intervenção, para a alocação apropriada de recursos e melhoria da assistência. O objetivo foi

### Decritores

Síndrome de imunodeficiência adquirida, epidemiologia. Infecção por HIV, epidemiologia. Assentamentos rurais. Pequenos municípios. Brasil.

---

### Correspondence:

Walter A. Eyer-Silva  
Laboratório de Aids e Imunologia Molecular  
Fiocruz  
Av. Brasil, 4365 Pavilhão Leônidas Deane  
21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
E-mail: walter-eyer@unirio.br

Received on 30/8/2004. Reviewed on 30/5/2005. Approved on 28/7/2005.

*investigar as características clínicas e epidemiológicas da infecção pelo HIV em um pequeno município.*

#### **Métodos**

*Foi realizado estudo descritivo em Miracema, município do noroeste do Estado do Rio de Janeiro, entre julho de 1999 e dezembro de 2003. Foram analisados todos os pacientes adultos com diagnóstico de infecção pelo HIV atendidos no Programa Municipal de HIV/Aids. Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados prospectivamente por meio de questionário padronizado.*

#### **Resultados**

*Foram analisados no total 65 pacientes adultos que receberam atendimento no Programa Municipal de HIV/Aids. A maioria (34) eram mulheres (razão de sexos homem-mulher de 0,9). Encontrou-se preponderância absoluta de pacientes que nasceram em Miracema ou municípios vizinhos (94%), moravam em Miracema (90,7%), eram solteiros (70,8%), atribuíam a aquisição da infecção ao contato heterossexual desprotegido (72,3%) e tinham antecedentes de uso de cocaína inalada (27,7%). Desordens do sistema nervoso central (incluindo cinco casos de neurocriptococose) e insuficiência respiratória aguda semelhante à pneumocistose pulmonar foram as principais causas de morbidade. A maioria dos pacientes (56,9%) iniciou acompanhamento em estágios avançados de infecção pelo HIV.*

#### **Conclusões**

*A preponderância de pacientes em estágios avançados de infecção pelo HIV sugere a existência de um grande reservatório de casos não diagnosticados na comunidade. Uma característica marcante da casuística foi a inversão da razão de sexos homem-mulher. Investigações adicionais cobrindo áreas geográficas maiores são urgentemente necessárias para o melhor entendimento do espectro clínico e epidemiológico da infecção pelo HIV em pequenos municípios brasileiros e áreas rurais.*

## INTRODUCTION

The large urban centers in the Southeast macro-region of Brazil stand among the areas most heavily burdened by the HIV epidemic in the Americas. By June 2004 a total of 362,364 AIDS cases had been reported in Brazil<sup>7</sup> and it was estimated that 597,000 15 to 49 year-old adults were living with HIV infection in the year 2000.<sup>17</sup> Even though the Brazilian epidemic remains largely concentrated in major urban areas, enough evidence of rapidly changing epidemiological patterns is accumulating.

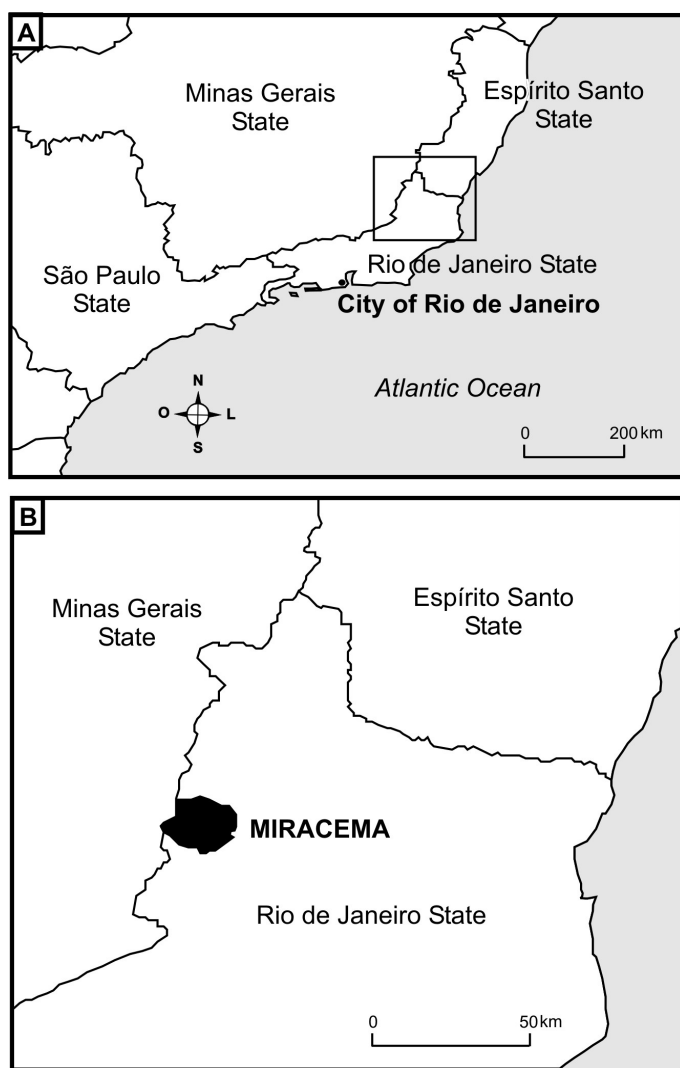
Current data on the Brazilian AIDS epidemic shows a trend towards an increasing number of cases in small municipalities.<sup>8,12,16</sup> One study found a 4.1% annual increase in the incidence rate of male cases in the large cities of the Southeast macro-region between the years of 1990 and 1996; the corresponding figure for small southeastern municipalities was 20.8%.<sup>16</sup> Consequently, to appropriately design and implement adequate control measures, a better understanding of the characteristics of HIV infection in relatively small Brazilian communities and rural areas is urgently needed. Thus, it was aimed at reporting the results of a clinical and epidemiological study performed in a small municipality.

## METHODS

The study was carried out in Miracema a poor municipality in the northwestern area of the state of Rio de Janeiro, Brazil, located 276 km far from the capital at the border of the state of Minas Gerais (Figure 1). It comprises an area of 301 km<sup>2</sup> and is located 138 m above sea level (21°24'50"S; 42°11'52"W). Besides an urban area, Miracema has two rural districts and there were 27,064 inhabitants in the year 2000.\*

From June 1999 HIV-infected patients have been followed up by a local physician. Since July 1999 monthly medical visits have been offered at a local outpatient clinic and patients have been assessed by a physician from the city of Rio de Janeiro. Patients are referred to the local AIDS Program by local providers whenever HIV infection is diagnosed or suspected. Antiretroviral agents as well as treatment and prophylaxis of opportunistic infections are freely provided to patients, as part of the National AIDS Program of the Brazilian Ministry of Health. Blood samples for lymphocyte subset counts and HIV plasma viral load testing are regularly collected and sent to laboratories either in the capital of Rio de Janeiro or Minas Gerais. Important laboratory and clinical resources frequently needed in the setting of HIV-in-

\*Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Censo Demográfico de 2000: características da população e dos domicílios: resultados do universo. Rio de Janeiro; 2001.



**Figure 1** - (A) The Brazilian Southeast macro-region with its four component states; (B) The county of Miracema, in Northwestern area of the state of Rio de Janeiro, at the border of the state of Minas Gerais.

fection, such as fungal cultures, endoscopic procedures and neuroimaging studies, are not available in Miracema, and thus performed elsewhere. Pregnant women are offered HIV testing and counseling. Those diagnosed with HIV infection are offered vertical transmission prophylaxis.

After obtaining signed informed consent clinical and epidemiological characteristics were prospectively recorded of all HIV-infected adult patients who, at least once, attended the local AIDS Program between July 1999 and December 2003. The diagnosis of HIV infection was made based on the algorithm\* proposed by the Brazilian Ministry of Health. Patients were staged according to the 1993 Revised Classification System for HIV Infection of the United States Centers for Disease Control and Prevention.<sup>9</sup>

Demographic data, the way of acquiring [HIV-infection, date of first reactive HIV testing, patterns of illicit drug use, educational level, clinical stage of HIV infection, date of AIDS diagnosis and HIV-related clinical conditions were recorded on standardized questionnaires. Demographic, social and behavioral data, as well as clinical stage, were recorded cross-sectionally as of first medical visit. The clinical stage was classified according to the Center for Disease Control (CDC) Classification. The study protocol was approved by the Ethics Review Board of the Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

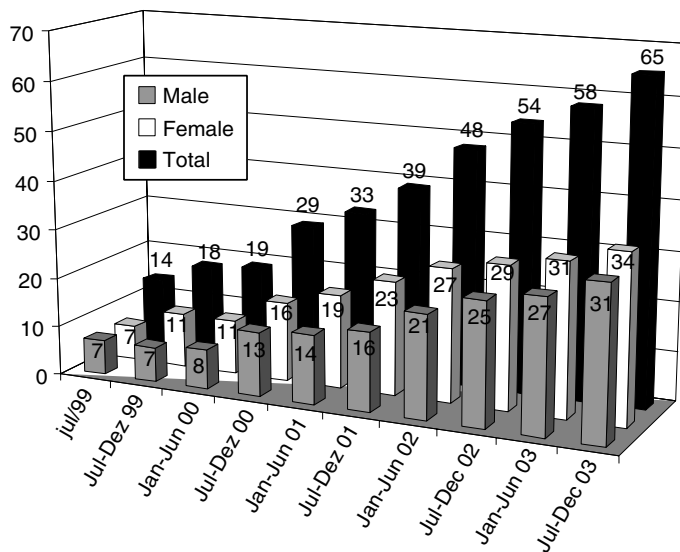
## RESULTS

Between July 1999 and December 2003 a total of 65 HIV-infected adult patients attended Miracema's AIDS Program (Figure 2). During the study period, two vertically HIV-infected children born elsewhere were also seen at the unit. The Table shows the demographic and epidemiological data according to gender. Most patients (34) were women and an overall 0.9 HIV-infected male to female ratio was recorded. For AIDS cases, a 1.1 male to female ratio was obtained. All but six patients lived in Miracema. Most (61) were born in Miracema or neighboring municipalities. A minority (23%) was married, divorced or reported living under consensual union. Most (69.2%) had none or less than eight years of education. Most patients (78.8% of whom information was available)

attributed the acquisition of HIV infection to unprotected heterosexual intercourse. One patient reported use of intravenous cocaine. In contrast, 16 out of 31 (51.6%) male patients referred past or current use of snorted cocaine. During the study period, seven HIV-infected pregnant women underwent vertical transmission prophylaxis successfully. At the moment, two other pregnant women, as well as two recently born children, are being followed up.

Most patients (56.9%) were diagnosed with AIDS (CDC stages C, A3 or B3) as of the first medical visit. HIV-related chronic wasting syndrome, anemia and oropharyngeal candidiasis were ubiquitous findings at presentation. Active tuberculosis (six cases), acute respiratory failure clinically and radiographically suggestive of pulmonary pneumocystosis (seven

\*Ministério da Saúde. Diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV. Comentários sobre a Portaria nº 488/98. Brasília (DF); 1998. Available from URL: [www.aids.gov.br/fluxog.htm](http://www.aids.gov.br/fluxog.htm) [25 out 2005]



**Figure 2** - Cumulative number of male and female HIV-infected patients. Miracema, Southeastern Brazil, July 1999 to December 2003.

cases) and focal central nervous system toxoplasmic encephalitis-like conditions (seven cases) were important AIDS-related infectious complications. A total of five cases (14.7% of the CDC stage C patients) had cryptococcal meningitis. Isolated cases of toxoplasmic retinitis (two cases) and cytomegalovirus colitis (one case) and retinitis (one case) were also diagnosed. No cases of acute or chronic hepatitis B virus infection were observed. The only patient who attributed HIV infection to intravenous drug use was diagnosed with chronic hepatitis C virus infection. No cases of Kaposi's sarcoma, AIDS-related lymphoma or other HIV-related neoplasms were recorded.

Nine patients died during the study period. Seven deaths were due to acute conditions at presentation. These patients did not have time to benefit from antiretroviral therapy. Focal neurological toxoplasmic encephalitis-like conditions (four cases) and acute pulmonary pneumocystosis-like respiratory failure (two cases) were the main causes of death.

## DISCUSSION

This study found an absolute predominance of heterosexual transmission and a slightly inverted male to female ratio of HIV infection in the municipality of Miracema. During the early years of the HIV epidemic in Brazil, AIDS was primarily a male disease and there was a 28:1 male to female ratio.<sup>6</sup> Since then, a progressive decline in the male to female ratio has been seen. An ecological study<sup>16</sup> found that among AIDS cases reported between 1993 and 1996 the male to female ratio was lower in small municipalities (2.8) than in large urban centers (3.4). Male partner death and migration before the study period may partly

explain the inverted male to female ratio in this study. Other studies will be important for understanding the current demographic profile of HIV infection in small Brazilian communities.

An important finding of the present study was that more than 90% of the patients were born and lived in Miracema or other neighboring municipalities (Table). A similar epidemiological pattern may currently exist in other neighboring municipalities of the region, even though most of them have no local AIDS program. A larger study covering a broader geographic area is urgently needed to appropriately estimate the magnitude of the problem. In fact, epidemiological data on HIV infection in small Brazilian municipalities may be largely conservative due to underreporting. A study<sup>18</sup> conducted in the state of Rio de Janeiro found that 51.9% of all AIDS-related deaths between 1991 and 1995 have not been reported to the Ministry of Health.

Most patients were single, young adults with low level of education. The spread of the HIV epidemic among lower education as well as low-income population is one of the most prominent characteristics of the current Brazilian AIDS epidemic.<sup>3,13</sup> In Western Uganda, a sentinel surveillance study among 15 to 24-year-old prenatal clinic attendees found that the declining HIV prevalence was stronger among those with a higher level of education.<sup>14</sup> According to a cross-sectional population survey in four cities of sub-Saharan Africa, educational level was found to be a key determinant of condom use within non-spousal partnership.<sup>15</sup> Whether a relatively lower level of education in small Brazilian municipalities and rural areas, when compared to better educational opportunities in large cities, is associated with a greater vulnerability to the acquisition of HIV infection is unknown and needs to be addressed in appropriately designed studies.

Past or current use of snorted cocaine, especially by male patients, was commonly reported. Only one patient in the study cohort reported previous use of injected cocaine. In fact, in the state of Rio de Janeiro, cocaine is more commonly used snorted than injected.<sup>2</sup> Previous history of alcohol abuse was also a common finding (data not shown). The role of alcohol and non-injected illicit drug use in unsafe sexual behavior is a matter that deserves due attention. Studies have shown the association of heterosexually acquired HIV infection with both alcohol<sup>1</sup> and non-injected forms of cocaine.<sup>11</sup> The role of local patterns of alcohol and illicit drug use in the spread of HIV infection in small Brazil-



**Table** - Demographic and epidemiological data of HIV-infected adult patients. Miracema municipality, Southeastern Brazil, July 1999 to December 2003.

Variables	Female (N=34)	Male (N=31)	Total (N=65)
Age (mean ± SD)	30.7±10.3	32.8±9.1	31.7±9.7
	N (%)	N (%)	N (%)
Age range (years)	16-60	19-63	16-63
≤20	2 (5.9%)	1 (3.2%)	3 (4.6%)
21-30	18 (53%)	12 (38.7%)	30 (46.2%)
31-40	9 (26.5%)	13 (41.9%)	22 (33.8%)
41-50	3 (8.7%)	3 (9.7%)	6 (9.2%)
>50	2 (5.9%)	2 (6.4%)	4 (6.2%)
Marital status*			
Single	24 (70.6%)	22 (71%)	46 (70.8%)
Married/divorced/consensual union	6 (17.6%)	9 (29%)	15 (23%)
Widower	4 (11.7%)	-	4 (6.2%)
Place of birth*			
Miracema	26 (76.5%)	28 (90.3%)	54 (83%)
Neighboring counties	5 (14.7%)	2 (6.4%)	7 (10.9%)
Other	3 (8.8%)	1 (3.2%)	4 (6.1%)
Place of residence*			
Miracema	32 (94.1%)	29 (93.5%)	61 (93.8%)
Neighboring counties	2 (5.9%)	2 (6.5%)	4 (6.2%)
Level of education*			
None	1 (2.9%)	5 (16.1%)	6 (9.2%)
≤8 year	23 (67.6%)	16 (51.6%)	39 (60%)
>8 year	9 (26.5%)	10 (32.3%)	19 (29.3%)
Not recorded	1 (2.9%)	-	1 (1.5%)
Exposure category*			
Heterosexual	33 (97%)	14 (45.2%)	47 (72.3%)
Homo/bisexual	-	12 (38.7%)	12 (18.4%)
Intravenous drug use	-	1 (3.2%)	1 (1.5%)
Not recorded	1 (3%)	4 (12.9%)	5 (7.7%)
CDC stage*			
A1	10 (29.4%)	6 (19.3%)	16 (24.6%)
A2, B1 or B2	7 (20.6%)	5 (16.1%)	12 (18.4%)
A3, B3 or C	17 (50%)	20 (64.5%)	37 (56.9%)
Inhaled cocaine use*			
Yes	2 (5.9%)	16 (51.6%)	18 (27.7%)
No	29 (85.3%)	11 (35.5%)	40 (61.5%)
Not recorded	3 (8.8%)	4 (12.9%)	7 (10.8%)

CDC: Center for Disease Control and Prevention

ian communities where these problems are common remains largely an unexplored issue.

More than half of the patients (36 out of 65) first presented in advanced stages of HIV-disease (CDC stages C, A3 or B3). These cases show the frequent occurrence of HIV infection in subjects who were not aware of their HIV status or not willing to get medical treatment. Seven of these patients died without having the opportunity to benefit from antiretroviral therapy, which is freely provided to patients in Brazil. In conjunction, these figures are suggestive of a large pool of undiagnosed HIV infection in the community and highlight the need for appropriate studies on the prevalence of HIV infection in small Brazilian municipalities and rural areas.

Cryptococcal meningitis seemed to be a relatively common cause of morbidity in Miracema. Even though this fungal disease is not an uncommon complication of AIDS in Brazil, it has been reported in 4.4% AIDS patients at the time of reporting<sup>5</sup> and in 6% of the cases studied in a large autopsy series.\* In the present study, five out of 33 (14.7%) patients on CDC stage C developed cryptococcal meningitis,

most of them (four cases) as its presenting manifestation. It is not known whether immunosuppressed patients living in rural areas of Brazil are more likely to develop cryptococcal meningitis due to greater chances of environmental exposure to this fungal agent. Sharp geographic differences in the occurrence of infectious complications, including cryptococcal meningitis, have been found elsewhere when neighboring countries<sup>4</sup> and neighboring regions within the same country<sup>10</sup> were compared.

Small Brazilian municipalities are experiencing a fast growing AIDS epidemic, yet little data on the characteristics of HIV infection in these settings is available. The epidemic spread towards the innermost parts of the country will likely pose a variety of medical, social and logistic challenges. These settings generally have a much less comprehensive health infrastructure and lack physicians with expertise in the management of HIV infection and AIDS. Risk-reduction messages and campaigns may need to be redesigned to meet local epidemiological and social characteristics.

The spectrum and frequency of HIV-related clinical conditions may differ when compared to large

\*Basílio-de-Oliveira CA. Infecções oportunistas pulmonares em necropsias na síndrome de imunodeficiência adquirida. Rio de Janeiro: Academia Nacional de Medicina; 1997.



urban settings. Confidentiality issues in small communities may pose barriers to HIV testing and treatment. The misleading opinion that HIV infection is a problem only in large urban centers may further increase local vulnerability. In a country where rural or predominantly rural municipalities are frequently misclassified as urban areas,<sup>19,20</sup> patients from rural communities may be underrepresented in national reporting databases and, consequently, little atten-

tion may be directed to these areas. Patients from these areas are also less likely to benefit from the support of non-governmental organizations.

Investigations on the clinical and epidemiological characteristics of HIV infection in small Brazilian municipalities are thus urgently needed in order to design control strategies to halt epidemic spread, better allocate resources, and improve medical care.

## REFERENCES

1. Auvert B, Ballard R, Campbell C, Carael M, Carton M, Fehler G, et al. HIV infection among youth in a South African mining town is associated with herpes simplex virus-2 seropositivity and sexual behaviour. *AIDS* 2001;15(7):885-98.
2. Bastos FI, Strathdee AS, Derrico M, Pina MF. Drug use and the spread of HIV/AIDS in South America and the Caribbean. *Drugs Educ Prev Policy* 1999;6(1):29-49.
3. Bastos FI, Szwarcwald CL. AIDS e pauperização: principais conceitos e evidências empíricas. *Cad Saúde Pública* 2000;16 Supl 1:65-76.
4. Blaxhult A, Kirk O, Pedersen C, Dietrich M, Barton SE, Gatell JM, et al. Regional differences in presentation of AIDS in Europe. *Epidemiol Infect* 2000;125(1):143-51.
5. Bol Epidemiol AIDS. Ministério da Saúde. Brasília (DF) 2000;13(1).
6. Bol Epidemiol AIDS. Ministério da Saúde. Brasília (DF) 2000;13(3).
7. Bol Epidemiol AIDS. Ministério da Saúde. Brasília (DF) 2005;18(1).
8. Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil: uma epidemia multifacetada. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001;34(2):207-17.
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992;41:1-19.
10. Chariyalertsak S, Sirisanthana T, Saengwonloey O, Nelson KE. Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994-1998: regional variation and temporal trends. *Clin Infect Dis* 2001;32(6):955-62.
11. Chiasson MA, Stoneburner RL, Hildebrandt DS, Ewing WE, Telzak EE, Jaffe HW. Heterosexual transmission of HIV-1 associated with the use of smokable freebase cocaine (crack). *AIDS* 1991;5(9):1121-6.
12. Dhália C, Barreira D, Castilho EA. A Aids no Brasil: situação atual e tendências. *Bol Epidemiol AIDS* 2000;13(1):25-33.
13. Fonseca MG, Bastos FI, Derrico M, Andrade CLT, Travassos C, Szwarcwald CL. AIDS e grau de escolaridade no Brasil: evolução temporal de 1986 a 1996. *Cad Saúde Pública* 2000;16 Supl 1:77-87.
14. Kilian AH, Gregson S, Ndyabangi B, Walusaga K, Kipp W, Sahlmuller G, et al. Reductions in risk behaviour provide the most consistent explanation for declining HIV-1 prevalence in Uganda. *AIDS* 1999;13(3):391-8.
15. Lagarde E, Carael M, Glynn JR, Kanhonou L, Abega SC, Kahindo M, et al. Educational level is associated with condom use within non-spousal partnerships in four cities of sub-Saharan Africa. *AIDS* 2001;15(11):1399-408.
16. Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL. A disseminação da epidemia da AIDS no Brasil, no período de 1987-1996: uma análise espacial. *Cad Saúde Pública* 2000;16 Supl 1:7-19.
17. Szwarcwald CL, Carvalho MF. Estimativa do número de indivíduos de 15 a 49 anos infectados pelo HIV, Brasil, 2000. *Bol Epidemiol AIDS* 2001;14(1):35-40.
18. Valente de Lemos KR, Valente JG. A declaração de óbito como indicador de sub-registro de casos de AIDS. *Cad Saúde Pública* 2001;17(3):617-26.
19. Veiga JE. O Brasil rural ainda não encontrou seu eixo de desenvolvimento. *Estud Av* 2001;43:101-19.
20. Veiga JE. Nem tudo é urbano. *Ciênc Cult* (São Paulo) 2004;56:26-9.

## **ANEXO 3B:**

Eyer-Silva WA, Morgado MG. A genotyping study of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(8):869-73.

# A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality

Walter A Eyer-Silva/\*/\*\*/+ , Mariza G Morgado

Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil \*Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

\*\*Programa Municipal de HIV/Aids de Miracema, Miracema, RJ, Brasil

*In Brazil, surveillance studies on antiretroviral drug resistance among drug-naïve and treatment-experienced patients have focused primarily on patients living in large urban centers. As the epidemic spreads towards small municipalities and the innermost parts of the country, it will be essential to monitor the prevalence of antiretroviral drug resistance in these areas. We report the first survey on the prevalence of antiretroviral drug resistance in a small Brazilian municipality. Between July 1999 and March 2005, 72 adult human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-infected patients received care at the Municipal HIV/AIDS Program of the small, southeastern municipality of Miracema, state of Rio de Janeiro. A genotyping study of antiretroviral drug resistance was performed in 54 patients. Among 27 samples from treatment-experienced patients, 9 (33.3%) harbored strains with reduced drug susceptibility. Among these, 6 had reduced susceptibility to reverse transcriptase (RT) inhibitors and 3 to both RT and protease inhibitors. No primary antiretroviral drug resistance was recorded among 27 drug-naïve subjects. The relatively low prevalence of resistance mutations in the Miracema cohort argues against the concern that resource-poor settings should not implement widespread accessibility to standard of care antiretroviral combinations due to the possibility of sub-optimal adherence leading to the emergence and spread of drug-resistant strains.*

Key words: antiretroviral resistance - genotyping - human immunodeficiency virus type-1 - small municipalities - subtypes - Brazil

Continued human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication in the presence of selective pressure of drugs targeting the reverse transcriptase (RT) and protease (PR) viral enzymes leads to the emergence of specific point mutations in the RT and PR genomic regions of the polymerase (*pol*) gene and poses one of the major obstacles to the long-term efficacy of antiretroviral therapy. Since strains harboring resistance-associated mutations to a single or to multiple antiretroviral agents can be transmitted both horizontally (Hecht et al. 1998) and vertically (Siegrist et al. 1994), it is essential to monitor the prevalence of resistant strains in the community.

In Brazil, surveillance studies on the prevalence of mutations conferring antiretroviral drug resistance are being reported both from national (Brindeiro et al. 1999, 2003, Tanuri et al. 2002) and regional (Dumans et al. 2002, Pires et al. 2004, Couto-Fernandez et al. 2005, Rodrigues et al. 2005) studies based on large urban centers. However, as the Brazilian epidemic spreads from the large urban centers towards small municipalities and the innermost parts of the country (Szwarcwald et al. 2000), appropriate studies on the features of HIV-1 infection in relatively small Brazilian communities are urgently needed. We report the results of the first survey on antiretroviral drug resistance in a small Brazilian municipality: the southeastern Miracema, in the state of Rio de Janeiro. Since Miracema is located in northwestern Rio de Janeiro, a re-

gion where municipalities are known to have low human development index values (IPEA 2003), the present study is an opportunity to analyze the prevalence of HIV-1 drug resistance in a resource-poor setting with widespread availability of standard of care highly active antiretroviral therapy (HAART) regimens.

## MATERIAL AND METHODS

*Patients and setting* - Miracema is a small municipality in northwestern state of Rio de Janeiro (21°24'50"S; 42°11'52"W), 280 km far from the city of Rio de Janeiro, at the border of the state of Minas Gerais. A detailed clinical and epidemiological characterization of the cohort is presented elsewhere (Eyer-Silva et al. 2005). Monthly medical appointments are offered at a local ambulatory facility with a physician based in the city of Rio de Janeiro. Antiretroviral agents are freely supplied to patients when clinically indicated, as part of the national AIDS Program of the Ministry of Health. Patients were staged according to the 1993 Revised Classification System of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC 1992). The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Review Board at Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

*Nucleotide sequencing* - After obtaining signed informed consent, blood samples were collected from adult patients between December 2001 and March 2005. Total genomic DNA was extracted from 200 µl of buffy coat using a QIAmp Blood Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA, US), according to manufacturer's instructions. DNA samples (± 1 µg) were PCR-amplified by a nested protocol in a Perkin Elmer 480 or 9600 Thermal Cycle. A fragment of the HIV-1 *pol* gene, spanning both PR and RT regions,

\*Corresponding author. E-mail: walter-eyer@unirio.br

Received 31 May 2005

Accepted 23 November 2005

was amplified in the following mixture: 5 µl of extracted DNA, 5 µl of 10× *Taq* buffer, 0.6 µl of 25mM (each) deoxynucleoside triphosphates, 5 µl of MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µl (25 pM) of each PCR-primer, 33 µl of H<sub>2</sub>O, and 0.5 µl of *Taq* DNA polymerase (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). An initial cycle was performed with a denaturation temperature set at 95°C (3 min), annealing set at 55°C (1 min) and extension set at 72°C (1 min), followed by 35 cycles with denaturation at 95°C (1 min), annealing at 55° (45 s) and extension at 72°C (1 min). A final extension of 10 min was set at 72°C. For second-round PCR, a 5 µl aliquot of the first-round PCR mixture was used. Oligonucleotides DP10 (5'-TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG-3') and RT12 (5'-ATCAGGATGGAGTTCATAACCCATCCA-3') were used as sense and antisense outer primers, respectively. Oligonucleotides DP16 (5'-CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC-3') and RT4 (5'-AGTTCATAACCCATCCAAAG-3') were used as sense and antisense nested primers, respectively. Amplification results were checked on agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The PCR products were then purified with the commercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, US) and sequenced in an automated ABI 310 or 3100 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, US) using primers DP16, RT4, LR49 (5'-CAATGGCCATTGACAGAAGA-3') and L51 (5'-TGTGGTAT CTAATTGAACTTCCC-3') for *pol* fragments. Sequencing reaction mixtures were assembled with BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Reaction Kits (Applied Biosystems). Chromatogram sequencing files were inspected with Chromas 1.45 (Technelysium Ltd., Queensland, Australia) and *contigs* were assembled by using SeqMan II, included in the DNASTAR software package (Promega) (Burland 2000). Sequences were deposited on the GenBank database under the accession numbers AY929012 to AY929061 and DQ058780 to DQ058783.

**Drug resistance genotyping** - Previously described drug-resistance associated mutations in the PR and RT genes were sought and genotyping results were interpreted by using the drug resistance interpretation beta test from the HIV RT and PR Sequence Database, Stanford University, version 4.1 (Kantor et al. 2001).

**Analysis of sequences and phylogenetic studies** - For subtyping analysis, sequences were aligned against a set of reference strains from all known HIV-1 group M subtypes (gathered from the Los Alamos HIV Database: <http://hiv-web.lanl.gov>) and trimmed to equivalent lengths by using CLUSTAL X (Thompson et al. 1997). A SIVcpz sequence was used as outgroup. An alignment of 845 bp (corresponding to positions 2364 to 3198 relative to HXB2 genome, GenBank accession no. K03455) was obtained. Phylogenetic inferences were performed by the neighbor-joining (NJ) algorithm (Saitou & Nei 1987) based on a DNA distance matrix and using the F84 model of nucleotide substitution (Felsenstein 1984) implemented in PAUP\* version 4.0b10 (Swofford 2002). The robustness of the trees was evaluated by bootstrap analysis (Felsenstein 1985) with 100 rounds of replication. The bootscanning method was used to detect and study re-

combination, as implemented in the SIMPLOT software, version 2.5 (Salminen et al. 1995). The analysis was performed on a sliding window of 400 nucleotides of the query sequences moving by increments of 20 nucleotides along an alignment of the reference sequences.

## RESULTS

Between July 1999 and January 2005 a total of 72 HIV-1 infected adult patients (37 female) received care at the Municipal HIV-1/AIDS Program. Out of the 58 patients from whom a blood sample was available, *pol* sequences were obtained from 54 (we failed to obtain *pol* sequences from 4 samples, even after analysis of a second blood sample). Fifty samples were assigned subtype B, whereas strains M02, M08, M31, and M36 were BF1 mosaic forms (the first 3 sharing common intersubtype breakpoints). These BF1 recombinants will be further described elsewhere. No other subtypes were found.

The Table presents the demographic, epidemiological, clinical and virological data of 54 studied patients. As of sample collection, 27 patients were treatment-naïve, 23 had already been exposed to HAART and 4 were not on therapy but had been previously offered vertical transmission prophylaxis (VTP) with a combination of zidovudine, lamivudine and nevirapine. Among treatment-experienced patients, 10 were on a combination of 2 nucleoside RT inhibitors (NRTI) plus 1 non-nucleoside RT inhibitor (NNRTI), 9 were on a regimen of 2 NRTI plus 1 PR inhibitor (PI), and 4 were on a 2 NRTI plus 1 PI plus 1 NNRTI combination. A total of 29 patients were on an AIDS-defining CDC stage category (27 on stage C and 2 on stage A3).

Among the 27 treatment-exposed patients, 9 (33.3%) harbored strains with reduced susceptibility to anti-retroviral drugs. Among these, 3 had resistance mutations against NRTI and PI agents (patients M05, M11 and M12, all of whom had been exposed to PI-based regimens), 4 had mutations associated with NRTI resistance (patients M07, M14, M20, and M31), and 2 had NNRTI-associated mutations (patients M08 and M25). The most common mutations associated with NRTI were M184V (4 strains), and the thymidine-associated mutations D67N (2 cases), K70R (2 cases) and K219/E/Q (2 cases). Isolated cases of mutations T69S, M41L and L210W were also recorded. Resistance mutations to NNRTI were found in samples M08 (Y181C and G190A) and M25 (K103N). Mutations conferring reduced susceptibility to PI were found in samples M05, M11 and M12. Patients M05 and M12 had long treatment histories that included sequential use of 4 and 3 consecutive PI agents, respectively. Recorded resistance mutations in the PR gene were A71T and N88S/D (in all 3 cases). Among the 4 female patients who had previously received antiretroviral therapy for vertical transmission prophylaxis, none had reduced drug susceptibility, although sample M33 harbored the polymorphism V106I and the atypical mutation P225L, none of which are currently associated with resistance. Overall, the common polymorphisms M36I, L63P, and V77I were observed in 9 (16.6%), 34 (70%) and 13 (24%) samples, respectively. All strains recovered from the 27 treatment-naïve patients were considered susceptible to NRTI, NNRTI, and PI.

TABLE  
Demographic, epidemiological, clinical and virological data from 54 adult human immunodeficiency virus type-1-infected patients followed at the Municipal HIV-1/AIDS Program of Miracema

Patient	Sex	Age	CDC stage	Year of sample	Time on therapy	Drugs used on treatment <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup>	TR mutations	RT <sup>b</sup>	PR mutations	Subtype
M02	F	21	A3	2001	3.5 yr	DDI, AZT, 3TC, NFV, NVP	S	None	S	K63P, V77I	BF1
M03	F	20	A1	2005	VTP <sup>c</sup>	AZT, 3TC, NVP	S	None	S	L63P, V77I	B
M05	F	47	C3	2001	4.5 yr	AZT, DDI, SAQ, IND, RIT, 3TC, D4T, NFV	R	D67N, K70R, K219E	R	M36I, L63P, A71T, N88D	B
M06	F	26	C2	2001	3 mo	AZT, 3TC, NFV	S	None	S	M36I, L63P	B
M07	F	28	A2	2004	7 yr	DDI, AZT, 3TC, LOP	R	D67N, K219Q	R	L63P	B
M08	M	24	C3	2001	4.5 yr	AZT, IND, 3TC, D4T, NFV, NVP	R	Y181C, G190A	S	L10I, V77I	BF1
M11	M	27	C3	2001	2 yr	AZT, 3TC, NFV	R	M184V	R	K20I, M36I, L63P, A71T, N88S	B
M12	M	53	A2	2002	5 yr	AZT, SAQ, NFV, 3TC, D4T, LOP	R	T69S, K70R, M184V	R	M36I, L63T, A71T, N88D	B
M14	M	34	C3	2001	3 yr	AZT, DDI, D4T, 3TC, EFV	R	M41L, L210W	S	L63T, V77I	B
M16	F	35	A1	2001	VTP	AZT, 3TC, NVP	S	None	S	L63P	B
M17	M	31	C3	2001	5 yr	AZT, DDI, 3TC, D4T, EFV	R	None	S	L63P	B
M20	F	27	C3	2001	18 mo	AZT, 3TC, EFV	R	M184V	S	K20T	B
M21	F	26	A2	2001	naïve	—	S	None	S	L63P	B
M22	F	35	C3	2001	2.5 yr	DDI, AZT, 3TC, NFV	S	None	S	L63P	B
M23	F	42	A2	2001	naïve	—	S	None	S	L63T	B
M24	F	22	A1	2002	naïve	—	S	None	S	None	B
M25	F	24	A2	2003	6 yr	DDI, AZT, 3TC, D4T, NVP	R	K103N	S	L63P	B
M28	M	33	C3	2001	4 yr	AZT, DDI, SAQ, NFV, 3TC, D4T, LOP, EFV	R	None	S	L63P	B
M31	F	60	B2	2003	5 yr	AZT, DDI, RIT, D4T, 3TC, NFV, EFV	S	M184V	R	L63P, V77I	BF1
M33	F	27	A1	2001	VTP	AZT, 3TC, NVP	S	V106I, P225L	S	M36I, L63P	B
M34	F	16	A1	2004	VTP	AZT, 3TC, NVP	S	None	S	L63P	B
M36	F	38	A3	2002	1 yr	AZT, 3TC, EFV	S	None	S	M36I, D60E, V77I	BF1
M37	M	30	A1	2002	naïve	—	S	None	S	L63P	B
M38	F	57	B2	2002	naïve	—	S	None	S	L63P	B
M39	F	30	C3	2001	naïve	—	S	None	S	None	B
M40	F	24	A2	2001	naïve	—	S	None	S	None	B
M41	F	26	C3	2001	naïve	—	S	None	S	None	B
M42	M	32	C3	2001	2 mo	AZT, 3TC, EFV	S	V118L	S	L63P, I93L	B
M43	M	24	A1	2002	naïve	—	S	None	S	M36I, L63P	B
M44	F	33	A1	2002	naïve	—	S	None	S	M36I, L63P	B
M45	F	22	A1	2002	naïve	—	S	None	S	M36I, L63P	B
M46	M	37	C3	2002	6 mo	AZT, 3TC, EFV	S	None	S	L63P, A71T	B
M47	M	29	C2	2002	naïve	—	S	None	S	L33F, L63T, V77I	B
M48	M	41	C3	2002	3 mo	AZT, D4T, 3TC, EFV	S	None	S	L63P, V77I, I93L	B
M49	M	30	C3	2002	3 mo	AZT, 3TC, EFV	S	None	S	L63P, A71T	B
M50	F	20	B2	2002	naïve	—	S	None	S	L63T, V77I	B
M51	M	23	A2	2002	naïve	—	S	None	S	None	B
M52	M	25	C3	2002	naïve	—	S	None	S	None	B
M53	M	31	C3	2002	naïve	—	S	None	S	L63P, I93L	B ↓



Patient	Sex	Age	CDC stage	Year of sample	Time on therapy	Drugs used on treatment <sup>a</sup>	RT <sup>b</sup>	TR mutations	RT <sup>b</sup>	PR mutations	Subtype
M54	F	28	C3	2002	naïve	—	S	None	S	D60E, L63P	B
M55	M	38	C2	2003	naïve	—	S	None	S	L63P	B
M56	F	32	C2	2003	naïve	—	S	None	S	L10I, L63P, I93L	B
M57	F	25	A2	2003	naïve	—	S	None	S	L10V, D60E, L63P	B
M58	M	48	A1	2003	naïve	—	S	None	S	D60E, L63P	B
M61	F	26	A2	2004	naïve	—	S	None	S	L63P, V77I	B
M62	M	63	C3	2004	18 mo	AZT, D4T, 3TC, LOP	S	T69S	S	L63P	B
M63	M	31	C3	2004	1 yr	AZT, 3TC, LOP	S	None	S	D60E, L63P	B
M64	F	26	C3	2004	5 mo	AZT, D4T, 3TC, EFV	S	None	S	None	B
M65	M	33	A2	2004	naïve	—	S	None	S	None	B
M66	F	46	C2	2004	2 mo	AZT, 3TC, LOP	S	None	S	L63A	B
M67	F	27	C3	2004	naïve	—	S	None	S	L53A, A71T	B
M68	M	27	C3	2005	naïve	—	S	None	S	L63P, V77I	B
M69	M	43	C3	2005	naïve	—	S	None	S	V77I	B
M70	M	22	A2	2005	naïve	—	S	None	S	L63P, V77I, I93L	B

<sup>a</sup>: drugs used as of sampling time are displayed in boldface, italic type; AZT (zidovudine); DDI (didanosine); 3TC (lamivudine); D4T (stavudine); NVP (nevirapine); EFV (efavirenz); SAQ (saquinavir); IND (indinavir); RT (ritonavir); NFV (nelfinavir); LOP (co-formulation of lopinavir and ritonavir); <sup>b</sup>: drug resistance beta test interpretation result for the RT and RT genes: S (susceptible); R (reduced susceptibility); <sup>c</sup>: patients who were not on antiretroviral therapy as of sampling but who had been submitted to vertical transmission prophylaxis (VTP) with AZT, 3TC, and NVP.

## DISCUSSION

Little is known about the features of HIV-1 infection in small Brazilian municipalities and rural areas. As the epidemic spreads from the large urban centers towards small municipalities and the innermost parts of the country (Szwarcwald et al. 2000, Brito et al. 2001), there is an urgent need to study the clinical, epidemiological and virological characteristics of HIV-1 infection in these settings. These studies will be of utmost importance to optimize the institution of adequate control measures, grasp the true magnitude of the problem, improve clinical recognition and management of HIV-1 infection and better allocate resources.

The present report is the first survey of antiretroviral drug resistance in a small Brazilian municipality. Like all similar studies in the field, it should be interpreted with the understanding that resistance testing is insensitive to minor drug-resistant variants and thus may fail to detect strains resistant to previously used drugs and to detect decayed resistant variants transmitted to untreated subjects.

Brazilian surveillance studies on the prevalence of resistance mutations in treatment-experienced patients have reported variable prevalence figures of reduced susceptibility to antiretroviral agents. Mutation M184V, for instance, associated with high-level resistance to the NRTI lamivudine, has been recently reported in 67.7, 64, and 18% of patients failing HAART in the states of Rio de Janeiro (Couto-Fernandez et al. 2005), São Paulo (Rodrigues et al. 2005), and the Federal District (Cerqueira et al. 2004), respectively. Prevalence figures of resistance mutations are to be interpreted taking into consideration current local prescribing patterns, as well as recommendations, eligibility and access to HIV resistance testing for patient management.

In the present Miracema cohort, we found an overall low prevalence of reduced susceptibility to antiretroviral agents among 27 treatment-exposed patients. We recorded 9 samples with reduced susceptibility against RT inhibitors and 3 against PI. The prevalence of thymidine-associated mutations (4 cases) and of the M184V mutation (4 cases) clearly reflects the frequency with which combinations that include thymidine analogues (zidovudine and stavudine) and lamivudine are prescribed. Both patients with NNRTI-associated mutations had been treated with the NNRTI nevirapine, not efavirenz. Rapid emergence of high-level resistance is known to be a potential drawback of nevirapine-including regimens due to the drug's low genetic barrier. No case of dual NRTI-NNRTI was recorded. Mutation T215Y/F, known to confer resistance to zidovudine and stavudine, was also not observed.

Among samples from 27 drug-naïve subjects, none had resistance mutations. These results corroborate findings from regional (Dumans et al. 2002) and national (Brindeiro et al. 1999, 2003) surveillance studies that reported a low prevalence of primary resistance in Brazil. Since antiretroviral drugs are readily available in Miracema since the early 1990s, our results seem to argue against the concern that resource-poor settings should not implement widespread accessibility to standard of care HAART

combinations due to the possibility of sub-optimal adherence leading to the emergence and spread of drug-resistant strains. Continued surveillance studies on the prevalence of drug resistant strains among treatment naïve and experienced patients will be necessary in large urban centers. However, as the Brazilian epidemic spreads towards the innermost parts of the country, additional investigations will also be needed in these settings.

#### REFERENCES

- Brindeiro R, Vanderborght B, Caride E, Correa L, Oravec RM, Berro O, Stuyver L, Tanuri A 1999. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 1674-1680.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-1069.
- Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2001. AIDS and HIV infection in Brazil: a multifaceted epidemic [in portuguese]. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 207-217.
- Burland TG 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol* 132: 71-91.
- CDC 1992. 1993 Revised Classification System for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 41: 961-962.
- Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR 2004. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 877-882.
- Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJ, Morgado MG 2005. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 73-78.
- Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, Kalish ML, De Vroey V, Hertogs K, Tanuri A 2002. Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3075-3079.
- Eyer-Silva WA, Basílio-de-Oliveira CA, Morgado MG 2005. HIV infection and AIDS in a small municipality in South-east Brazil. *Rev Saude Publica* 39: 950-955.
- Felsenstein J 1984. Distance methods for inferring phylogenies. *Evolution* 38: 16-24.
- Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, Hellmann NS, Bandrapalli NI, Digilio L, Branson B, Kahn JO 1998. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N Engl J Med* 339: 307-311.
- IPEA-Instituto de Pesquisas Econômicas e Aplicadas 2003. *Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil*, Rio de Janeiro.
- Kantor R, Machekano R, Gonzales MJ, Dupnik K, Schapiro JM, Shafer RW 2001. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database: an expanded data model integrating natural language text and sequence analysis programs. *Nucleic Acids Res* 29: 296-299.
- Pires IL, Soares MA, Speranza FA, Ishii SK, Vieira MC, Gouveia MI, Guimaraes MA, de Oliveira FE, Magnanini MM, Brindeiro RM, Tanuri A 2004. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naïve, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 42: 426-430.
- Rodrigues R, Vazquez CM, Colares JK, Custodio RM, Bonasser Filho F, Souza LR, Gianna MC, Marques CC, Brigido LF 2005. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, Sao Paulo, Brazil: preliminary results. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 97-102.
- Saitou N, Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1423-1425.
- Siegrist CA, Yerly S, Kaiser L, Wyler CA, Perrin L 1994. Mother to child transmission of zidovudine-resistant HIV-1. *Lancet* 344: 1771-1772.
- Swofford D 1998. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc., 1999.
- Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL 2000. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis [in portuguese]. *Cad Saude Pública* 16: 7-19.
- Tanuri A, Caride E, Dantas MC, Morgado MG, Mello DL, Borges S, Tavares M, Ferreira SB, Santoro-Lopes G, Martins CR, Esteves AL, Diaz RS, Andreo SM, Ferreira LA, Rodrigues R, Reuter T, Cavalcanti AM, de Oliveira SM, de Barbosa HB, Teixeira PR, Chequer PN 2002. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J Clin Virol* 25: 39-46.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.

## **ANEXO 3C:**

Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, Morgado MG. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(2):207-11.



## Sequence Note

# Phylogenetic Analysis of Brazilian HIV Type 1 Subtype D Strains: Tracing the Origin of This Subtype in Brazil

JOSÉ CARLOS COUTO-FERNANDEZ,<sup>1</sup> WALTER A. EYER-SILVA,<sup>1,2</sup> MONICK L. GUIMARÃES,<sup>1</sup>  
SAADA L. CHEQUER-FERNANDEZ,<sup>1</sup> BEATRIZ GRINSZTEJN,<sup>3</sup> ERIC DELAPORTE,<sup>4</sup>  
MARTINE PEETERS,<sup>4</sup> and MARIZA G. MORGADO<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**HIV-1 Subtype D occurs mainly in East and Central African countries, especially Uganda, where the prevalence of HIV-1 infection is among the highest in the world. We present the phylogenetic analysis of one nonautochthonous and four autochthonous (including a near full-length genome) Brazilian HIV-1 subtype D strains identified in Rio de Janeiro State, where subtypes B, F1, and BF1 recombinants predominate. Phylogenetic inferences using maximum likelihood were applied on a near-full length genome and on concatenated gag, protease, reverse transcriptase, integrase, C2V3/env, gp41, and nef segments. Sequences from an Angolan immigrant showed close genetic similarity with a strain described in Finland, from an HIV patient of African origin, whereas all four autochthonous Brazilian sequences clustered with South African strains, where subtype D occurs only in isolated cases. Our results suggest the successful introduction and circulation in Brazil of closely related HIV-1 subtype D strains, possibly of South African origin.**

**P**HYLOGENETIC ANALYSES OF GLOBALLY CIRCULATING HIV-1 STRAINS provide evidence of an extraordinary degree of genetic diversity leading to classification into distinct viral lineages, termed groups, subtypes, and subsubtypes.<sup>1</sup> Groups refer to the distinct HIV-1 lineages M (main), N (non-M/non-O), and O (outlier). Group M viruses have spread globally and are divided into nine subtypes (A–D, F–H, J, and K), and at least 16 intersubtype mosaic genomes, named circulating recombinant forms (CRFs), have been described.<sup>1</sup>

In Brazil, molecular epidemiology studies on HIV-1 diversity have shown an epidemic driven mainly by three group M subtypes: B, C, and subsubtype F1.<sup>2,3</sup> Subtypes B and, in a smaller proportion, F1 have been the prevalent lineages since the early years of the epidemic, whereas subtype C is emerging as a major variety in Brazil's southernmost states over the last years. Additionally, a B<sup>BR</sup> lineage of subtype B, harboring the GWGR crown motif in the V3 loop<sup>2,3</sup> and a complex of

BF1 intersubtype mosaic strains,<sup>4</sup> has prominent molecular features of the AIDS epidemic in Brazil. Isolated cases of other subtypes, such as subtype D,<sup>2,3</sup> subtype A1,<sup>5</sup> as well as BC<sup>3</sup> and CRF02\_AG<sup>6</sup> recombinant forms, have also been reported. Although the pattern of HIV-1 subtype distribution in Brazil is relatively well established, few Brazilian subtype B and non-subtype B HIV-1 full-length sequences are available as yet.

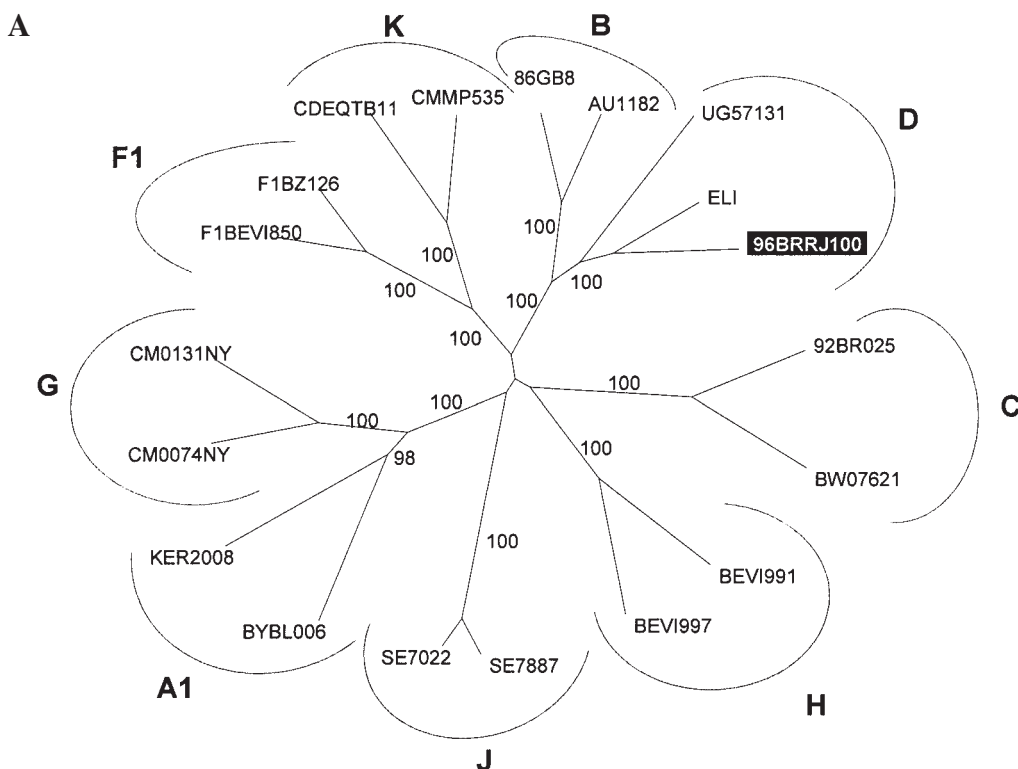
We report the results of a phylogenetic analysis of five Brazilian subtype D strains recovered in Rio de Janeiro State, in southeastern Brazil, between 1996 and 2005. In 1998, our group reported the identification of an HIV-1 subtype D strain (96BRRJ100) analyzing the envelope sequence<sup>2</sup> from a 36-year-old male infected patient on CDC stage C3. Subsequently, we expanded the genetic characterization of this sample to gag p17, gp41, and nef genomic regions.<sup>3</sup> Now we present the near full-length genome sequence of this previously reported strain, in addition to sequences of HIV-1 genomic regions of four additional

<sup>1</sup>Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas-IPEC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>4</sup>Laboratoire Retrovirus—IRD, Montpellier, France.



**FIG. 1.** Maximum likelihood phylogenetic analysis places the near-full length 96BRRJ100 genome within the subtype D branch. Alignments were prepared with reference group M sequences gathered from the Los Alamos HIV database. A tree was constructed by using the GTR+I+G model of nucleotide substitution. The robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. **(B)** Maximum likelihood phylogenetic analysis of the concatenated gag, protease, reverse transcriptase, integrase, C2V3/env, gp41, and nef segments of five Brazilian subtype D strains, aligned against a set of 43 subtype D sequences and using two subtype C sequences as outgroup. The tree was constructed by using the GTR+I+G model. The parameters of the model were as follows: equilibrium nucleotide frequencies,  $f_A = 0.3802$ ,  $f_C = 0.1731$ ,  $f_G = 0.2211$ ,  $f_T = 0.2256$  R matrix values,  $R_{A \leftrightarrow C} = 19169$ ,  $R_{A \leftrightarrow G} = 45312$ ,  $R_{A \leftrightarrow T} = 0.8117$ ,  $R_{C \leftrightarrow G} = 12073$ ,  $R_{C \leftrightarrow T} = 6.6478$ , and  $R_{G \leftrightarrow T} = 1$ . The proportion of invariable sites within the dataset was 31.75%. The shape parameter of the gamma distribution used for the reconstruction of the ML tree was 0.7122. The robustness of the trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. **(C)** Maximum likelihood analysis of a concatenated C2V3/env-gp41 dataset demonstrates a close phylogenetic relationship between Brazilian nonautochthonous subtype D strain 98BRRJ045 and FI93178 from Finland (underlined). The tree was constructed by using the transversion model with gamma-distributed rates across sites and a fraction of sites assumed to be invariable (TVM+I+G). Brazilian subtype D sequences are boxed. Numbers at the nodes indicate the percentage of bootstrap values with which the adjacent cluster is supported. Branch lengths are drawn to scale. The scale bar represents 0.10 nucleotide substitutions per site.

cases of subtype D. One nonautochthonous strain (98BRRJ045) was recovered from an Angolan immigrant, whose envelope and nef sequences were reported in 2002.<sup>3</sup> Two autochthonous cases were identified in the context of the Brazilian Network of HIV-1 Genotyping (Renageno) from patients failing antiretroviral therapy: patient 04BRRJ135, a 35-year-old male inhabitant of the city of Rio de Janeiro, whose sample was recovered in 2004, and patient 05BRRJ095, a 35-year-old man, whose sample was collected in 2005 in a northern municipal district of Rio de Janeiro state. Both individuals were on CDC stage A2. An additional autochthonous case (patient 04BRSAP19), a 39-year-old male inhabitant of the small county of Santo Antônio de Pádua who was in CDC stage A3, was identified in 2004 as part of an ongoing study on the features of HIV-1 infection in small counties of the Rio de Janeiro State. None of the autochthonous cases had a history of travel to Africa.

After signed informed consent, blood samples were collected, total genomic DNA was extracted, and DNA samples were polymerase chain reaction (PCR) amplified by nested protocols. The near full-length genome of sample 96BRRJ100 (7700 nucleotides, corresponding to HXB2 positions 900–2043, 2253–3548, and 4217–9487) was sequenced as previously described.<sup>7</sup> The four remaining Brazilian subtype D strains were sequenced in gag, protease, reverse transcriptase, integrase, C2V3/env, gp41, and nef genomic regions by using in-house protocols (cycling conditions and primers are available on request). Sequencing reactions were performed with the ABI BigDye Terminator v.3.0 Cycle Sequencing Reaction Kit and processed in an automated ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Chromatogram sequencing files were inspected with Chromas 1.45 (Technelysium Ltd., Queensland, Australia) and HIV-1 sequences assembled by using SeqMan

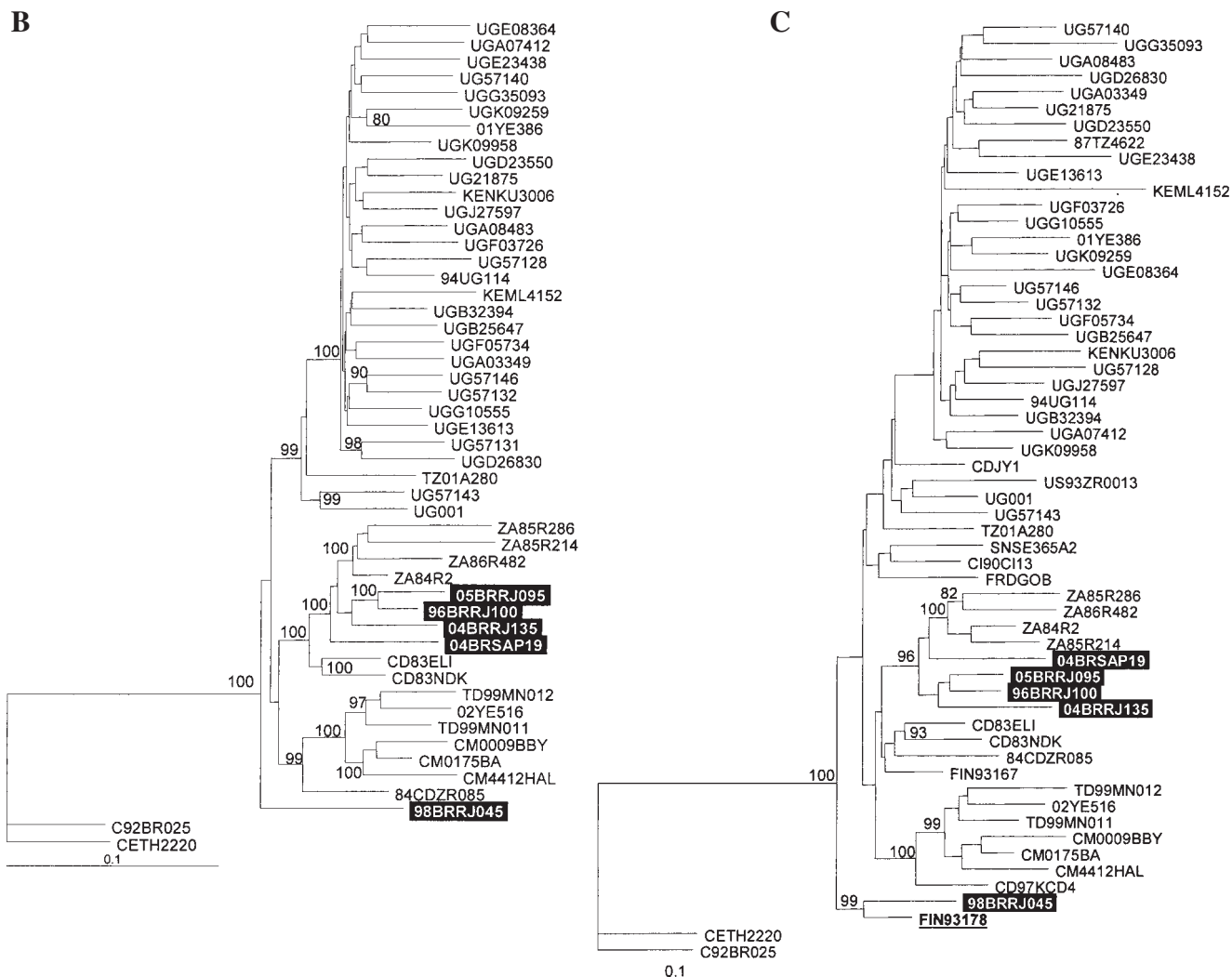


FIG. 1. (continued)

II, included in the DNASTAR software package (Madison, WI). Sequences were deposited in the GenBank database under accession numbers DQ141202–DQ141210 and DQ138968–DQ138984.

As a subtyping analysis, 96BRRJ100 near full-length genome (Fig. 1A) and partial genomic regions from the other four Brazilian subtype D strains (trees not shown) were aligned against a set of reference sequences from all known group M subtypes gathered from the Los Alamos HIV database (<http://hiv-web.lanl.gov/>). Alignments were trimmed to equivalent lengths by using CLUSTAL X. Gap-stripping and minor adjustments were performed using the Bioedit version 5.09. All phylogenetic inferences reported in this study were performed by applying the neighbor-joining (NJ) algorithm and the maximum likelihood (ML) optimality criterium implemented in PAUP\* version 4.0b10 (<http://paup.csit.fsu.edu/>). Robustness of the trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. The nucleotide substitution models best fitting each dataset were selected by applying the hierarchical likelihood ratio test strategy implemented in the MODELTEST

version 3.06 program (<http://darwin.uvigo.es/>). All Brazilian query sequences clearly fell within the subtype D branch.

To further analyze the phylogenetic relationships of the five Brazilian strains within a set of available subtype D reference sequences, partial genomic regions of gag, protease, reverse transcriptase, integrase, C2V3/env, gp41, and nef segments were concatenated and aligned against a set of 43 subtype D reference sequences (from nine countries) available in a full or near full-length genome in the Los Alamos HIV Database, using two subtype C sequences as outgroups (strains ETH2220 and 92BR025). The concatenated alignment had a total length of 3902 bp and included a 756-bp fragment of gag (corresponding to HXB2 positions 1259–2011), a 974-bp fragment of polymerase (HXB2 2268–3241 encompassing protease codons 6–99 and reverse transcriptase codons 1–230), a 691-bp fragment of integrase (HXB2 4230–4920), a 538-bp fragment of C2V3/env (HXB2 6826–7369), a 520-bp fragment of gp41 (HXB2 7715–8234), and a 423-bp fragment of nef (HXB2 8771–9190). By applying the hierarchical likelihood ratio test strategy implemented in the MODELTEST version 3.06 pro-

gram, we found the general time reversible model with gamma-distributed rates across sites and a fraction of sites assumed to be invariable (GTR+I+G) to be the best fitting nucleotide substitution model for the concatenated dataset. The parameters of the chosen model are indicated in the legend to Fig. 1. We found no evidence of hypermutation in the concatenated dataset when sequence CD83ELI (GenBank accession no. K02454) was used as the reference strain in the HYPERMUT program (available from the Los Alamos website). The presence of nucleotide substitution saturation at different codon positions was analyzed by plotting the transitions and transversions versus the F84 model of substitution by using the DAMBE software (<http://aix1.uottawa.ca/~xxia/software/software.htm>). No nucleotide substitution saturation could be observed on inspection of the plots. This indicates that the concatenated dataset was phylogenetically informative. MEGA version 2.1 (<http://www.megasoftware.net/>) was used to estimate pairwise distances using the Kimura two-parameter model.

Phylogenetic analysis of the concatenated dataset demonstrated that all four autochthonous Brazilian subtype D strains cluster with sequences recovered in South Africa (Fig. 1B), a country in which, interestingly, this lineage occurs only in isolated cases.<sup>9,10,11</sup> South African and autochthonous Brazilian sequences cluster with 100 bootstrap support and also seem to share a relatively recent common ancestor with strains from the Democratic Republic of Congo and, more distantly, Chad and Cameroon, countries in which the AIDS epidemic is characterized by a high degree of genetic diversity. In contrast, subtype D strains recovered in Eastern African countries (Uganda, Tanzania, and Kenya) seem to be relatively more diverse and cluster in a separate group with a bootstrap support of 99. We also performed extensive phylogenetic analyses including partial genomic subtype D sequences from a total of 30 countries (deposited in the Los Alamos HIV Database as of June 2005). None of them clustered with the Brazilian-South African group (trees not shown). In contrast, five additional South African envelope sequences (85ZA500, 85ZA501, 85ZA505, 85ZA506, and 85ZA507) also clustered with the Brazilian-South African group with significant bootstrap support (tree not shown). The phylogenetic relationship between Brazilian and South African strains was also demonstrated by using between-group (by country) nucleotide distance comparisons. The overall nucleotide distance for the concatenated subtype D dataset was 7.9%, whereas the nucleotide distances between the Brazilian autochthonous group and South African and Ugandan groups were found to be 7.3% and 8.9 %, respectively. The smallest pairwise nucleotide distance in the concatenated dataset was found between strains 96BRRJ100 and 05BRRJ095 (3.7%). In fact, these two strains cluster with 100 bootstrap support in the concatenated study (Fig. 1B).

The nonautochthonous strain 98BRRJ045 did not cluster with any sequence included in the concatenated dataset. However, analyses of partial genomic regions found an unexpected relationship with a strain FI93178 recovered in 1993 from a Finland patient infected in Africa.<sup>11</sup> Unfortunately, the specific country of infection was not recorded. In the phylogenetic analysis of a concatenated C2V3/env-gp41 dataset, strain FI93178 was found to cluster with the Brazilian nonautochthonous strain with a bootstrap support of 99 (Fig. 1C). This implies that the

Brazilian nonautochthonous strain and sequence FI93178 share a relatively recent common ancestor, which suggests that this patient might have been infected in Angola. Unfortunately, very few HIV-1 sequences from Angola are available.

HIV-1 subtype D occurs mainly in East and Central African countries, especially Uganda, where the prevalence of HIV-1 infection is among the highest in the world and where subtype A and AD recombinants are also prevalent.<sup>12,13</sup> Subtype D infections have also been reported as nonmajor lineages in southern and western Africa.<sup>14,15</sup> In South Africa the AIDS epidemic is driven mainly by subtype C among the heterosexual population, with a smaller proportion of subtype B infections among homosexual men.<sup>16,17</sup> It is interesting to note that the South African subtype D sequences used in the present analyses were recovered in the 1980s, in what seemed to be a restricted subtype D epidemic in that country.<sup>10</sup>

Phylogenetic analysis of HIV-1 sequences has proven to be invaluable in tracing global patterns of viral spread. However, these studies should be interpreted with the understanding that appropriate control sequences are needed both quantitatively and qualitatively. However, the present Brazilian subtype D dataset could be compared only with strains deposited on public databases. Bearing this in mind, the striking genetic similarity of South African and autochthonous Brazilian subtype D strains may indicate the introduction in Brazil of closely related strains, possibly of South African origin. The finding of this subtype in three different cities of Rio de Janeiro State and the close genetic resemblance between sequences 96BRRJ100 and 05BRRJ095, sampled in different cities, 9 years apart, reinforce the hypothesis that this variant has been successfully introduced and is circulating as a minor lineage, at least in southeastern Brazil. So far, there is no evidence of the spread of a subtype D epidemic in the country. However, continued monitoring is necessary since the introduction of additional non-B subtypes may provide a venue for rapid spread, allow the generation of novel recombinant forms, and may show the emergence of variants with altered biological, epidemiological, and immunological properties. A changing molecular epidemiology profile may have important consequences on diagnostic testing, therapeutic response to treatment, and vaccine design.

Sequences were deposited on the GenBank database under the accession numbers DQ141202–DQ141210 and DQ138968–DQ138984.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was partially supported by IOC-FIOCRUZ, National Program of STD and AIDS (PN-DST e AIDS) & Brazil-France Technical Cooperation, Brazilian Ministry of Health, and The Brazilian Research Council (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). The Brazilian Network for HIV-1 Genotyping (Renageno) provided invaluable technical support. We wish to thank our patients for agreeing to participate in the study. We also wish to thank Dr. Vera Bongertz, from Fundação Oswaldo Cruz, Brazil, for kindly reviewing the manuscript.

J.C. Couto-Fernandez and W.A. Eyer-Silva contributed equally to this study.

## REFERENCES

1. Leitner T, Foley B, Hahn BH, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, and Korber BT: *HIV Sequence Compendium 2003*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, 2000. LA-UR number 04-7420.
2. Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvao-Castro B, and Bongertz V: Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology* 1998;18:488–494.
3. Guimaraes ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, and Morgado MG: High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1261–1269.
4. Sá-Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, Munerato P, Brunstein A, Fusuma E, Sabino EC, and Janini LM: Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and F recombinants in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:145–151.
5. Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, de Sa CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, and Tanuri A: Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2000;275:107–115.
6. Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJ, and Morgado MG: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: Assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:73–78.
7. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Torimiro N, Saman E, Delaporte E, and Peeters M: 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* 2000;16:139–151.
8. Bredell H, Hunt G, Casteling A, Cilliers T, Rademeyer C, Coetzer M, Miller S, Johnson D, Tiemessen CT, Martin DJ, Williamson C, and Morris L: HIV-1 subtype A, D, G, AG and unclassified sequences identified in South Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:681–683.
9. Becker ML, De Jager G, and Becker WB: Analysis of partial gag and env gene sequences of HIV type 1 strains from southern Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:1265–1267.
10. Loxton AG, Treurnicht F, Laten A, Rensburg EJ, and Engelbrecht S: Sequence analysis of near full-length HIV type 1 subtype D primary strains isolated in Cape Town, South Africa, from 1984 to 1986. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:410–413.
11. Liitsola K, Holmstrom P, Laukkanen T, Brummer-Korvenkontio H, Leinikki P, and Salminen MO: Analysis of HIV-1 genetic subtypes in Finland reveals good correlation between molecular and epidemiological data. *Scand J Infect Dis* 2000;32:475–480.
12. Rayfield MA, Downing RG, Baggs J, Hu DJ, Pieniazek D, Luo CC, Biryahwaho B, Otten RA, Sempala SD, and Dondero TJ: A molecular epidemiologic survey of HIV in Uganda. *AIDS* 1998;12:521–527.
13. Harris ME, Serwadda D, Sewankambo N, Kim B, Kigozi G, Kiwanuka N, Phillips JB, Wabwire F, Meehen M, Lutalo T, Lane JR, Merling R, Gray R, Wawer M, Bix DL, Robb ML, and McCutchan FE: Among 46 near full length HIV type 1 genome sequences from Rakai District, Uganda, subtype D and AD recombinants predominate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1281–1290.
14. Toure-Kane C, Montavon C, Faye MA, Gueye PM, Sow PS, Ndoye I, Gaye-Diallo A, Delaporte E, Peeters M, and Mboup S: Identification of all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:603–609.
15. Bikandou B, Takehisa J, Mboudjeka I, Ido E, Kuwata T, Miyazaki Y, Moriyama H, Harada Y, Taniguchi Y, Ichimura H, Ikeda M, Ndolo PJ, Nzoukoudi MY, M'Vouenze R, M'Pandi M, Parra HJ, M'Pele P, and Hayami M: Genetic subtypes of HIV type 1 in Republic of Congo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:613–619.
16. van Harmelen J, Wood R, Lambrick M, Rybicki EP, Williamson AL, and Williamson C: An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS* 1997;11:81–87.
17. Bessong PO, Larry Obi C, Cilliers T, Choge I, Phoswa M, Pillay C, Papathanasopoulos M, and Morris L: Characterization of human immunodeficiency virus type 1 from a previously unexplored region of South Africa with a high HIV prevalence. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:103–109.

Address reprint requests to:

*José Carlos Couto-Fernandez*  
*Laboratório de Aids & Imunologia Molecular*  
*Departamento de Imunologia-IOC*  
*Fundação Oswaldo Cruz-Fiocruz*  
*Av. Brasil, 4365—Pavilhão Leônidas Deane, 413–415*  
*Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, 21.045-900, Brasil*

*E-mail: coutofer@ioc.fiocruz.br.*

## **ANEXO 3D:**

Eyer-Silva WA, Morgado MG. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 2006;15;41(5):664-70.



# Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection in a Small Brazilian County

## *Usefulness of Envelope and Polymerase Sequences to Epidemiologic Studies*

Walter A. Eyer-Silva, MD,\*†‡ and Mariza G. Morgado, PhD\*

**Objective:** The AIDS epidemic in Brazil is spreading from the large urban centers to small counties and the innermost parts of the country; however, data on the features of HIV-1 infection in these places are scarce. To study the routes of HIV-1 spread and assess the existence of transmission networks in such a setting, we performed a genetic analysis of viral sequences from the small county of Miracema, Rio de Janeiro State.

**Methods:** HIV-1 envelope and polymerase sequences recovered from 63 adult patients (from a cohort of 78 patients) were phylogenetically analyzed.

**Results:** A polyphyletic pattern ensued. Six clusters of sequences sharing close genetic relatedness were also recovered from 29 (46%) patients. Envelope and polymerase phylogenies yielded essentially the same results.

**Conclusions:** The polyphyletic pattern suggests multiple viral introductions in the region. Intracluster cases, including those with no known direct epidemiologic link, probably took part in the same chain of viral transmission. Such a pattern suggests the existence of sexual networks and the emergence of multiple new infections within a relatively short period, a potential molecular marker of high incidence.

**Key Words:** HIV-1, molecular epidemiology, Brazil, transmission networks, small counties, *pol* gene

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:664–670)

The AIDS epidemic in Brazil is spreading from the large urban centers to small counties and the innermost parts of the country<sup>1</sup>; however, data on the features of HIV-1 infection in these places are scarce. Such spread is expected to pose formidable medical, social, and logistic challenges. The future of the epidemic in Brazil is likely to be governed by our ability to halt HIV-1 spread toward these areas. Thus, there is an urgent need to delineate the clinical, epidemiologic, and

virologic features of HIV-1 infection in relatively small Brazilian communities.

Molecular analysis of nucleotide sequences has been successfully used to trace patterns of HIV-1 spread.<sup>2</sup> These studies, for example, established the epidemiologic linkage between a rape victim and the assailant,<sup>3</sup> documented iatrogenic transmission to a cluster of patients,<sup>4</sup> allowed the reconstruction of a long chain of transmission involving 9 individuals,<sup>5</sup> identified routes of viral spread within different regions of the same country,<sup>6</sup> and provided evidence that 2 independent epidemics were going on in the same country.<sup>7</sup> Additionally, analysis of HIV-1 sequences provided evidence of a high-incidence profile, as evidenced by molecular findings such as multiple transmission networks,<sup>7–9</sup> and of an old and mature epidemic pattern, given the high sequence diversity and absence of multiple transmission clusters.<sup>10,11</sup>

Therefore, to understand local epidemiologic patterns of HIV-1 spread in a small Brazilian county better, we sequenced viral sequences recovered from patients who were receiving care at the municipal HIV-1/AIDS Program of Miracema. Our aim was to clarify routes of HIV-1 spread in a setting that we already knew was primarily characterized by heterosexual transmission.<sup>12</sup>

## PATIENTS AND METHODS

### Patients and Setting

Miracema is a small county in Northwestern Rio de Janeiro State, with 27,042 inhabitants as of August 2000.<sup>13</sup> Monthly medical appointments are offered at a local ambulatory facility with a physician based in the city of Rio de Janeiro. Patients are referred by local health care professionals whenever HIV-1 infection is diagnosed or suspected. Antiretroviral agents, treatment, and prophylaxis of opportunistic disorders are freely supplied when clinically indicated. Patients were staged according to the 1993 revised Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification system.<sup>14</sup> Between July 1999 and July 2005, a total of 78 HIV-1–infected adult patients (41 female) visited the unit at least once. Most patients attributed the acquisition of HIV-1 infection to unprotected sexual intercourse, whereas 1 subject (patient M48) was an intravenous drug user (IVDU). A detailed clinical and epidemiologic characterization of the cohort is presented elsewhere.<sup>12</sup> The study protocol was approved by the Ethics Review Board at Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Received for publication March 12, 2005; accepted October 26, 2005.

From the \*Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; †Hospital Universitário Gaffrêe e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; and ‡Programa Municipal de HIV/Aids de Miracema, Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

Reprints: Walter A. Eyer-Silva, Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Pavilhão Leônidas Deane Av Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro/RJ, Brazil (e-mail: walter-eyer@unirio.br).

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

## Blood Samples, DNA Extraction, Amplification, and Nucleotide Sequencing

After obtaining signed informed consent, blood samples were collected from 63 adult patients. Total genomic DNA was extracted, and DNA samples were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using nested protocols. The C2V3/envelope (*env*) region and a fragment of the polymerase (*pol*) spanning protease (PR) and reverse transcriptase (RT) regions were amplified using outer and nested primer sets (available on request). Purified PCR products were sequenced in an ABI 3100 automated sequencer (Applied Biosystems) with BigDye Terminator (version 3.0) Cycle Sequencing Reaction Kits. *Contigs* were assembled using SeqMan II, which was included in the DNASTAR package.<sup>15</sup> Sequences were assigned GenBank accession numbers AY177893 through AY177913, AY928978 through AY929061, DQ058780 through DQ058783, and DQ224346 through DQ224357.

## Sequence Analysis and Phylogenetic Studies

As an initial subtyping analysis, sequences were aligned against a set of reference strains from all known HIV-1 group M subtypes (using SIVcpz sequence as the outgroup) and trimmed to equivalent lengths using CLUSTAL X.<sup>16</sup> Gap-stripping and minor adjustments were performed. An alignment of 328 base pairs (bp), corresponding to positions 6892 through 7225 relative to HXB2 genome, was obtained for *env*, and an alignment of 836 bp was obtained for *pol* (positions 2363–3198). Inferences were performed by the neighbor-joining (NJ) algorithm<sup>17</sup> based on a DNA distance matrix using the F84 model of nucleotide substitution implemented in phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) (PAUP\*) software, version 4.0b10.<sup>18</sup> The robustness of the trees was evaluated by bootstrap analysis<sup>19</sup> with 100 rounds of replication. The bootscanning method was used to detect and study recombination, as implemented in SIMPLOT software, version 2.5.<sup>20</sup>

To understand the phylogenetic relationships between clustered sequences further, we realigned those identified as subtype B in both genomic regions against a set of additional subtype B sequences using 2 subtype C sequences as outgroups (ETH2220 and 92BR025) and applying the NJ and maximum likelihood (ML)<sup>21</sup> methods. A total of 38 sequences were added to the *env* alignment, and 55 sequences were added to the *pol* alignment, including 21 controls collected in Rio de Janeiro.<sup>22</sup> The best-fitting nucleotide substitution models for each data set were selected using the Akaike criterion as implemented in MODELTEST, version 3.06.<sup>23</sup> We found the general time-reversible (GTR) model with  $\gamma$ -distributed rates across sites and a fraction of sites assumed to be invariable to be the best-fitting model for both data sets. ML trees were run with PAUP\* using heuristic searches based on a subtree pruning and regrafting (SPR) branch-swapping algorithm and 1000 rounds of bootstrap replication. The presence of saturation was analyzed by plotting the transitions and transversions versus the F84 genetic distance using DAMBE.<sup>24</sup> No evidence of saturation was observed, implying that the data sets were phylogenetically informative.

## Statistical Methods

Patients whose samples yielded sequences that fell within a cluster were compared with those whose samples yielded nonclustered sequences. Depending on the variables, the Wilcoxon rank-sum test and the  $\chi^2$  test were used for univariate analysis. Multivariate logistic regression was used to identify variables independently associated with being a patient whose sample yielded clustered sequences. Statistical analyses were performed using the software R.<sup>25</sup>

## RESULTS

### Assignment to Subtypes

Of the 63 patients from whom a blood sample was available, *env* sequences were obtained from all 63 and *pol* sequences were obtained from 58. We failed to obtain *pol* sequences from 5 samples: 4 were subtype B (M19, M32, M35, and M74) and 1 (M59) was sub-subtype F1 (henceforth designated subtype F1) in *env*. Fifty-four samples were subtype B in both regions, whereas 3 (from couple M02/M08 and patient M31) were F1 in *env* and B/F1 recombinants in *pol*. These recombinants shared the same intersubtype breakpoints and consistently clustered together with high bootstrap values in all analyses. One additional sample (M36) was subtype B in *env* with a different B/F1 mosaic pattern in *pol*. These recombinants are described further elsewhere. No other subtypes were found.

### Identification of Phylogenetically Related Clusters and Couples

Distance matrix-based phylogenetic analyses revealed potential clusters and couples of genetically related sequences in *env* and *pol* studies (not shown). To understand the genetic relatedness among subtype B strains further, ML analyses were performed using additional subtype B controls rooted with 2 subtype C strains (Fig. 1).

Five subtype B clusters ensued (see Fig. 1). Cluster A contains 10 sequences (M20, M33, M34, M35, M40, M50, M51, M52, M64, and M65) supported by significant bootstrap values in *env* (98) and *pol* (89), except M33, which branches with a bootstrap value of 83 in *pol* but only 60 in *env*. Cluster B contains 7 sequences (M11, M17, M21, M24, M25, M55, and M61) supported by a bootstrap value of 94 in *env* and 95 in *pol*. Cluster C contains 3 sequences (M57, M58, and M63) supported by a bootstrap value of 100 in *pol* and 86 in *env*. Cluster D contains 3 sequences (M47, M68, and M70) supported by a bootstrap value of 100 in *pol* and 93 in *env*. Cluster E contains 3 sequences (M67, M77, and M78) supported by a bootstrap value of 100 in both phylogenies.

### Known Epidemiologic Relationships in the Cohort

Epidemiologic linkage was known a priori for some patients. Nine heterosexual couples (M02/M08, M11/M21, M25/M55, M20/M52, M35/M50, M64/M65, M57/M58, M42/M44, and M14/M23), 1 homosexual couple (M68/M70), and 1 group of 1 man and 2 women (M45/M48/M54)





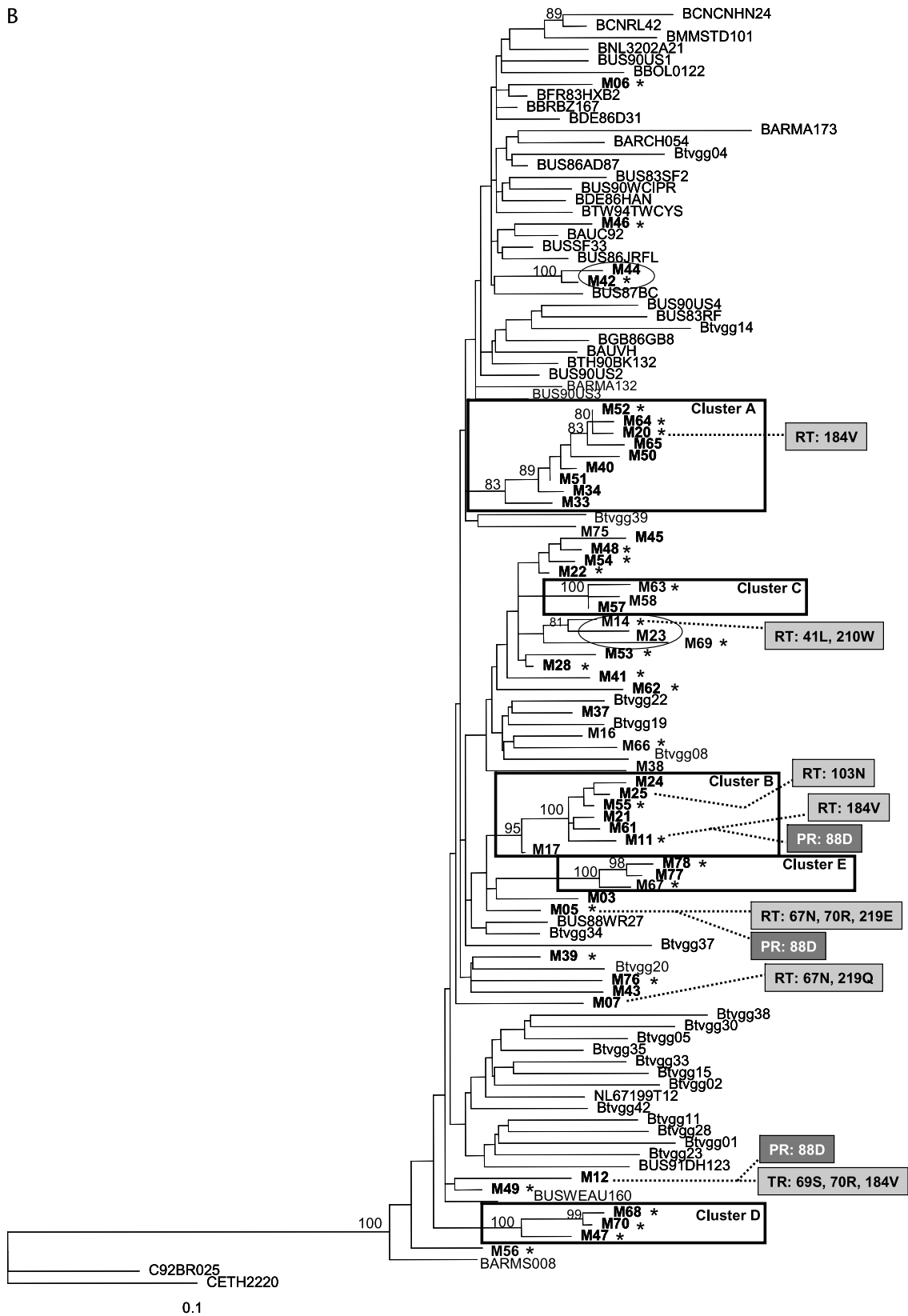


FIGURE 1. (Continued)

## Comparison of Envelope and Polymerase Phylogenies

*Env* and *pol* phylogenies yielded the same overall results, and relationships in one of the studies were reproduced in the other. The *env* tree, however, tended to present somewhat lower bootstrap values. Examples are the lower bootstrap figures for the common branch of clusters A (including sequence M33), C, D, and E as well as for couple M42/M44. In contrast, couple M14/M23 was strongly supported in *env*. Nonclustered sequences in *env* (eg, samples from patients M12, M39, M49, and M76, and from inhabitants of a neighboring county; see Fig. 1A) were invariably non-clustered in *pol*.

## Demographic, Social, Clinical, and Behavioral Associations Within Phylogenetic Clusters

Samples from 29 (46%) patients yielded clustered sequences (Table 1). On univariate analysis, these patients were found to be younger, more likely to have a known epidemiologic link within the cohort, and to always have lived in Miracema. Multivariate logistic regression analysis identified having a known direct epidemiologic relationship (odds ratio [OR] = 4.46, 95% confidence interval [CI]: 3.27 to 5.68;  $P = 0.014$ ) and having always lived in Miracema (OR = 5.48, 95% CI: 4.30 to 6.65;  $P = 0.0044$ ) as independent predictors of belonging to a cluster.

## Genotypic Resistance to Reverse Transcriptase and Protease Inhibitors

Two B/F1 recombinants and 7 subtype B sequences recovered from treatment-experienced patients harbored mutations known to confer reduced drug susceptibility (see Fig. 1B). No evidence of transmission of resistant variants was recorded. The presence of these mutations did not seem to obscure or artificially create phylogenetic relationships.

## DISCUSSION

Current epidemiologic data show the spread of the AIDS epidemic toward small counties and the innermost parts of Brazil.<sup>1</sup> Small Brazilian communities are likely to be challenged to provide care to an increasing number of patients, yet these places generally have a much less comprehensive health infrastructure and lack physicians familiar with the medical management of HIV-1 infection. Patients from these areas may face problems such as confidentiality issues (which can present barriers to counseling, testing, and treatment), long distances to medical facilities, and lack of nongovernmental organization support. The features of HIV-1 infection in these places need to be appropriately studied so as to optimize the institution of adequate control measures, grasp the true

**TABLE 1.** Comparison of Demographic, Social, Clinical, Laboratory and Behavioral Variables Between Patients Whose Samples Yielded Clustered and Non-clustered Sequences\*

	Patients Whose Samples Yielded Clustered Sequences (n = 29)†	Patients Whose Samples Yielded Non-Clustered Sequences (n = 34)	P Value
Female sex	15 (51.7%)	21 (61.7%)	0.58
Age (years): mean (range)	29.2 (16–60)	35.9 (17–63)	0.0015
CD4 count/mm <sup>3</sup> at baseline: mean (range)	327 (18–1326)	273 (8–901)	0.16
Diagnosis of AIDS at presentation	14 (48.3%)	22 (64.7%)	0.29
Place of birth: Miracema	24 (82.7%)	24 (70.6%)	0.4
Place of residence: Miracema	27 (93%)	30 (88.1%)	0.8
Having always lived in Miracema	22 (75.8%)	12 (35.3%)	0.003
Known epidemiologic link within the cohort	16 (55.1%)	7 (20.6%)	0.0099
Marital status: single	20 (68.9%)	20 (58.8%)	0.56
Years of education			
<8yr	21 (72.4%)	21 (61.7%)	
≥8yr	8 (27.6%)	13 (38.3%)	0.53
Previous use of snorted cocaine	5 (17.2%)	9 (26.4%)	0.56

\*Entries in table are n (%) unless otherwise specified. Significant bootstrap support value was arbitrarily defined as >80 in *pol*.

†Samples from the following patients were considered to yield clustered sequences: M02, M08, M11, M17, M20, M21, M24, M25, M31, M33, M34, M35, M40, M47, M50, M51, M52, M55, M57, M58, M61, M63, M64, M65, M67, M68, M70, M77, M78.

magnitude of the problem, improve clinical recognition and management, and better allocate resources.

The extreme nucleotide sequence variation of HIV-1 makes it possible to trace patterns of viral spread between populations, groups, and people.<sup>2</sup> There has been considerable discussion, however, on which genomic region is the most informative and on which phylogenetic methodology<sup>5,26</sup> is best suited for such investigations. In recent years, genotypic analysis of antiretroviral drug resistance has generated expanding local and public *pol* data sets. The suitability of this genomic region to epidemiologic investigations is being increasingly demonstrated,<sup>27–29</sup> although it remains a controversial issue.<sup>30–32</sup> The present Miracema cohort offers, in our opinion, a unique contribution to the subject. Previous investigations on the usefulness of *pol* involved the study of viral transmission between isolated cases<sup>27,28,30</sup> or the preselection of samples on the basis of closest pairwise distances.<sup>29</sup> Instead, we had the opportunity to study cross-sectional samples from 63 members of a 78-patient cohort. Our patients were placed at variable degrees of proximity in the transmission chains, and analyses of both regions yielded essentially the same overall results. Caution should be exercised when refined transmission chain analysis is needed, however, because a pattern of parallel evolution may emerge among sequences that harbor a similar set of resistance mutations.<sup>33</sup>

Caution should also be taken when studying patients who might have been multiply infected. In a C2V3 study, the establishment of epidemiologic linkage between 2 multiply infected IVDUs who had shared infected needles required the analysis of a series of proviral and plasma strains.<sup>34</sup> In the Miracema cohort, the only situation in which a phylogenetic relationship between *env* and *pol* sequences from linked patients could not be established involved an IVDU (patient M48) and his female sexual partners (M45/M54). Interestingly, studies that found *pol* suboptimal for phylogenetic analyses also involved IVDU-recovered sequences.<sup>3,30</sup>

We found a polyphyletic pattern suggesting multiple viral introductions in the region. Subtyping analysis was in accordance with studies that found the prevalent subtypes in southeast Brazil to be B, F1, and B/F1 recombinants.<sup>22,35</sup> We also found 29 samples (representing 46% of the cohort) forming 6 clearly defined clusters. Intracluster cases, including those with no known direct epidemiologic link, probably took part in the same chain of viral transmission, suggesting the existence of sexual networks and the emergence of multiple new infections within a relatively short period. Such potential molecular markers of high incidence highlight the urgent need to perform incidence studies in inner Brazil. In general, clusters were supported by a lower bootstrap value in *env*. This might reflect the continuously evolving nature of C2V3/*env* and may even indicate that the targeted fragment of *pol* is better suited for establishing relationships, especially after a given period has elapsed between transmission and sampling. The presence of mutations associated with drug resistance in the Miracema cohort did not seem to obscure or artificially create phylogenetic relationships.

In summary, this molecular epidemiology study of HIV-1 sequences from a small Brazilian county found evidence of multiple clusters of strains sharing close genetic relatedness, suggesting the existence of sexual networks and a high-incidence molecular profile. Our results highlight the need for further investigations to delineate the features of HIV-1 infection in small Brazilian counties better as well as appropriate control strategies to halt epidemic spread toward these areas.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to the patients for agreeing to participate in this study. They thank the many dedicated health care professionals in Miracema, without whom this study would not be possible. They also thank Laboratório Avançado de Saúde Pública in Salvador, Bahia State, Programa Nacional de DST/AIDS, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia for organizing invaluable international workshops on bioinformatics.

## REFERENCES

1. Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, et al. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saude Publica*. 2000;16:7–19.
2. Kuiken C, Thakallapalli R, Esklid A, et al. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol*. 2000;152:814–822.
3. Albert J, Wahlberg J, Leitner T, et al. Analysis of a rape case by direct sequencing of the human immunodeficiency virus type 1 *pol* and *gag* genes. *J Virol*. 1994;68:5918–5924.
4. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science*. 1992;256:1165–1171.
5. Leitner T, Escanilla D, Franzen C, et al. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:10864–10869.
6. Yu XF, Liu W, Chen J, et al. Rapid dissemination of a novel B/C recombinant HIV-1 among injection drug users in southern China. *AIDS*. 2001;15:523–525.
7. Ou CY, Takebe Y, Weniger BG, et al. Independent introduction of two major HIV-1 genotypes into distinct high-risk populations in Thailand. *Lancet*. 1993;341:1171–1174.
8. Oelrichs RB, Shrestha IL, Anderson DA, et al. The explosive human immunodeficiency virus type 1 epidemic among injecting drug users of Kathmandu, Nepal, is caused by a subtype C virus of restricted genetic diversity. *J Virol*. 2000;74:1149–1157.
9. Nguyen L, Hu DJ, Choopanya K, et al. Genetic analysis of incident HIV-1 strains among injection drug users in Bangkok: evidence for multiple transmission clusters during a period of high incidence. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;30:248–256.
10. Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, et al. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol*. 2000;74:10498–10507.
11. Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U, et al. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 transmission in a heterosexual cohort of discordant couples in Zambia. *J Virol*. 2002;76:397–405.
12. Eyer-Silva WA, Basílio-de-Oliveira CA, Morgado MG. HIV-1 infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. *Rev Saude Publica*. 2005;39:950–955.
13. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Censo Demográfico de 2000*. IBGE, 2001, Rio de Janeiro, Brazil.
14. Centers for Disease Control and Prevention. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep*. 1992;41:961–962.

15. Burland TG. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. *Methods Mol Biol.* 2000;132:71–91.
16. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:4876–4882.
17. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406–425.
18. PAUP\*: *Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)* [computer program]. Version 4.0b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 1999.
19. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39:783–791.
20. Salminen MO, Carr JK, Burke DS, et al. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995;11:1423–1425.
21. Felsenstein J. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Am J Hum Genet.* 1973;25:471–492.
22. Brindeiro PA, Brindeiro RM, Mortensen C, et al. Testing genotypic and phenotypic resistance in human immunodeficiency virus type 1 isolates of clade B and other clades from children failing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4512–4519.
23. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817–818.
24. Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered.* 2001;92:371–373.
25. Ihaka R, Gentleman RR. A language for data analysis and graphics. *J Comput Graph Stat.* 1996;5:299–314.
26. Posada D, Crandall KA. Selecting models of nucleotide substitution: an application to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Mol Biol Evol.* 2001;18:897–906.
27. Goujon CP, Schneider VM, Grofti J, et al. Phylogenetic analyses indicate an atypical nurse-to-patient transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2000;74:2525–2532.
28. Metzker ML, Mindell DP, Liu XM, et al. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:14292–14297.
29. Hue S, Clewley JP, Cane PA, et al. HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS.* 2004;18:719–728.
30. Palmer S, Vuitton D, Gonzales MJ, et al. Reverse transcriptase and protease sequence evolution in two HIV-1-infected couples. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002;31:285–290.
31. Sturmer M, Preiser W, Gute P, et al. Phylogenetic analysis of HIV-1 transmission: pol gene sequences are insufficient to clarify true relationships between patient isolates. *AIDS.* 2004;18:2109–2113.
32. Jenwitheesuk E, Liu T. Single phylogenetic reconstruction method is insufficient to clarify relationships between patient isolates in HIV-1 transmission case. *AIDS.* 2005;19:743–744.
33. Lemey P, Derdelinckx I, Rambaut A, et al. Molecular footprint of drug-selective pressure in a human immunodeficiency virus transmission chain. *J Virol.* 2005;79:11981–11989.
34. Song JZ, Wang B, Ge YC, et al. Significance of plasma and peripheral blood mononuclear cell derived HIV-1 sequences in establishing epidemiologic linkage between two individuals multiply exposed to HIV-1. *Microb Pathog.* 1999;26:287–298.
35. Guimaraes ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, et al. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002;18:1261–1269.

## **ANEXO 3E:**

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Molecular Epidemiology of HIV-1 Infection in Inner Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2007; 23:303-8.

## Sequence Note

# Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Inner Rio de Janeiro State, Brazil

WALTER A. EYER-SILVA,<sup>1,2,3</sup> JOSÉ CARLOS COUTO-FERNANDEZ,<sup>1</sup> and MARIZA G. MORGADO<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**In the State of Rio de Janeiro, Brazil, HIV-1 diversity surveys have been performed mainly in the capital, and little is known about HIV-1 molecular epidemiology in small, inner cities. We studied 87 polymerase sequences recovered from 2 different studies conducted in inner cities of Rio de Janeiro State: a cross-sectional survey of patients receiving care in the small city of Santo Antonio de Pádua, and a case series of patients who were failing HAART in 26 additional inner cities throughout the State. Subtypes B (83.9%), F1 (8%), D (2.3%), and unique BF1 recombinants (5.7%) were demonstrated. The cross-sectional study found that 41.6% of the patients harbored genetically related strains that fell within clusters and probably took part in the same chain of viral spread. These clusters were phylogenetically unrelated to previously reported clusters from a neighboring city, suggesting that each small city harbors its own set of microepidemic lineages.**

**H**UMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 (HIV-1) exhibits an extremely high degree of genetic diversity. Phylogenetic analysis allows classification of HIV-1 strains into three groups: M, N, and O. The M (main) group, the widest spread, has been further subdivided into at least 9 subtypes (A–D, F–H, J, and K) and 32 circulating recombinant forms (CRF), whereas a high diversity of unique intersubtype recombinant forms has also been demonstrated.<sup>1</sup> HIV-1 genetic diversity surveys conducted in the city of Rio de Janeiro, capital of Rio de Janeiro State, southeast Brazil, have found an epidemic driven mainly by subtype B and subs subtype F1 (heretofore designated subtype F1), as well as a myriad of unique BF1 intersubtype recombinants.<sup>2,3–5</sup> Isolated cases of other subtypes, such as subtypes D,<sup>2,6</sup> C,<sup>5</sup> A,<sup>7</sup> and CRF02\_AG,<sup>5,8</sup> have also been reported.

The State of Rio de Janeiro is the third most populous of the nation, harbors a huge seaport, is a national cultural reference, and is a preferred destination to thousands of domestic and foreign tourists every year. It is the second most heavily burdened by the AIDS epidemic in Brazil. A major feature of the current Brazilian AIDS epidemic is its spread from the large urban centers toward small cities and the innermost parts of the country.<sup>9</sup>

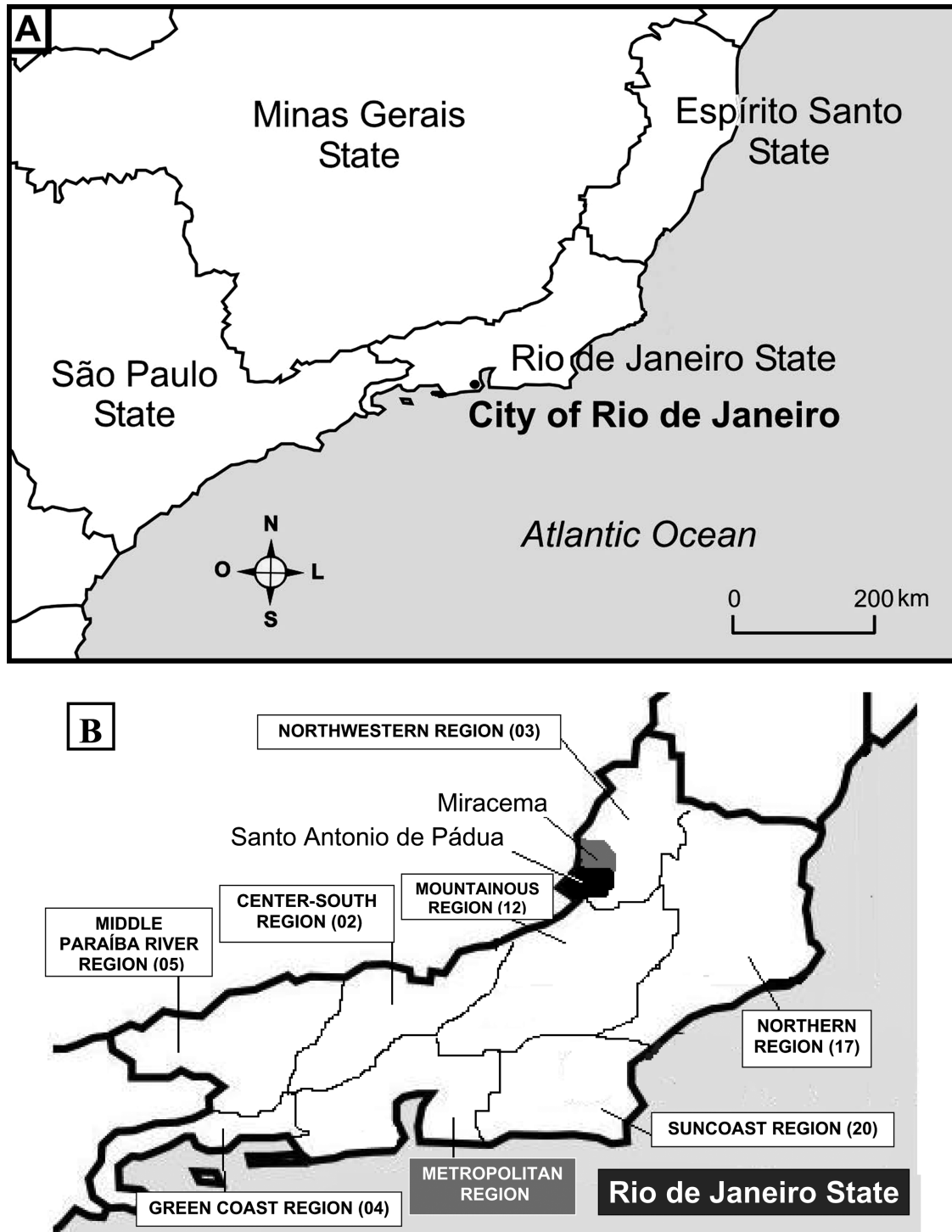
However, little is known about the molecular epidemiology of HIV-1 infection in inner Rio de Janeiro State, especially its small and medium-sized cities located relatively far from the capital. A recent study of the features of HIV-1 infection in the small, northwestern city of Miracema found a predominance of heterosexual transmission and a molecular epidemiology pattern of multiple clusters of viral sequences sharing close genetic relatedness, suggesting the existence of sexual networks and a high incidence molecular profile.<sup>10–12</sup>

The aim of the present study was to genetically characterize 87 HIV-1 variants recovered from patients receiving care in inner cities of Rio de Janeiro State. These patients were enrolled in two different studies. The first was a cross-sectional analysis of HIV-1 polymerase sequences recovered from 24 patients (including a pediatric case) receiving care in the small city of Santo Antonio de Pádua, in the Northwestern subregion of the State (Fig. 1), between the years of 2004 and 2006. As of July 2005, this city had an estimated 42,078 inhabitants distributed through 611 km<sup>2</sup>, including an urban center and eight rural districts ([www.ibge.gov.br/cidadesat](http://www.ibge.gov.br/cidadesat)). As of enrollment, 10 of these 24 patients were antiretroviral treatment experienced,

<sup>1</sup>Laboratório de Aids and Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>2</sup>Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

<sup>3</sup>Programa Municipal de HIV-1/Aids de Santo Antonio de Pádua, Rio de Janeiro State, Brazil.



**FIG. 1.** (A) The Brazilian Southeast macroregion with its four component States. (B) The State of Rio de Janeiro with its metropolitan and seven inner subregions. The number of patients from each subregion is shown in parenthesis. The small cities of Santo Antonio de Pádua and Miracema are shown in the Northwestern subregion.

whereas the others were naive to antiretroviral therapy. Since Santo Antonio de Pádua is a neighboring city of Miracema (Fig. 1), where the previously cited molecular epidemiology study was conducted,<sup>12</sup> the present cross-sectional analysis gave us an opportunity to phylogenetically compare sequences from two

small cities just 13 km apart and investigate the routes of viral spread in the region. The second study included 63 patients receiving care in 26 additional cities located in diverse regions of inner Rio de Janeiro State and who were experiencing virological failure to their respective highly active antiretroviral



therapy (HAART) regimens between the years 2003 and 2005. The number of patients from each subregion of the State is shown in Fig. 1. This case series would bring us a broader understanding of the genetic diversity of HIV-1 throughout inner Rio de Janeiro State. The study protocols were approved by the Ethics Review Board at Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

After obtaining signed informed consent, blood samples were collected from 87 patients between 2003 and 2006 and a fragment of HIV-1 polymerase gene encompassing both the protease and the reverse transcriptase regions was amplified. Polymerase strains from the Santo Antonio de Pádua study were generated using an in-house protocol,<sup>11</sup> whereas sequences from the other inner cities of the State were generated using the ViroSeq HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostics, Abbott Laboratories), as previously described.<sup>5</sup> Phylogenetic inferences were performed on the generated polymerase sequence dataset. In spite of being a relatively conserved region of the HIV-1 genome, the polymerase gene has been shown to contain enough phylogenetic signal to subtyping analysis<sup>13</sup> and to allow studies of epidemiologic relationships between populations, groups, and people.<sup>12</sup>

Sequences were aligned against a set of reference strains from HIV-1 group M subtypes and trimmed to equivalent lengths by using CLUSTAL X. Gap-stripping and minor adjustments were performed using BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). An alignment of 923 nucleotides, corresponding to positions 2308 through 3230 relative to the HXB2 genome, was obtained. Phylogenetic inferences were performed by applying the neighbor-joining (NJ) algorithm based on a DNA distance matrix and using the F84 model of nucleotide substitution implemented in PAUP\* version 4.0b10 (<http://paup.csit.fsu.edu/>). The robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis with 100 rounds of replication and the phylogenetic tree was schematically represented with the TreeView program (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). The bootscanning method was used to detect and study recombination, as implemented in the SIMPLOT software, version 3.5 (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/>). We found no evidence of hypermutation in the dataset when sequence CD83ELI (GenBank accession no. K02454) was used as the reference strain in the HYPERMUT program (available from the Los Alamos website).

Bootscanning and subtyping analyses (Fig. 2A) of the 87 HIV-1 polymerase strains revealed the presence of group M subtypes B (73 sequences; 83.9%), F1 (7 sequences; 8%), D (2 sequences; 2.3%), as well as BF1 mosaic forms (5 sequences; 5.7%). The 2 subtype D strains were further studied elsewhere, in conjunction with subtype D strains from the city of Rio de Janeiro.<sup>6</sup>

Three BF1 recombinant strains were recovered from epidemiologically linked patients (a married couple and their 6-year-old son) from the Santo Antonio de Pádua study (strains 04BRSAP09, 04BRSAP23, and 04BRSAP23\_PED). These three strains have a large F1 fragment (of approximately 400 nucleotides) intermixed with their 5' and 3' subtype B ends (Fig. 2A), share the same intersubtype breakpoints, and cluster together with a bootstrap of 100. The other two strains were recovered in the Middle Paraíba River (strain 03BRRJ237) and Mountainous (strain 05BRRJ164) subregions of the State.

Strain 03BRRJ237 has a subtype B fragment in the protease and an F1 fragment in the reverse transcriptase region whereas strain 05BRRJ164 has the opposite pattern (Fig. 2A). When compared with previously reported BF1 polymerase sequences reported throughout Brazil, the BF1 recombinants identified here were found to have distinct recombination patterns (data not shown). Therefore, they should be currently regarded as unique recombinant forms.

Among subtype F1 sequences, it was remarkable that most (six out of seven strains) were recovered from the Northern and Northwestern subregions of the State. Two strains were from the Santo Antonio de Pádua study (04BRSAP07 and 04BRSAP13) and four from the Northern subregion of the State (03BRRJ124, 03BRRJ178, 04BRRJ147, and 05BRRJ263). Two of these (03BRRJ124 and 05BRRJ263) clustered with a bootstrap support of 92. The remaining F1 strain (05BRRJ151) was from the Green Coast subregion. We further performed additional phylogenetic analyses to compare these seven F1 strains with F1 sequences previously reported in Rio de Janeiro and throughout Brazil. We found no evidence that these inner Rio de Janeiro State F1 strains formed any phylogenetically related cluster among them or with previously described Brazilian F1 variants (data not shown).

Among subtype B strains, the DNA distance matrix subtyping analysis suggested the existence of two potential clusters of strains recovered from 10 out of 24 (41.6%) patients from the cross-sectional survey of Santo Antonio de Pádua. To further investigate the genetic relationships between these subtype B sequences and confirm the existence of the clusters, we performed additional phylogenetic investigations (Fig. 2B) that included all Santo Antonio de Pádua subtype B strains aligned with a set of 54 local subtype B control sequences recovered from the neighbor city of Miracema,<sup>12</sup> rooted against two subtype C outgroup strains, and applying the NJ and maximum likelihood (ML) optimality criterion as implemented in PAUP\* version 4.0b10. We wished to investigate whether these Santo Antonio de Pádua subtype B clusters were phylogenetically related to the clusters previously uncovered in the Miracema cohort, thus representing broader chains of viral transmission involving the whole northwestern part of the State, or, instead, stood as independent clusters, suggesting that each small city harbors its own set of microepidemic lineages.

ML analysis was then run using heuristic searches based on a subtree pruning and regrafting (SPR) branch-swapping algorithm<sup>14</sup> and 1000 rounds of bootstrap replication. The nucleotide substitution model best fitting the dataset was selected by applying the Akaike information criterion as implemented in the MODELTEST version 3.06 program. We found the TVM +  $\Gamma$  + I model (which assumes unequal base frequencies, a transition–transversion bias, and four different rates for the four different transversions, with  $\Gamma$ -distributed relative nucleotide substitution rates across sites and a fraction of sites being invariable) to be the best fitting model. The parameters of the chosen model are given in the legend to Fig. 2. The presence of substitution saturation was analyzed by plotting the transitions and transversions versus the F84 genetic distance by using DAMBE (<http://dambe.bio.uottawa.ca/software.asp>). No evidence of saturation was observed, implying that the dataset was phylogenetically informative.



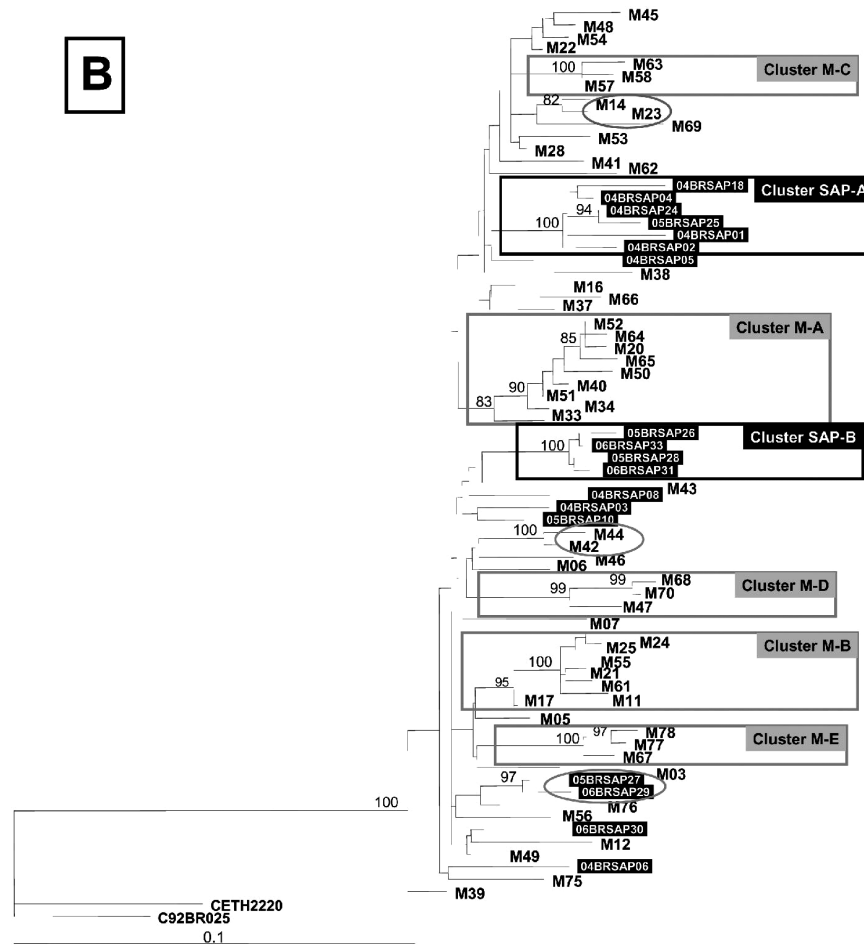


FIG. 2. (Continued).

The ML study thus generated with all subtype B sequences recovered from the two neighboring cities demonstrates that each city harbors its own set of clusters (Fig. 2B). Such a pattern suggests that in spite of being relatively close to each other, these two small cities experienced the independent introduction and subsequent dissemination of different subtype B lineages, in a pattern resembling multiple scattered microepidemics. The two Santo Antonio de Pádua clusters (clusters SAP-A and SAP-B) stand supported with bootstrap values of 100, without evidence of being intermixed with the five clusters previously found in the Miracema study (clusters M-A through M-E). Cluster SAP-A is composed of six strains recovered from three female (patients 04BRSAP01, 04BRSAP04, and 05BRSAP25) and three male (04BRSAP02, 04BRSAP18, and 04BRSAP24) subjects. Patients 04BRSAP24 and 05BRSAP25 were a married couple, whereas the other patients had no known direct epidemiologic link besides living in the same city. In the SAP-B cluster, strains 06BRSAP31 and 06BRSAP33 were recovered from a married couple who had no known epidemiologic relationship with the other subjects (female patients 05BRSAP26 and 05BRSAP28). The finding that 41.6% of the sequences from the Santo Antonio de Pádua cross-sectional survey fell within clusters of genetically related strains seems to confirm the results of the previous Miracema study,<sup>12</sup> suggests that small

cities in inner Rio de Janeiro State may be experiencing a growing HIV-1 epidemic, further highlights the need to perform incidence studies in inner Brazil, and indicates that strategies to control the epidemic spread in relatively small Brazilian cities should be urgently designed.

In summary, we demonstrate the cocirculation in inner cities of Rio de Janeiro State of three HIV-1 group M subtypes (B, F1, and D), as well as the occurrence of three unique BF1 intersubtype recombinants. Subtype C strains, a major lineage in Southern Brazil that has been described in isolated cases in the Metropolitan region of Rio de Janeiro State,<sup>5</sup> was not found. Most F1 strains were recovered in northern and northwestern cities, although no phylogenetic clusters could be demonstrated. The cross-sectional study of the small city of Santo Antonio de Pádua found evidence that 41.6% of the studied patients harbored sequences with a high degree of genetic relatedness and probably took part in the same chain of viral spread. Interestingly, Santo Antonio de Pádua clusters were phylogenetically unrelated to clusters previously demonstrated in a neighboring city, suggesting that each city harbors its own set of microepidemic variants. The results presented herein further highlight the complexity of the HIV-1 epidemic in Brazil. The continued study of the diversity and routes of HIV-1 spread in inner cities of Brazil will lead to a better understanding of the dynamics of

the Brazilian HIV-1 epidemic, will be invaluable in monitoring the prevalence and emergence of different viral lineages, and may eventually be important to geographically related vaccine development.

*GenBank accession numbers:* Sequences were deposited on the GenBank database under accession numbers DQ899643–DQ899727.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the patients and the many dedicated local health professionals in Santo Antonio de Pádua and the other cities that referred patients to this study. We need to thank Carlos Silva-de-Jesus for invaluable technical support. We also thank the National Program on STD and AIDS of the Brazilian Ministry of Health and IOC-Fiocruz for their continuous assistance.

## REFERENCES

- Leitner T, Foley B, Hahn BH, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, and Korber BT, eds.: *HIV Sequence Compendium 2005*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 06-0680, 2005.
- Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvao-Castro B, and Bongertz V: Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:488–494.
- Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, and Rayfield M: HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999;20:60–66.
- Guimaraes ML, Bastos FI, Telles PR, Galvao-Castro B, Diaz RS, Bongertz V, and Morgado MG: Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: Prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J Clin Virol* 2001;21:143–151.
- Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJ, and Morgado MG: Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: Assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:73–78.
- Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva WA, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Grinsztejn B, Delaporte E, Peeters M, and Morgado MG: Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: Tracing the origin of this subtype in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:207–211.
- Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, de Sa CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, and Tanuri A: Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 2000;275:107–115.
- Pires IL, Soares MA, Speranza FA, Ishii SK, Vieira MC, Gouveia MI, Guimaraes MA, de Oliveira FE, Magnanini MM, Brindeiro RM, and Tanuri A: Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2004;42:426–430.
- Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, and de Andrade CL: The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: A spatial analysis. *Cad Saude Publica* 2000;16:7–19.
- Eyer-Silva WA, Basilio-de-Oliveira CA, and Morgado MG: HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. *Rev Saude Publica* 2005;39:950–955.
- Eyer-Silva WA and Morgado MG: A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:869–873.
- Eyer-Silva WA and Morgado MG: Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: Usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:664–670.
- Cornelissen M, van den Burg R, Zorgdrager F, Lukashov V, and Goudsmit J: pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: Evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J Virol* 1997;71:6348–6358.
- Felsenstein J: Finding the best tree by heuristic search. In: *Infering Phylogenies* (Felsenstein J, ed.). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2004.

Address reprint requests to:

Walter A. Eyer-Silva

Laboratório de Aids and Imunologia Molecular

Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4365, Pavilhão Leônidas Deane, 413-415

21045-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

E-mail: walter-eyer@unirio.br

## **ANEXO 3F:**

Eyer-Silva WA, Bello G, Morgado MG. Molecular evidence that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) dissemination in a small Brazilian city was already taking place in the early 1990s. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102(5), no prelo.



# Molecular evidence that human immunodeficiency virus type 1 dissemination in a small Brazilian city was already taking place in the early 1990s

Walter A Eyer-Silva<sup>\*/\*\*/+</sup>, Gonzalo Bello, Mariza G Morgado

Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av. Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>\*</sup>Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>\*\*</sup>Programa Municipal de HIV/Aids de Miracema, Miracema, RJ, Brasil

*We recently performed a molecular epidemiology survey of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in Miracema, a small city in Southeast Brazil, and found multiple monophyletic clusters, consistent with independent introductions and spread of different viral lineages in the city. Here we apply Bayesian coalescent-based methods to the two largest subtype B clusters and estimate that the most recent common ancestors that gave rise to these two transmission chains were in circulation around 1991-1992. The finding that HIV-1 spread in this Brazilian small city was already taking place at a time Aids was considered a problem restricted to large urban centers may have important public health implications.*

Key words: Aids - epidemiology - human immunodeficiency virus type 1 - Brazil

The true magnitude of the Aids epidemic in small Brazilian cities and rural areas is unknown. Small Brazilian cities are being challenged to provide care to an increasing number of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected patients, yet the clinical, epidemiological, and virological features of Aids in inner Brazil are scarcely studied. The advent of investigations that focus on the characteristics of HIV-1 infection in areas other than the large metropolitan centers of the country is a relatively recent achievement (Dhalia et al. 2000, Szwarcwald et al. 2000, Brito et al. 2001, Eyer-Silva & Morgado 2005, 2006, Eyer-Silva et al. 2005, 2007).

We recently reported on the molecular epidemiology of HIV-1 infection in the small city of Miracema, northwestern the state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil (Eyer-Silva & Morgado 2006). In a setting primarily characterized by heterosexual viral transmission (Eyer-Silva et al. 2005), we performed phylogenetic analyses of HIV-1 strains recovered from a total of 63 adult patients and found a pattern consistent with the existence of multiple viral introductions in the region. We also found 29 samples (representing 46% of the cohort) forming six monophyletic clusters. The two largest clusters that emerged from this study were cluster I, which harbored subtype B strains recovered from ten patients, and cluster II, which encompassed subtype B sequences from seven additional cases (Figure). Intra-cluster patients probably took part in the same chain of viral spread, suggesting the existence of sexual networks and a high incidence molecular profile. Each of these clusters prob-

ably arose as the result of independent introductions of different HIV-1 subtype B lineages in the city. Patients from cluster I and II were diagnosed with HIV-1 infection between the years of 2000-2003 and 1996-2003, respectively. The earliest recorded cases of Aids among residents of the city date back to 1989.

In the present study we apply Bayesian coalescent-based methods to estimate the substitution rate and the time in which the most recent common ancestors of these two largest clusters originated. These estimates may thus stand as an indication of the date in which the founder strains were introduced in the city and began to spread to give rise to the phylogenetic clusters currently observed.

Partial sequences of C2V3 hypervariable region of HIV-1 *envelope* gene were generated from samples collected between 2001 and 2004 using outer and nested primer sets (available on request). Only one sequence per patient was included in the study. Nucleotide sequences were aligned using CLUSTAL X program (Thompson et al. 1997) and later hand edited. All positions with alignment gaps were excluded from the analyses. An alignment of around 215-bp spanning the V3 region of the *envelope* gene was generated for cluster I (nucleotides 7071 to 7289 relative to HXB2 clone) and cluster II (nucleotides 7027 to 7254 relative to HXB2 clone). Alignments are available from the authors upon request. The data sets had no evidence of substitution saturation, hypermutation or intersubtype recombination. Full details of the phylogenetic analyses are described elsewhere (Eyer-Silva & Morgado 2006). The phylogenetic tree is shown in the Figure.

Estimates of the evolutionary rate ( $\mu$ , nucleotide substitutions per site per year, *subs/site/year*) and the time of the most recent common ancestor ( $T_{\text{mrca}}$ , years) for each cluster were obtained by using Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) inference as implemented in BEAST v1.3 software (Drummond et al. 2002,

<sup>+</sup>Corresponding author: walter-eyer@unirio.br

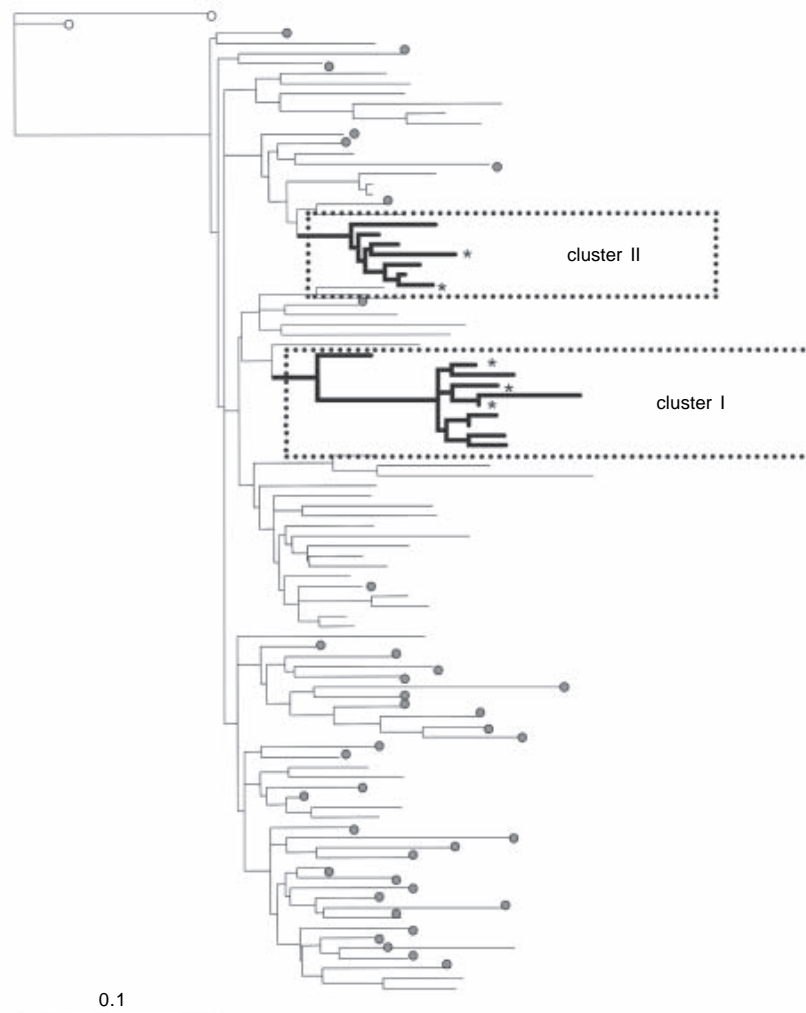
Received 16 January 2007

Accepted 28 May 2007

Drummond & Rambaut 2003). The number and the time span covered (i.e., four years) by clusters I and II *envelope* sequences were not sufficient to reliably estimate  $\mu$  or  $T_{\text{mrca}}$  using sample dates. Thus, we used as an empirical prior distribution the posterior distribution of  $\mu$  ( $3.8 \times 10^{-3}$  to  $6.2 \times 10^{-3}$  *subs/site/year*) previously estimated by Bayesian MCMC inference from an independent data set of 145 subtype B C2V3 *envelope* sequences sampled between 1989 and 2004 in Brazil (Bello et al. 2007). Analyses were performed using the Hasegawa, Kishino, and Yano (HKY) model of nucleotide substitution (Hasegawa et al. 1985) with gamma-distributed rates across sites and a proportion of sites assumed to be invariable. Three separate MCMC chains were run for  $5 \times 10^6$  genera-

tions for each data set, with a burn-in of  $5 \times 10^5$ . Effective Sampling Sizes (ESS) for the estimates were above 100.

Estimates of substitution rate and  $T_{\text{mrca}}$  were obtained separately for each cluster data set. The mean estimated HIV-1 evolutionary rate for both clusters was  $5.2 \times 10^{-3}$  *subs/site/year*, similar to that previously estimated for subtype B in Brazil (Bello et al. 2007). The similar mean values and the completely overlap of highest posterior density (HPD) intervals for each rate estimate (Table), suggest no major differences in evolution rate between the two clusters. However, 95% HPD intervals of evolution rate estimates for both clusters ( $4.1 \times 10^{-3}$  -  $6.2 \times 10^{-3}$  *subs/site/year*) almost coincide with empirical prior interval ( $3.8 \times 10^{-3}$  -  $6.2 \times 10^{-3}$  *subs/site/year*), indicat-



Maximum likelihood optimality criterion phylogenetic reconstruction of 58 subtype B *envelope* hypervariable C2V3 sequences generated from samples collected between 2001 and 2004 from the Miracema study. Clusters I and II are indicated. The tree was constructed using two subtype C sequences as outgroups (white circles) and applying the general time-reversible model of nucleotide substitution with gamma-distributed rates across sites and a fraction of sites assumed to be invariable. Brazilian and foreign subtype B reference strains are indicated as gray circles. The robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. Cluster I and II sequences generated from patients on an Aids-defining clinical stage are indicated with an asterisk. Full details of this molecular epidemiology survey are given in Eyer-Silva and Morgado (2006).

TABLE  
 Bayesian estimates of the mean evolutionary rate ( $\mu$ , substitutions site<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>) and median time of the most recent common ancestor ( $T_{mrca}$ , year) for clusters I and II

	Cluster I	Cluster II
$\mu$ (95% HPD)	$5.2 \times 10^{-3}$ ( $4.1 \times 10^{-3}$ - $6.2 \times 10^{-3}$ )	$5.2 \times 10^{-3}$ ( $4.1 \times 10^{-3}$ - $6.2 \times 10^{-3}$ )
$T_{mrca}$ (95% HPD)	1991 (1986 - 1995)	1992 (1988 - 1996)

ing that not much information was added by the data. With these rates of nucleotide substitutions, the mean estimated  $T_{mrca}$  for the different clusters was situated around the years 1991 and 1992 for clusters I and II, respectively. For both clusters, 95% HPD intervals around envelope  $T_{mrca}$  estimates displayed great overlap (Table), supporting similar emergence dates of these clusters.

In summary, we estimate that the founder strains that triggered the transmission chains resulting in the recently observed clusters I and II in Miracema date back to the early 1990s. Given that all intra-cluster cases of these monophyletic clusters are (or have been) residents of the city, and that some intra-cluster cases had advanced HIV-1 disease in the early 2000s (Figure), it seems plausible that most recent common ancestors of clusters I and II were already circulating in the region around the years of 1991 and 1992. These results suggest that HIV-1 dissemination in this small Brazilian city was probably taking place by the time Aids was considered a problem restricted to large urban centers of the country. It is conceivable that similar chains of viral spread have taken place and may currently be going on in many other small Brazilian cities. Although these results should certainly be interpreted taking into account the limitations of small sample size and narrow time span covered by the sequences, they highlight the urgent need to recognize Aids as an important public health problem in small Brazilian cities and to design strategies to halt epidemic spread towards inner Brazil.

REFERENCES

Bello G, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Guimaraes ML, Chequer-Fernandez SL, Teixeira SL, Morgado MG 2007. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. *Infect Genet Evol* 7: 263-270.  
 Brito AM, Castilho EA, Szwarcwald CL 2001. AIDS and HIV

infection in Brazil: a multifaceted epidemic. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 207-217.  
 Dhalia C, Barreira D, Castilho EA 2000. A AIDS no Brasil: situação atual e tendências. *Boletim epidemiológico Aids, XIII, no. 01*.  
 Drummond AJ, Nicholls GK, Rodrigo AG, Solomon W 2002. Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 161: 1307-1320.  
 Drummond AJ, Rambaut A 2003. Beast version 1.0, Available from [http://beast.bio.ed.ac.uk/Main\\_Page/](http://beast.bio.ed.ac.uk/Main_Page/).  
 Eyer-Silva WA, Morgado MG 2005. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 869-873.  
 Eyer-Silva WA, Morgado MG 2006. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 664-670.  
 Eyer-Silva WA, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG 2005. HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. *Rev Saúde Pública* 39: 950-955.  
 Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG 2007. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Inner Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 32: 303-308.  
 Hasegawa M, Kishino H, Yano T 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22: 160-174.  
 Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL 2000. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saúde Pública* 16: 7-19.  
 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.



## **ANEXO 3G:**

Eyer-Silva WA, Freire MAL, Gayão ML, Basílio-de-Oliveira CA, Morgado MG.

Epidemiologic features of HIV infection in 3 small cities in inner Rio de Janeiro State,

Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 2007, no prelo.

**MANUSCRIPT RIMTSP reg. 93/06, REVISED**

Original Article

EPIDEMIOLOGIC FEATURES OF HIV INFECTION IN 3 MUNICIPALITIES OF INNER  
RIO DE JANEIRO STATE, BRAZILCaracterísticas Epidemiológicas da Infecção pelo HIV em 3 Municípios do Interior do Estado  
do Rio de Janeiro, BrasilWALTER A. EYER-SILVA(1,2,3,4,5), MARIA ALESSANDRA LEITE FREIRE(3), MARY  
LÚCIA GAYÃO(4), CARLOS ALBERTO BASÍLIO-DE-OLIVEIRA(2), & MARIZA G.  
MORGADO(1)

(1) Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

(2) Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

(3) Programa municipal de HIV-1/Aids de Miracema, Rio de Janeiro State, Brazil.

(4) Programa municipal de HIV-1/Aids de Saquarema, Rio de Janeiro State, Brazil.

(5) Programa municipal de HIV-1/Aids de Santo Antonio de Pádua, Rio de Janeiro State, Brazil.

Correspondence to: Walter A. Eyer-Silva, MD. Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365. Pavilhão Leônidas Deane, 413-415. 21045-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil. fax: 55-21-38658173; Email: walter-eyer@unirio.br

SUMMARY word count: 198; RESUMO word count: 200; body of text word count: 2366

## SUMMARY

In Brazil relatively little attention is being paid to the study of the features of the spread of the AIDS epidemic towards small cities and rural areas. We report a descriptive study on the epidemiological features of HIV infection among 208 adult patients seen between July 1999 and May 2006 in the municipal HIV/AIDS Programs of 3 cities of inner Rio de Janeiro State: Saquarema, Santo Antonio de Pádua and Miracema. A portrait of a heterosexual epidemic emerged, with an overall male to female ratio of 1.1. More than 90% were residents of the studied cities, demonstrating a local demand for HIV-related assistance and the importance of municipal HIV/AIDS Programs. Past or current use of snorted cocaine was reported by a quarter of the patients. Older age and male gender were independent predictors of having a diagnosis of AIDS at presentation. The latter is in accordance with a more recent wave of epidemic spread towards female gender. A low frequency of male circumcision, an important determinant of heterosexual HIV transmission, was recorded. Almost 60% of the patients first presented in advanced stages of HIV infection, suggesting the existence of a large pool of undiagnosed cases in the community.

**KEYWORDS:** acquired immunodeficiency syndrome; Brazil; epidemiology; HIV-1 infection; small municipalities

## INTRODUCTION

One of the major features of the current Brazilian AIDS epidemic is its spread towards small cities and the innermost parts of the country<sup>6,7,11</sup>. Small Brazilian cities are being challenged to provide care to an increasing number of HIV-infected patients, yet they generally have a much less comprehensive health infrastructure to deal with the multidisciplinary aspects of HIV infection. In cities without an established municipal HIV/AIDS Program, patients need to be referred to receive care where facilities and expertise in the medical management of HIV infection is available. The true magnitude of the epidemic in small Brazilian cities and rural areas is unknown and there is an urgent need to perform studies on issues such as incidence and other epidemiologic characteristics, opportunities of interventions to halt epidemic spread, the spectrum of clinical complications, confidentiality issues, and the prevalence of resistance to antiretroviral drugs. Certainly, the AIDS epidemic in Brazil needs appropriately designed field studies that generate primary data.

The State of Rio de Janeiro is the third most populous and the second most heavily burdened by the epidemic in the country. As of December 2004 a cumulative number of 43,629 AIDS cases had been reported in Rio de Janeiro State since the beginning of the epidemic<sup>4</sup>.

However, this figure may largely underestimate the true magnitude of the epidemic. It has been shown that 51.9% of all AIDS-related deaths in the State of Rio de Janeiro between 1991 and 1995 have not been reported to the Ministry of Health<sup>12</sup>.

Little is known about the epidemiologic features of HIV infection in relatively small Brazilian cities. A seminal ecological study found that among AIDS cases reported between 1993 and 1996 the male to female ratio (MFR) was smaller in small cities (2.77) when compared to large urban centers (3.44)<sup>11</sup>. We recently reported on the clinical and epidemiological features

of HIV infection and AIDS among patients who received care between 1999 and 2003 in the municipal HIV/AIDS Program of the small municipality of Miracema, in northwestern Rio de Janeiro State<sup>6</sup>. We found an inverted MTFR, an absolute predominance of heterosexual transmission, a high frequency of previous use of snorted cocaine, and that more than half of the cohort first presented in advanced stages of immunodeficiency. A phylogenetic analysis of HIV-1 sequences recovered from this cohort was performed to better understand the routes of viral spread in a small Brazilian municipality<sup>7</sup>. We found multiple clusters of genetically related HIV-1 strains, suggesting the existence of sexual networks and a high incidence phylogenetic profile.

We report herein the epidemiologic features of HIV infection in 2 additional cities of inner Rio de Janeiro State: Saquarema, a nationwide famous municipality for its tourist attractions, and the northwestern Santo Antonio de Pádua, a small municipality located very close to Miracema. The study of the features of HIV infection and AIDS in these cities shall broaden our understanding of the characteristics of HIV infection and AIDS in inner cities of Rio de Janeiro State.

## METHODS

Saquarema is situated 116 Km north from the municipality of Rio de Janeiro, in the so called Sun Coast region (Figure 1). Bathed by the Atlantic, the municipality enjoys a worthy reputation of being a place of outstanding natural beauty and attracts thousands of domestic and foreign visitors and vacationers every year. As of July 2005, the municipality counted 61,591 inhabitants distributed in a geographic area of 355Km<sup>2</sup> (<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>). The municipal HIV/AIDS program of Saquarema was established in the year 2000. Santo Antonio de Pádua has an area of 612 Km<sup>2</sup> (including 8

predominantly rural or semi-rural districts) and is situated in northwestern Rio de Janeiro State, 263 Km far from the capital, at the border of Minas Gerais State (Figure 1). A major economic activity of the municipality is the extraction and processing of decorative stones. As of July 2005, the municipality counted 42,078 inhabitants (<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>). Until August 2001, HIV-infected patients were referred to receive care in the municipality of Itaperuna, which is 60 Km apart. A municipal HIV/AIDS Program has now been established and patients benefit from regular medical appointments in the municipal hospital and local dispensation of drugs used in the management of HIV infection.

The features of adult HIV infection in these 2 cities were compared to those previously reported from Miracema, a detailed characterization of which is presented elsewhere<sup>6</sup>. For the purpose of the present study, data from the Miracema study was updated to include patients seen until May 2006. The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Review Board at Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

As of the year 2000, the cities of Siquemema, Santo Antonio de Pádua, and Miracema had been assigned by the Instituto de Pesquisas Econômicas e Aplicadas human development index values of 0.762, 0.754, and 0.733, respectively. Among the 91 municipalities of Rio de Janeiro State, these figures correspond, respectively, to positions 45th, 50th, and 70th<sup>9</sup>.

After obtaining signed informed consent, clinical and epidemiological characteristics of all HIV-infected adult patients who received care in the municipal HIV/AIDS Programs of Siquemema and Santo Antonio de Pádua between October 2001 and May 2006 were collected on standardized questionnaires. The diagnosis of HIV infection was made based on the

algorithm proposed by the Brazilian Ministry of Health<sup>2</sup>. Patients were staged according to the 1993 Classification System of the Centers for Disease Control and Prevention<sup>3</sup>.

Demographic, epidemiologic, social and behavioral variables, as well as the clinical stage of HIV infection were recorded as of first medical visit. We also assessed male circumcision status, an important determinant of HIV heterosexual transmission<sup>5</sup>, through either questioning or genital examination.

Differences between categorical and continuous variables were compared by applying the chi-square ( $\chi^2$ ) test for  $k$  independent samples, the Fisher's exact test, and the Kruskal-Wallis rank sum test, where appropriate<sup>10</sup>. The null hypothesis was that the 3 cohorts were samples from the same or identical populations. A type I error was pre-specified as  $<0.01$ . When the null hypothesis was rejected, data was further explored by an analysis of residuals to understand better where in the  $r \times k$  contingency table were the significant differences<sup>10</sup>. A multivariate logistic regression analysis was also used to identify variables independently associated with having an AIDS-defining CDC stage at presentation. Statistical analyses were performed using the software R, version 2.2<sup>8</sup>.

## RESULTS

Between October 2001 and May 2006 a total of 93 and 34 adult patients received care in the municipal HIV/AIDS Programs of Saquarema and Santo Antonio de Pádua, respectively. The cumulative number of adult patients seen in the municipal HIV/AIDS Program of Miracema (between July 1999 and May 2006) was 81. Therefore, 208 patients were seen in these 3 cities. The MTFRs of HIV infection in these 3 cities were 1.6, 1.0, and 0.8, respectively, whereas the MTFR of cases fulfilling a diagnosis of AIDS (CDC stages A3, B3, and C) at presentation was consistently higher: 3.5, 1.3, and 0.9, respectively (Table 1).

The mean (SD [standard deviation]) age at presentation was 34.6 (SD 11.5), with an age range of 16-74 years. A total of 23 (11%) patients were older than 50 years when diagnosed with HIV infection. More than 90% were inhabitants of the studied cities and around three-fourths attributed the acquisition of HIV infection to unprotected heterosexual intercourse. Isolated cases (5 patients) of HIV infection attributed to the use of injected forms of cocaine were registered, whereas roughly one-fourth (51 patients) reported previous use of snorted cocaine. More than 70% had none or less than 8 years of education. Only 11 (5.3%) patients had partial or complete high-level education (data not shown). Nearly 60% of the patients had an AIDS-defining CDC stage when first presented for medical care (Table 1). We assessed male circumcision status in 99 patients. A total of 90 (90.9%) were uncircumcised.

No statistically significant difference between the 3 groups was recorded when variables age, categorized age ranges, place of residence, level of education, exposure category, frequency of an AIDS-defining CDC stage at presentation, and previous use of snorted cocaine were studied. However, patients from Miracema were more likely to be single (as a marital status) and patients from Saquarema were more likely to have been born elsewhere and to have initiated HIV follow up in another municipality (Table 1). A multivariate logistic regression analysis was performed to identify variables independently associated with a diagnosis of an AIDS-defining CDC stage at presentation. We found that being a male patient (odds ratio [OR] = 2.27; 95% confidence interval [CI] = 1.67 to 2.86;  $P = 0.007$ ) and presenting at an older age (as a continuous variable, OR = 1.06; 95% CI = 1.03 to 1.09;  $P = 0.0004$ ) were independent predictors of having a diagnosis of AIDS. The OR for increments of 5 and 10 years of age was found to be 1.37 and 1.89, respectively.

## DISCUSSION



A portrait of a heterosexual epidemic emerges from this study. The overall MTFR of cases of HIV infection was found to be 1.1, which means that 46.4% of all patients were of the female gender. The finding of higher MTFRs for cases who presented with a diagnosis of AIDS in the 3 studied cities, when compared to the MTFRs of HIV infection, is in accordance with a more recent wave of spread of the epidemic towards the female gender. In Miracema and Santo Antonio de Pádua, a female gender representation of half or more of the cohort was recorded, whereas in Saquarema more than 60% of the patients were male.

We found a few epidemiologic differences between the 3 studied cohorts. When compared to the 2 northwestern cities, patients from Saquarema were significantly more likely to have been born elsewhere and to have initiated HIV follow up in another municipality. In fact, Saquarema is a municipality that attracts people from all over Brazil. Also, the MTFR of HIV infection in Saquarema (1.6) was found to be higher than figures from the other 2 cities. In sharp contrast, most patients from Miracema and Santo Antonio de Pádua were receiving care in the municipality they were born and where MTFRs of HIV infection and AIDS were lower. Interestingly, patients from Miracema were more likely to be single (as a marital status) when compared to the other cities. The significance of this unexpected finding remains unknown. Although this may simply be explained by a somewhat younger cohort in Miracema (Table 1), differences in variable age among the 3 groups were not significant.

Nearly 60% of the patients first presented to medical attention in advanced stages of HIV-infection (Table 1), which suggests the existence of a large pool of undiagnosed cases in the community. This represents one of the most challenging facets of the spread of the epidemic towards relatively small Brazilian cities. Health care professionals in these areas are being faced with an increasing number of patients presenting with life-threatening HIV-related

diseases. These patients need immediate diagnosis and prompt institution of appropriate treatment. Generally such patients are epidemiologically linked to other subjects who will also need HIV counseling and testing.

We found male gender and older age (as a continuous variable) to be independent predictors of a diagnosis of AIDS at presentation. Older age is plausibly associated with an AIDS diagnosis at presentation since profound CD4 cell count depletion and emergence of HIV-related disease usually ensues after many years of clinically silent, chronic asymptomatic infection. The association of male gender with AIDS at presentation also seems to be related to a more recent wave of HIV spread towards the female gender.

A common behavioral characteristic was a history of past or current use of snorted cocaine. Only isolated cases of HIV infection attributed to the use of intravenous drugs were recorded (5 cases). In fact, in the State of Rio de Janeiro cocaine is more commonly used snorted than injected<sup>1</sup>. A history of alcohol abuse was also commonly reported by our patients (data not shown). The role of alcohol and non-injected forms of cocaine in unsafe sexual behavior and the spread of HIV in the State of Rio de Janeiro and other Brazilian regions where these problems are common still await appropriate investigations.

We assessed the frequency of male circumcision and found that more than 90% were uncircumcised. Although this figure by no means should be regarded as an estimate of the frequency of male circumcision in the overall population, it certainly suggests a low prevalence of male circumcision among residents of inner cities of the State. The uncircumcised status has been shown to be a major determinant of HIV transmission, mainly in African countries<sup>5</sup>. Studies on the prevalence of male circumcision in Brazil and on whether it is associated with viral spread among the heterosexual population are lacking.

We found that around 90% of the patients were residents of the studied cities, which demonstrates a local demand for HIV-related assistance. All efforts should thus be employed to the establishment of as many municipal HIV/AIDS Programs as possible, so that patients can benefit from state-of-the-art treatment in their own cities of residence. It is our opinion that such Programs are invaluable to provide local access to counseling, prevention (including vertical transmission prophylaxis), diagnosis, comprehensive case reporting, treatment, and may be of utmost importance to control epidemic spread. Health care professionals based in large urban centers may find it rewarding to share their knowledge and part of their time with small municipality professionals interested in the establishment of such Programs. Municipal authorities should realize the importance of offering logistic support and State health officials should be fully committed to provide efficient, low bureaucratic help. The role of community leaders, including those taking part in Municipal Health Councils, cannot be overemphasized.

In Brazil, AIDS is still considered a problem mainly restricted to large urban centers and relatively little attention is being paid to the study of the features of HIV infection in relatively small cities. Risk reduction campaigns should make it clear that HIV is finding a fertile field for dissemination among residents of small cities that engage in unprotected sexual intercourse. Such campaigns should not underestimate the importance of local press media, especially the comprehensive audience of local radio broadcasts in small cities and rural areas.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to the patients, for agreeing to participate in this study, and to the many dedicated local health professionals in Miracema, Saquarema, and Santo Antonio de Pádua, without whom this study could not be possible.

## RESUMO

No Brasil, relativamente pouca atenção vem sendo dispensada ao estudo das características do avanço da epidemia de Aids em direção aos pequenos municípios e áreas rurais.

Apresentamos um estudo descritivo sobre as características epidemiológicas da infecção pelo HIV entre 208 pacientes adultos atendidos entre julho de 1999 e maio de 2006 pelos Programas Municipais de HIV/Aids de 3 municípios do interior do Estado do Rio de Janeiro: Saquarema, Santo Antonio de Pádua, e Miracema. Os resultados delineiam uma epidemia de perfil heterossexual, com uma razão de sexos homem-mulher de 1,1. Mais de 90% eram residentes das cidades estudadas, demonstrando uma demanda local por assistência relacionada ao HIV e a importância dos Programas Municipais de HIV/Aids. Um quarto dos pacientes referiu antecedentes de uso de cocaína inalada. Variáveis idade e gênero masculino mostraram-se independentemente associadas a um diagnóstico de Aids quando da apresentação. Esta última mostra-se de acordo com um mais recente avanço da epidemia em direção às mulheres. Registramos uma baixa frequência de circuncisão masculina, um importante determinante da transmissão heterossexual do HIV. Quase 60% dos pacientes se apresentaram em estágios avançados de infecção HIV, o que sugere a existência de um grande reservatório de casos não diagnosticados na comunidade.

**PALAVRAS-CHAVE:** síndrome de imunodeficiência adquirida; Brasil; epidemiologia; infecção pelo HIV-1; pequenos municípios

## REFERENCES

1. BASTOS, F.I.; STRATHDEE, A.S.; DERRIÇO, M. *et al.* - Drug use and the spread of HIV/AIDS in South America and the Caribbean. **Drugs: Education, Prevention and Policy**, **6**: 29-49, 1999.
2. BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria número 59 de 28 de janeiro de 2003. Available at URL site: <http://www.aids.gov.br/final/diagnostico/portaria.htm> (accessed Feb 10th, 2007).
3. CDC. - 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **M.M.W.R. (RR-17)**, **41**: 961-962, 1992.
4. ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Boletim Epidemiológico DST & AIDS. 2005.
5. EYER-SILVA, W.A. - A circuncisão masculina e a transmissão heterossexual do HIV [Male circumcision and HIV heterosexual transmission]. **Rev. Saúde públ.**, **37**: 678-686, 2003.
6. EYER-SILVA, W.A.; BASILIO-DE-OLIVEIRA, C.A. & MORGADO, M.G. - HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. **Rev. Saúde Pública**, **39**: 950-955, 2005.
7. EYER-SILVA, W.A. & MORGADO, M.G. - Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. **J. acquir. immune. Defic. Syndr.**, **41**: 664-670, 2006.
8. IHAKA, R. & GENTLEMAN, R. R: A Language for Data Analysis and Graphics. **J. computat. graph. Statist.**, **5**: 299-314, 1996.

9. IPEA, FUNDAÇÃO JOÃO PINHEIRO & PNUD. **Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil**. Available at URL site: <http://www.pnud.org.br/atlas/> (accessed Feb 10th, 2007).
10. SIGEL, D.J. & CASTELLAN, N.J. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. 2. ed. New York, McGraw-Hill, 1988.
11. SZWARCOWALD, C.L.; BASTOS, F.I.; ESTEVES, M.A. & ANDADE, C.L.T. - The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. **Cadern. Saúde públ., 16 (suppl. 1): 7-19, 2000.**
12. LEMOS, K.R.V. & VALENTE, J.G. - Death certificates as a marker for under-recording of AIDS cases. **Cad. Saúde Pública, 17: 617-626, 2001.**

	Saquarema Oct 01 – May 06 (n=93)	Stº. Ant. Pádua Oct 01 – May 06 (n=34)	Miracema Jul 99 – May 06 (n=81)	Total Jul 99- May 06 (n=208)
female gender (n, %)	35 (37.6%)	17 (50%)	44 (54.3%)	96 (46.4%)
male to female ratio (HIV infection)	1.6	1.0	0.8	1.1
male to female ratio (AIDS cases)	3.5	1.3	0.9	1.7
age (mean ± SD)	35.6 ± 12.2	36.8 ± 11.2	32.5±10.5	34.6±11.5
age range (years)	18 - 74	23 - 58	16 - 63	16 - 74
≤20	4 (4.3%)	-	5 (6.2%)	9 (4.3%)
21-30	31 (33.3%)	14 (41.2%)	37 (45.6%)	82 (39.4%)
31-40	32 (34.4%)	8 (23.5%)	23 (28.4%)	63 (30.3%)
41-50	15 (16.1%)	6 (17.6%)	10 (12.3%)	31 (14.9%)
>50	11 (11.8%)	6 (17.6%)	6 (7.4%)	23 (11%)
marital status (n, %)				
single	43 (46.2%)	10 (29.4%)	56 (69.1%)*	109 (52.4%)
married/divorced/stable union/widowed	50 (53.7%)	24 (70.6%)	25 (30.8%)	99 (47.6%)
place of birth (n, %)				
native to the studied municipality	23 (24.7%)	18 (52.9%)	61 (75.3%)	102 (49%)
neighboring municipality	14 (15%)	9 (26.4%)	11 (13.6%)	34 (16.3%)
other	56 (60.2%)*	7 (20.6%)	9 (11.1%)	72 (34.6%)
place of residence (n, %)				
residence in the studied municipality	86 (92.4%)	30 (88.2%)	73 (90.1%)	189 (90.8%)
other	7 (7.5%)	4 (11.7%)	8 (9.9%)	19 (9.1%)
level of education (n, %)				
none	8 (8.6%)	7 (20.6%)	10 (12.3%)	25 (12%)
< 8yr	56 (60.2%)	21 (61.7%)	46 (56.8%)	123 (59.1%)
≥ 8yr	29 (31.2%)	6 (17.6%)	24 (29.6%)	59 (28.3%)
not recorded	-	-	1 (1.2%)	1 (0.5%)
exposure category (n, %)				
heterosexual	69 (74.2%)	31 (91.1%)	58 (71.6%)	158 (75.9%)
homo/bisexual	20 (21.5%)	3 (8.8%)	17 (21%)	40 (19.2%)
intravenous drug use	4 (4.3%)	-	1 (1.2%)	5 (2.4%)
not recorded	-	-	5 (6.2%)	5 (2.4%)
CDC stage (n, %)				
non AIDS-defining	39 (41.9%)	11 (32.3%)	34 (42%)	84 (40.4%)
AIDS-defining	54 (58%)	23 (67.6%)	47 (58%)	124 (59.6%)
Inhaled cocaine use (n, %)				
yes	27 (29%)	4 (11.7%)	20 (24.7%)	51 (24.5%)
no	66 (71%)	30 (88.2%)	54 (66.6%)	150 (72.1%)
not recorded	-	-	7 (8.6%)	7 (3.3%)
Begun follow-up elsewhere (n, %)**				
yes	17 (18.3%)*	-	4 (4.9%)	21 (10.1%)

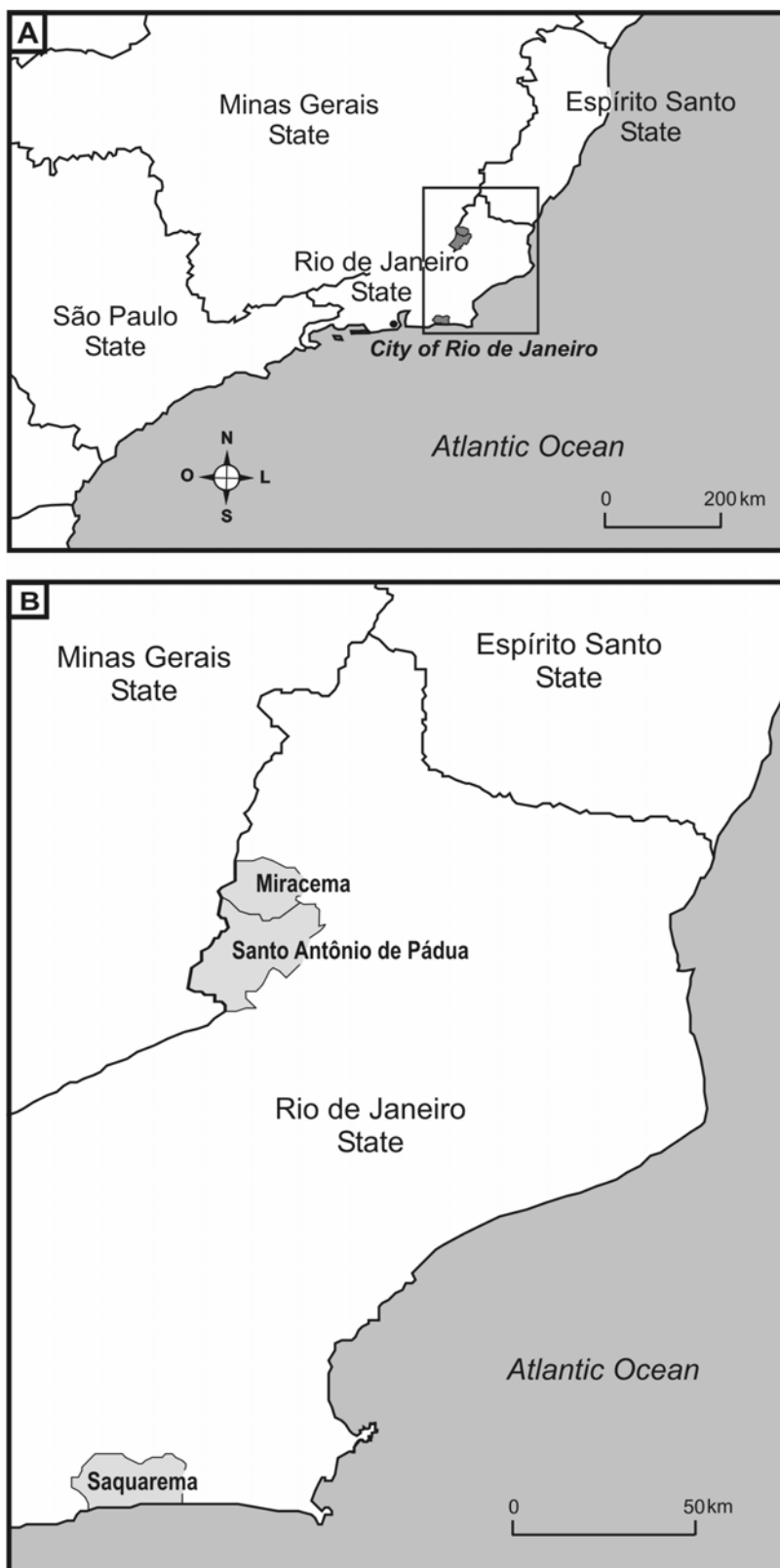
\* p<0.01

\*\* Before the establishment of the HIV/AIDS Program in Santo Antonio de Pádua, patients received care in the municipality of Itaperuna.

### Legend to Table 1.

Demographic, epidemiological, clinical, and behavioral data of 208 adult HIV-infected patients followed at the municipal HIV/AIDS Programs of Saquarema, Santo Antonio de Pádua, and Miracema, inner Rio de Janeiro State, July 1999 to May 2006.





**Legend to Figure 1.**

A) The Brazilian Southeast macroregion with its four component State; B) The cities of Saquarema, in the Sun Coast subregion, Miracema and Santo Antonio de Pádua, in the Northwestern subregion of Rio de Janeiro State, at the border of Minas Gerais.

## **ANEXO 3H:**

Eyer-Silva WA, Morgado MG. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by an HIV-1 diversity survey in a small city in inner Rio de Janeiro State,

Southeast Brazil.

Submetido para publicação.

## Original Article

Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by an HIV-1 diversity survey in a small city in inner Rio de Janeiro State, Southeast Brazil

Walter A. Eyer-Silva<sup>I,II,III</sup> and Mariza G. Morgado<sup>I</sup>

From the <sup>I</sup>Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro; <sup>II</sup>Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro; <sup>III</sup>Programa Municipal de HIV/Aids de Saquarema, Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding Author:

Walter A. Eyer-Silva, MD

Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz  
Pavilhão Leônidas Deane, Av. Brasil, 4365, 21045-900 Rio de Janeiro/RJ, Brazil  
fax: 55-21-38658173; telephone: 55-21-38658154; e-mail: walter-eyer@unirio.br

Body of text word count: 2555

Abstract word count: 199

Running head: HIV-1 diversity in Saquarema, inner Rio de Janeiro State

Key words: Brazil; CRF02\_AG; HIV-1; molecular epidemiology; transmission clusters

## ABSTRACT

As part of an ongoing study on the features of AIDS spread towards small cities and rural areas, we present a molecular survey of HIV-1 polymerase sequences recovered between 2004 and 2006 from 71 patients receiving care in the city of Saquarema, inner Rio de Janeiro State. Phylogenetic reconstructions found the 2 prevalent lineages in the State (subtypes B [59 strains, 83.1%], F1 [6 strains; 8.4%], and BF1 recombinants [4 strains; 5.6%]), as well as 2 (2.8%) CRF02\_AG strains, which seems to be an emerging lineage in the capital. These CRF02\_AG sequences were recovered from a married heterosexual couple who never traveled abroad, thus providing the first molecular evidence of autochthonous horizontal transmission of this lineage of major global importance. Also, 3 phylogenetic clusters of strains recovered from a total of 18.3% of the cohort were uncovered. Their close genetic relatedness suggests they were recovered from patients who probably took part in the same chain of viral spread. In conjunction with our previous surveys from inner Rio de Janeiro State, these results suggest that although small cities harbor unique molecular features of HIV-1 infection, they also clearly reflect and may rapidly absorb the diversity recorded in large urban centers.

## ORIGINAL ARTICLE

The extremely high genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) has been successfully used to study the regional and global distribution of different viral groups and subtypes (Hu et al. 1996) and makes it possible to trace patterns of viral spread between populations, groups and people (Kuiken et al. 2000). Phylogenetic analysis allows classification of HIV-1 strains into 3 groups: M, N and O. The M (main) group, the widest spread, has been further subdivided into at least 9 subtypes (A-D, F-H, J, and K) and 32 circulating recombinant forms (CRF), whereas a high diversity of unique intersubtype recombinant forms has also been demonstrated (Leitner et al. 2005). In Brazil, molecular analyses of HIV-1 nucleotide sequences have shown an epidemic driven mainly by 3 group M subtypes: B, C, and subsubtype F1 (heretofore designated subtype F1), as well as a myriad of unique BF1 intersubtype recombinants (Brindeiro et al. 2003, Morgado et al. 1998, Soares et al. 2003, Tanuri et al. 1999, Vicente et al. 2000). Isolated cases of other subtypes, such as subtype D (Couto-Fernandez et al. 2006, Morgado et al. 1998), subtype A (Caride et al. 2000), CRF02\_AG (Couto-Fernandez et al. 2005, Pires et al. 2004), CRF28\_BF and CRF29\_BF (De Sa Filho et al. 2006) have also been reported.

Phylogenetic analyses of HIV-1 nucleotide sequences are being increasingly used to better understand epidemiological patterns of viral spread. Such studies have proven to be invaluable to clarify the routes of viral transmission in community settings (Brown et al. 1997, Holmes et al. 1995), to establish (Blanchard et al. 1998, Ou et al. 1992) or rule out (Holmes et al. 1993, Jaffe et al. 1994) iatrogenic viral transmission, to study the pathways of viral spread among clusters of patients (Leitner et al. 1996, Robbins et al. 2002), to trace the geographic origin of recently introduced subtypes (Couto-Fernandez et al. 2006, Gao et al. 1996, Kato et al. 1999, Yu et al. 2001), to infer the demographic history and date of origin of

epidemic spread (Bello et al. 2006, Robbins et al. 2003), to investigate unusual forms of viral transmission (Andreo et al. 2004, Goujon et al. 2000), and has also found forensic applications (Albert et al. 1994, Banaschak et al. 2000, Lemey et al. 2005, Metzker et al. 2002). Phylogenetic analyses of HIV-1 sequences have also been used to provide evidence of a high incidence molecular profile, as evidenced by multiple transmission clusters, low level of sequence diversity and signature amino acid substitutions (Liitsola et al. 1998, Nguyen et al. 2002, Oelrichs et al. 2000, Shankarappa et al. 2001), and of an old and mature epidemic pattern, given the high sequence diversity and the absence of transmission clusters (Trask et al. 2002, Vidal et al. 2000).

It is known that the AIDS epidemic in Brazil is spreading from the large urban centers towards small cities and the innermost parts of the country (Szwarcwald et al. 2000).

Therefore, in an effort to better understand HIV-1 diversity, the molecular epidemiological patterns, and to assess the existence of micro-epidemic lineages associated with HIV-1 spread towards inner Brazil, our group is carrying out cross-sectional surveys in selected, small inner cities of Rio de Janeiro State. We recently reported on the molecular epidemiology of HIV-1 infection in 2 small, neighboring cities in the Northwestern Region of the State: Miracema (Eyer-Silva & Morgado 2006) and Santo Antonio de Pádua (Eyer-Silva et al. 2006). We found both a polyphyletic pattern suggestive of multiple viral introductions in the region, and that more than 40% of the recovered sequences fell within clusters of genetically related strains, suggesting the existence of sexual networks and a high incidence molecular profile. Additionally, phylogenetic clusters from one city were unrelated to those found in the other, suggesting that each of these 2 neighboring cities harbors its own set of micro-epidemic lineages (Eyer-Silva et al. 2006). We now expand our molecular characterization of HIV-1 strains to another city in inner Rio de Janeiro State: Saquarema, in the Sun Coat Region. The

data presented herein shall broaden our understanding of the genetic diversity and the molecular epidemiological profile associated with HIV-1 spread in inner Rio de Janeiro State.

## METHODS

### *Patients and setting*

Saquarema is situated 116 Km north from the city of Rio de Janeiro and counted, as of July 2005, 61,591 inhabitants distributed in a geographic area of 355Km<sup>2</sup> (<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/>). Bathed by the Atlantic, the city enjoys a nationwide reputation for its natural beauty and attracts thousands of domestic and foreign visitors and vacationers every year. A municipal HIV/AIDS program was established in the year 2000 and patients are offered regular medical appointments. The present study protocol was reviewed and approved by the Ethics Review Board at Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

### *Nucleotide sequencing and phylogenetic reconstructions*

After signed informed consent, blood samples were collected, DNA was extracted from PBMC, and the sequence of a single fragment of HIV-1 polymerase gene encompassing the whole protease (PR) and reverse transcriptase (RT) amino acids 1-230 was generated using a previously described in-house protocol (Eyer-Silva & Morgado 2005). In spite of being a relatively conserved region of the HIV-1 genome, the polymerase gene has been shown to contain enough phylogenetic signal for subtyping analysis (Cornelissen et al. 1997) and to allow studies of epidemiologic relationships between populations, groups and people (Eyer-Silva & Morgado 2006, Hue et al. 2004).

Sequences were aligned against a set of reference strains from HIV-1 group M subtypes and trimmed to equivalent lengths by using CLUSTAL X (Thompson et al. 1997). Minor adjustments were performed using BioEdit (Hall 1999). An alignment of 901 nucleotides, corresponding to positions 2313 through 3213 relative to HXB2 genome, was obtained. Phylogenetic inferences were performed by applying the maximum likelihood (ML) optimality criterion (Felsenstein 1973) as implemented in PAUP\* version 4.0b10 (Swofford 2002). The best fitting nucleotide substitution model was selected by using the Akaike criterion as implemented in MODELTEST version 3.06 (Posada & Crandall 1998). We found the GTR model with gamma-distributed rates across sites and a fraction of sites assumed to be invariable to be the best fitting. The parameters of the chosen model are indicated in the legend to Figure 1. ML trees were run with PAUP\* using heuristic searches based on a subtree pruning and regrafting (SPR) branch-swapping algorithm (Felsenstein 2004) and 1000 rounds of bootstrap replication (Felsenstein 1985). The robustness of the tree was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication and the phylogenetic tree was schematically represented with the TreeView program (Page 1996). The bootscanning method was used to detect and study recombination, as implemented in the SIMPLOT software, version 3.5 (Salminen et al. 1995). We found no evidence of hypermutation in the dataset when sequence CD83ELI (GenBank accession no. K02454) was used as the reference strain in the HYPERMUT program (Rose & Korber 2000). The presence of nucleotide substitution saturation at different codon positions was analyzed by plotting the transitions and transversions versus the F84 model of substitution by using the DAMBE software (Xia & Xie 2001). No nucleotide substitution saturation could be observed on inspection of the plots. This implies that the dataset was phylogenetically informative.

### *Statistical Analyses*



Patients whose samples yielded sequences that fell within a phylogenetic cluster were compared with those whose samples yielded non-clustered sequences. Depending on the variables, the Wilcoxon rank sum test, and the Fisher's exact test were used for the univariable analysis. Multivariate logistic regression was used to identify variables independently associated with being a patient whose sample yielded clustered sequences (response variable). Age, gender, place of birth and residence, marital status, exposure category, AIDS-defining CDC stage, having a known direct epidemiologic relationship within the cohort, having always lived in Saquarema, previous use of snorted cocaine, and level of education were studied as explanatory variables. Statistical analyses were performed using the software R (Ihaka & Gentleman 1996).

## RESULTS

### *Assignment to Subtypes*

Between October 2001 and May 2006 a total of 93 HIV-infected adult patients received care at a local ambulatory facility. A detailed clinical and epidemiological characterization of this cohort will be presented elsewhere. Between the years of 2004 and 2006 blood samples were collected from 73 enrolled patients. A total of 71 strains were recovered from 68 adult and 3 pediatric patients (including 1 mother and daughter couple). We failed to obtain sequences from 2 samples. Figure 1 presents the ML phylogenetic reconstruction. A total of 59 sequences (83.1%) were assigned group M subtype B. The remaining sequences were assigned group M subtypes F1 (6 strains; 8.4%), CRF02\_AG (2 strains; 2.8%), and unique BF1 recombinants (4 strains; 5.6%). Three unique BF1 recombinants (04BRSQ-46, 04BRSQ-54, 06BRSQ-89) harbored a subtype B fragment in the PR region and a subtype F1 fragment in the RT gene. The remaining BF1 mosaic strain (06BRSQ-35) displayed a predominant subtype B pattern with an F1 fragment in the RT region (Figure 1).

### *Identification of Phylogenetically Related Clusters and Couples*

ML phylogenetic reconstruction yielded 3 subtype B clusters encompassing a total of 13 strains (Figure 1), corresponding to 18.3% of all generated sequences. The largest cluster harbored 6 sequences and was supported by a bootstrap value of 100. Two other subtype B clusters harbored 4 and 3 strains and were supported by bootstrap figures of 90 and 99, respectively. The former included a pediatric patient (05BRSQ-78\_P) whose mother had died of complications of AIDS before the study period. Additionally, 5 phylogenetically-related couples of sequences were also seen: 3 couples were assigned subtype B, whereas the other 2 were assigned subtype F and CRF02\_AG. These CRF02\_AG strains (06BRSQ-88 and 06BRSQ-90) branched with a bootstrap value of 100 and were recovered from a married heterosexual couple who reported never have traveled abroad. Patient 06BRSQ-88, a 28-year-old male, attributed the acquisition of HIV-1 infection to unprotected sexual contacts in the city of Rio de Janeiro. His 29-year-old wife (patient 06BRSQ-90) reported having always lived in Saquarema.

### *Known Epidemiologic Relationships in the Cohort*

All sequences recovered from patients whose epidemiologic relationships were known a priori were found to be phylogenetically associated within one of the observed clusters or couples of related strains. These were the 5 phylogenetically-related couples (patients SQ-32/SQ-32\_P, the mother and child couple, SQ-88/SQ90, a married couple infected with CRF02\_AG strains, as well as couples SQ-01/SQ-53 and SQ-81/SQ-82 and the triad SQ-47/SQ-48/SQ-61, all of whom found to be infected with clustered sequences. The other patients whose sequences were found to be phylogenetically associated had no known direct epidemiologic relationship.

### *Demographic, social, clinical and behavioral associations within phylogenetic clusters*

Samples from 12 (17.6%) out of 68 adult patients yielded clustered sequences. On univariable analysis, these patients were found to be younger, more likely to have a known epidemiologic link within the cohort, to always have lived in Saquarema and to reside within the geographic limits of Saquarema as of sampling. Multivariable logistic regression analysis identified having a known direct epidemiologic relationship (odds ratio [OR] 9.44, 95% confidence interval [CI] 7.83-11.05,  $P=0.006$ ) and having always lived in Saquarema (OR 9.11, 95% CI 7.29-10.93,  $P=0.017$ ) as independent predictors of belonging to a cluster.

## DISCUSSION

The present molecular survey of HIV-1 polymerase sequences from the city of Saquarema uncovered the occurrence of 3 HIV-1 subtypes (B, F1, and CRF02\_AG) and 4 BF1 mosaic forms. The finding of such a genetic diversity in a small city in inner Rio de Janeiro State further highlights the complexity of the molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil.

Additionally, we present the first molecular evidence of horizontal transmission of subtype CRF02\_AG in Brazil. This is a rare HIV-1 variant in the country and only 2 cases have yet been published in peer-reviewed journals (both from the metropolitan area of Rio de Janeiro) (Couto-Fernandez et al. 2005, Pires et al. 2004). However, the recent identification of novel cases of HIV-1 infection due to CRF02\_AG at our laboratory (unpublished observations) suggests that this might prove to be an emerging lineage in the city of Rio de Janeiro. The present molecular evidence of autochthonous heterosexual transmission of CRF02\_AG strains, an HIV-1 variant of major global importance, emphasize the importance of continued monitoring of viral diversity in our country.

Phylogenetic analyses found evidence of 3 clusters of subtype B strains recovered from a total of 12 adult patients and 1 pediatric case whose mother had died of complications of AIDS

before the study period. The largest cluster harbored 6 strains, whereas 2 other clusters contained 4 and 3 sequences (Figure 1). These intracluster strains shared close genetic relatedness and were phylogenetically associated with high bootstrap values, suggesting that they were recovered from patients who probably took part in the same chain of viral spread. Similar phylogenetic clusters have also been identified in our previous molecular epidemiology surveys of HIV-1 strains from 2 small cities in Northwestern Rio de Janeiro State. In the present study, however, we found a lower prevalence of clustered sequences. Whereas in the previously reported analyses more than 40% of the strains were found to belong to a phylogenetic cluster (Eyer-Silva et al. 2006, Eyer-Silva & Morgado 2006), in the present Saquarema study 13 (18.3%) of the strains fell within a cluster. The lower prevalence of phylogenetically related cases probably is due to differences in the characteristics of the cohorts. When compared to the 2 Northwestern cities, patients from Saquarema were significantly more likely to have been born elsewhere and to have initiated HIV follow up in another city (data not shown). For instance, 60.2% of patients from Saquarema were born elsewhere, whereas the corresponding figures for Santo Antonio de Pádua and Miracema were 20.6% and 11.1%, respectively ( $p < 0.01$ ). In agreement with our previous studies (Eyer-Silva & Morgado 2006), patients whose sequences fell within a cluster were significantly more likely to have a known epidemiologic relationship within the cohort and to always have lived in the studied city.

In Brazil relatively little attention is being paid to the study of the features of the spread of the AIDS epidemic towards small cities and rural areas. This molecular analysis of HIV-1 sequences from the small city of Saquarema, in conjunction with our previous surveys from the inner cities of Miracema and Santo Antonio de Pádua, demonstrate the cocirculation in inner Rio de Janeiro State of the 2 prevalent subtypes in Southeast Brazil (B, F1, and BF1 recombinants), as well as 2 minor variants previously recorded in the capital: CRF02\_AG,

presented in this report, and the recently studied subtype D (Couto-Fernandez et al. 2006, Eyer-Silva et al. 2006, Morgado et al. 1998). Moreover, we present the first molecular evidence of autochthonous horizontal transmission of CRF02\_AG strains in Brazil. These results suggest that although small cities of inner Rio de Janeiro State harbor unique molecular features of HIV-1 infection, they also clearly reflect and may rapidly absorb the diversity recorded in large urban centers. The finding of such a complex pattern of viral subtypes and recombinant forms in small cities of Rio de Janeiro State also underscore the need for a continued study of the diversity and routes of HIV-1 spread in inner Brazil. These surveys will lead to a better understanding of the dynamics of the Brazilian HIV-1 epidemic, will be invaluable to monitor the prevalence and emergence of different viral lineages and may eventually be important to geographically related vaccine development.

#### *GenBank accession numbers*

Sequences were deposited on the GenBank database under accession numbers DQ899721 through DQ899721 and EF042627 through EF042690.

#### **Acknowledgements**

We are indebted to the patients followed at the Municipal HIV/AIDS Program of Saquarema, for agreeing to participate in this study. We also wish to thank the many dedicated health care professionals in Saquarema, without whom this study would not be possible.

## REFERENCES

- Albert J, Wahlberg J, Leitner T, Escanilla D, Uhlen M 1994. Analysis of a rape case by direct sequencing of the human immunodeficiency virus type 1 pol and gag genes. *J Virol* 68: 5918-24.
- Andreo SM, Barra LA, Costa LJ, Sucupira MC, Souza IE, Diaz RS 2004. HIV type 1 transmission by human bite. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20: 349-50.
- Banaschak S, Werwein M, Brinkmann B, Hauber I 2000. Human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual abuse: value of nucleic acid sequence analysis in identifying the offender. *Clin Infect Dis* 31: 1098-100.
- Bello G, Guimaraes ML, Morgado MG 2006. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. *AIDS* 20: 763-8.
- Blanchard A, Ferris S, Chamaret S, Guetard D, Montagnier L 1998. Molecular evidence for nosocomial transmission of human immunodeficiency virus from a surgeon to one of his patients. *J Virol* 72: 4537-40.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A 2003. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-9.
- Brown AJ, Lobidel D, Wade CM, Rebus S, Phillips AN, Brettle RP, France AJ, Leen CS, McMenamin J, McMillan A, Maw RD, Mulcahy F, Robertson JR, Sankar KN, Scott G, Wyld R, Peutherer JF 1997. The molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 in six cities in Britain and Ireland. *Virology* 235: 166-77.
- Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, de Sa CA, Eyer-Silva WA, Sion FS, Passioni LF, Menezes JA, Calazans AR, Tanuri A 2000. Drug-resistant

reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology* 275: 107-15.

Cornelissen M, van den Burg R, Zorgdrager F, Lukashov V, Goudsmit J 1997. pol gene diversity of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: evidence for naturally occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns, and common ancestry for subtypes B and D. *J Virol* 71: 6348-58.

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

Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJ, Morgado MG 2005. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 73-8.

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

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG 2006. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Inner Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*, in press.

Eyer-Silva WA, Morgado MG 2005. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 869-73.

- Eyer-Silva WA, Morgado MG 2006. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 664-70.
- Felsenstein J 1973. Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *Am J Hum Genet* 25: 471-92.
- Felsenstein J 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-91.
- Felsenstein J (2004). Finding the best tree by heuristic search. In "Inferring phylogenies" (J. Felsenstein, Ed.). Sinauer associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Gao F, Robertson DL, Morrison SG, Hui H, Craig S, Decker J, Fultz PN, Girard M, Shaw GM, Hahn BH, Sharp PM 1996. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 70: 7013-29.
- Goujon CP, Schneider VM, Grofti J, Montigny J, Jeantils V, Astagneau P, Rozenbaum W, Lot F, Frocrain-Herchkovitch C, Delphin N, Le Gal F, Nicolas JC, Milinkovitch MC, Deny P 2000. Phylogenetic analyses indicate an atypical nurse-to-patient transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74: 2525-32.
- Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Holmes EC, Zhang LQ, Robertson P, Cleland A, Harvey E, Simmonds P, Leigh Brown AJ 1995. The molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 in Edinburgh. *J Infect Dis* 171: 45-53.
- Holmes EC, Zhang LQ, Simmonds P, Rogers AS, Brown AJ 1993. Molecular investigation of human immunodeficiency virus (HIV) infection in a patient of an HIV-infected surgeon. *J Infect Dis* 167: 1411-4.



- Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, Luo CC, Kalish ML, Weniger BG, Pau CP, Schable CA, Curran JW 1996. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 275: 210-6.
- Hue S, Clewley JP, Cane PA, Pillay D 2004. HIV-1 pol gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS* 18: 719-28.
- Ihaka R, Gentleman R 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299-314.
- Jaffe HW, McCurdy JM, Kalish ML, Liberti T, Metellus G, Bowman BH, Richards SB, Neasman AR, Witte JJ 1994. Lack of HIV transmission in the practice of a dentist with AIDS. *Ann Intern Med* 121: 855-9.
- Kato K, Shiino T, Kusagawa S, Sato H, Nohtomi K, Shibamura K, Nguyen TH, Pham KC, Truong XL, Mai HA, Hoang TL, Bunyaraksyotin G, Fukushima Y, Honda M, Wasi C, Yamazaki S, Nagai Y, Takebe Y 1999. Genetic similarity of HIV type 1 subtype E in a recent outbreak among injecting drug users in northern Vietnam to strains in Guangxi Province of southern China. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15: 1157-68.
- Kuiken C, Thakallapalli R, Esklid A, de Ronde A 2000. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. *Am J Epidemiol* 152: 814-22.
- Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Uhlen M, Albert J 1996. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10864-9.
- Leitner T, Foley B, Hahn BH, Marx P, McCutchan F, Mellors JW, Wolinsky S, Korber BT, eds. (2005). "HIV Sequence Compendium 2005." Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, LA-UR 06-0680 ed.

- Lemey P, Van Dooren S, Van Laethem K, Schrooten Y, Derdelinckx I, Goubau P, Brun-Vezinet F, Vaira D, Vandamme AM 2005. Molecular testing of multiple HIV-1 transmissions in a criminal case. *AIDS 19*: 1649-58.
- Liitsola K, Tashkinova I, Laukkanen T, Korovina G, Smolskaja T, Momot O, Mashkilleyson N, Chaplinskas S, Brummer-Korvenkontio H, Vanhatalo J, Leinikki P, Salminen MO 1998. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant strain causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad. *AIDS 12*: 1907-19.
- Metzker ML, Mindell DP, Liu XM, Ptak RG, Gibbs RA, Hillis DM 2002. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proc Natl Acad Sci U S A 99*: 14292-7.
- Morgado MG, Guimaraes ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I, Jr., Veloso VG, Linhares-Carvalho MI, Castello-Branco LR, Bastos FI, Kuiken C, Castilho EA, Galvao-Castro B, Bongertz V 1998. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 18*: 488-94.
- Nguyen L, Hu DJ, Choopanya K, Vanichseni S, Kitayaporn D, van Griensven F, Mock PA, Kittikraisak W, Young NL, Mastro TD, Subbarao S 2002. Genetic analysis of incident HIV-1 strains among injection drug users in Bangkok: evidence for multiple transmission clusters during a period of high incidence. *J Acquir Immune Defic Syndr 30*: 248-56.
- Oelrichs RB, Shrestha IL, Anderson DA, Deacon NJ 2000. The explosive human immunodeficiency virus type 1 epidemic among injecting drug users of Kathmandu, Nepal, is caused by a subtype C virus of restricted genetic diversity. *J Virol 74*: 1149-57.

- Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo CC, Korber BT, Mullins JI, Schochetman G, Berkelman RL, Economou AN, et al. 1992. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science* 256: 1165-71.
- Page RD 1996. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-8.
- Pires IL, Soares MA, Speranza FA, Ishii SK, Vieira MC, Gouvea MI, Guimaraes MA, de Oliveira FE, Magnanini MM, Brindeiro RM, Tanuri A 2004. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 42: 426-30.
- Posada D, Crandall KA 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-8.
- Robbins KE, Lemey P, Pybus OG, Jaffe HW, Youngpairoj AS, Brown TM, Salemi M, Vandamme AM, Kalish ML 2003. U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains. *J Virol* 77: 6359-66.
- Robbins KE, Weidle PJ, Brown TM, Saekhou AM, Coles B, Holmberg SD, Folks TM, Kalish ML 2002. Molecular analysis in support of an investigation of a cluster of HIV-1-infected women. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1157-61.
- Rose PP, Korber BT 2000. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G --> A hypermutation. *Bioinformatics* 16: 400-1.
- Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE 1995. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1423-5.
- Shankarappa R, Chatterjee R, Learn GH, Neogi D, Ding M, Roy P, Ghosh A, Kingsley L, Harrison L, Mullins JI, Gupta P 2001. Human immunodeficiency virus type 1 env

- sequences from Calcutta in eastern India: identification of features that distinguish subtype C sequences in India from other subtype C sequences. *J Virol* 75: 10479-87.
- Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Brigido L, Pires IL, Morgado MG, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A 2003. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 17: 11-21.
- PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc., 1999.
- Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL 2000. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saude Publica* 16: 7-19.
- Tanuri A, Swanson P, Devare S, Berro OJ, Savedra A, Costa LJ, Telles JG, Brindeiro R, Schable C, Pieniazek D, Rayfield M 1999. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 20: 60-6.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-82.
- Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U, Chen Y, Meleth S, Kasolo F, Musonda R, Hunter E, Gao F, Allen S, Hahn BH 2002. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus type 1 transmission in a heterosexual cohort of discordant couples in Zambia. *J Virol* 76: 397-405.
- Vicente AC, Otsuki K, Silva NB, Castilho MC, Barros FS, Pieniazek D, Hu D, Rayfield MA, Bretas G, Tanuri A 2000. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 327-31.
- Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson D, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E 2000. Unprecedented degree of human

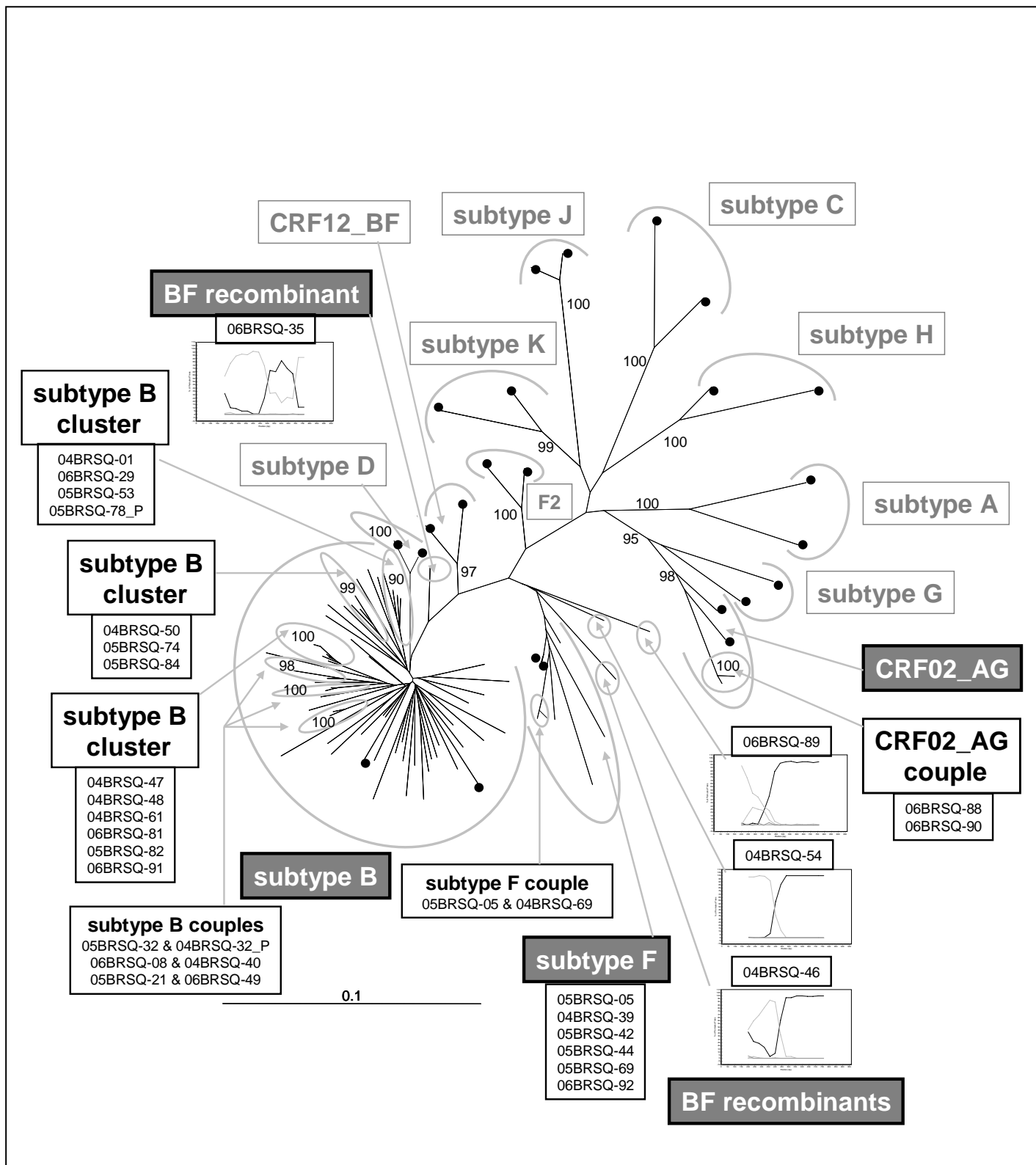
immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J Virol* 74: 10498-507.

Xia X, Xie Z 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Hered* 92: 371-3.

Yu XF, Liu W, Chen J, Kong W, Liu B, Yang J, Liang F, McCutchan F, Piyasirisilp S, Lai S 2001. Rapid dissemination of a novel B/C recombinant HIV-1 among injection drug users in southern China. *AIDS* 15: 523-5.

### Legend to Figure 1

Maximum likelihood optimality criterion phylogenetic study of 71 polymerase sequences recovered from patients followed in the Municipal HIV/AIDS Program of Saquarema, inner Rio de Janeiro State, between 2004 and 2006. Alignments were prepared with reference HIV-1 group M subtypes gathered from the Los Alamos HIV database (<http://hiv-web.lanl.gov>). Reference strains are represented as black dots. Phylogenetically related clusters and couples of sequences supported by a bootstrap value greater than 80 are circled and the corresponding strains are listed. The first 2 digits of the sequence name indicate the year of sample collection, whereas the suffix \_P indicates a pediatric patient. Trees were constructed by using the GTR model with  $\Gamma$ -distributed rates across sites and a fraction of sites assumed to be invariable. The robustness of the trees was evaluated by bootstrap analysis with 1000 rounds of replication. The parameters of the model were as follows: equilibrium nucleotide frequencies,  $f_A=0.4125$ ,  $f_C=0.1310$ ,  $f_G=0.2117$ ,  $f_T=0.2448$ ; R matrix values,  $R_{A<->C}=2.8404$ ,  $R_{A<->G}=9.2035$ ,  $R_{A<->T}=0.7296$ ,  $R_{C<->G}=1.7363$ ,  $R_{C<->T}=15.0106$ ,  $R_{G<->T}=1$ . The proportion of invariable sites was 46.16% and the shape parameter of the gamma distribution used for the reconstruction of the ML tree was 1.04. Bootscanning plots depicting the relationship of BF1 intersubtype recombinant strains to representatives of group M subtypes (F1 in black, B in light gray) are also shown. The analysis was performed on a sliding window of 400 nucleotides of the query sequences moving along an alignment of reference sequences of group M subtypes by increments of 40 nucleotides.



## **ANEXO 3I:**

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Morgado MG. Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations among Drug-Naïve and Experienced Patients in Two Small Brazilian Cities with Universal Access to Antiretroviral Therapy.  
Submetido para publicação.



## Original Article

Prevalence of HIV Type 1 Drug Resistance Mutations in Treatment-Naïve and Experienced Patients from Resource-Limited Settings with Universal Access to Antiretroviral Therapy: a Survey in Two Small Brazilian Cities

WALTER A. EYER-SILVA, M.D.,<sup>1,2,3,4</sup> JOSÉ CARLOS COUTO-FERNANDEZ, Ph.D.,<sup>1</sup>  
CARLOS SILVA-DE-JESUS,<sup>1</sup> and MARIZA G. MORGADO, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>2</sup>*Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

<sup>3</sup>*Programa Municipal de HIV-1/Aids, Saquarema, Rio de Janeiro State, Brazil*

<sup>4</sup>*Programa Municipal de HIV-1/Aids, Santo Antonio de Pádua, Rio de Janeiro State, Brazil*

Corresponding Author:

Walter A. Eyer-Silva, MD

Laboratório de Aids & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Av. Brasil, 4365. Pavilhão Leônidas Deane, 413-415. 21045-900 Rio de Janeiro-RJ, Brazil

fax: 55-21-38658173; telephone: 55-21-38658154; e-mail: walter-eyer@unirio.br

## ABSTRACT

Concerns have been raised that universal availability of antiretroviral agents in resource-limited settings might lead to the emergence and spread of resistant strains. We present the most comprehensive survey on the prevalence of HIV-1 resistance among treatment-naïve and experienced patients followed in small, relatively underprivileged cities in Brazil with universal availability to standard of care antiretroviral combinations. Samples were collected between 2004 and 2006 from 95 patients followed in the cities of Saquarema and Santo Antonio de Pádua, inner Rio de Janeiro State, Southeast Brazil. A proviral fragment encompassing HIV-1 protease and reverse transcriptase (RT) regions was generated and drug susceptibility level was inferred. Among 50 strains from drug-naïve subjects, 1 (2%) had intermediate-level resistance to RT inhibitors. Among 38 patients on therapy as of sampling, 28 (73.7%) had plasma viral load below detection limit (26 of whom without evidence of resistance mutations) and 11 (28.9%) harbored strains with reduced susceptibility. Only 2 strains harbored both protease and RT inhibitor mutations. Among 7 patients who were off-treatment as of sampling, 2 (28.5%) harbored strains with reduced susceptibility to RT inhibitors. The relatively high frequency of plasma viral load below detection limits among patients on treatment and the overall low prevalence of mutations associated with reduced drug susceptibility presented herein are reassuring and in accordance to previous studies that have found low rates of primary drug resistance in Brazil.

## INTRODUCTION

In Brazil standard of care highly active antiretroviral therapy (HAART) regimens are freely available to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected subjects through the national health care system since 1996, as part of a remarkable response against the epidemic.<sup>1,2</sup> Universal access to antiretroviral drugs requires an uninterrupted effort to ensure adequate adherence and continued surveillance on the prevalence of resistant strains in the community. Concerns have been raised that widespread availability of antiretroviral drugs in resource-poor settings might lead to the emergence and spread of resistant variants due to suboptimal compliance. Up to the present time, this seems not to be the case in Brazil.<sup>3</sup> When compared to figures reported from developed nations, most studies from Brazil have found relatively low rates of primary HIV-1 drug resistance,<sup>4-13</sup> even though isolated surveys recently reported worrisome rates in the port cities of Santos<sup>14</sup> and Salvador.<sup>15</sup> Also, resistance rates in Brazil are being reported from studies primarily based in large urban centers and little is known about the prevalence of resistant strains in innermost parts of the country. Since the AIDS epidemic is a growing problem in relatively small Brazilian cities,<sup>16-19</sup> where standard of care HAART combinations are also universally available, it will be essential to study the prevalence of resistance-associated mutations in such settings. To the best of our knowledge, a previous report from our group is the sole study addressing this issue that has been published to date in peer reviewed journals.<sup>8</sup>

To further expand our knowledge in this field, we present herein the results of a cross-sectional survey on the prevalence of mutations associated with antiretroviral drug resistance among patients receiving care in two small cities of inner Rio de Janeiro State, Southeast Brazil: Saquarema and Santo Antonio de Pádua. Since these cities have been assigned relatively low human development index values (<http://www.ipea.gov.br/>), the present study

is an opportunity to assess the prevalence of resistant strains and the efficacy of antiretroviral therapy in relatively underprivileged settings in Brazil with widespread access to standard of care HAART regimens.

## MATERIALS AND METHODS

Saquarema is situated 116 Km north from the city of Rio de Janeiro, in the so called Sun Coast region. Bathed by the Atlantic, Saquarema attracts thousands of domestic and foreign visitors during summer months. Santo Antonio de Pádua is situated in northwestern Rio de Janeiro State, 263 Km far from the capital, at the border of the State of Minas Gerais. As of the year 2000, these 2 cities counted 61,591 and 42,078 inhabitants and had been assigned human development index values of 0.762 and 0.754, respectively, which corresponds to positions 45<sup>th</sup> and 50<sup>th</sup> among the 92 cities of Rio de Janeiro State (<http://www.ipea.gov.br/>). The Municipal HIV/AIDS Programs of Saquarema and Santo Antonio de Pádua were established in the years 2000 and 2001, respectively. Before the establishment of these Programs, HIV-1-infected patients had to be referred for treatment elsewhere. Blood samples are regularly collected for plasma viral load (PVL) measurements and CD4 cell counts. Most patients from these cohorts attributed the acquisition of HIV-1 infection to unprotected heterosexual intercourse. A detailed clinical and epidemiological characterization is presented elsewhere.<sup>20</sup>

After signed informed consent, blood samples were collected, DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and the sequence of a single fragment of HIV-1 polymerase gene encompassing the whole protease (PR) and reverse transcriptase (RT) amino acids 1-230 was generated using a previously described in-house protocol.<sup>8</sup> All sequences generated were subjected to quality control measures to ensure there were no sample mix-ups

or contamination.<sup>21</sup> Drug susceptibility level was inferred by submitting the FASTA files of generated strains to the on-line drug resistance interpretation system available at the Stanford HIV resistance database website (<http://hivdb.stanford.edu>). The Stanford HIV database algorithm then assigns a drug resistance score for each mutation, which is translated into 5 levels of inferred antiretroviral resistance: susceptible, potential low-level, low-level, intermediate and high-level resistance. In the present report, secondary PR inhibitor mutations known to occur as natural polymorphisms are not reported, even if it is known that they may also contribute to resistance when present with other mutations. Subtyping and recombination analyses were performed by applying maximum likelihood phylogenetic reconstructions and the bootscanning method, as previously described.<sup>18</sup> The study protocol was reviewed and approved by the Ethics Review Board at Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. The nucleotide sequences of HIV-1 polymerase sequences reported in this study were deposited in the GenBank database under accession numbers DQ899698 through DQ899727 and EF042627 through EF042690.

## RESULTS

Between the years of 2004 and 2006 a total of 120 HIV-1 infected patients received care in the Municipal HIV-1/AIDS Programs of the 2 cities. Sequences generated from samples of 95 (79%) of these patients (91 adult and 4 pediatric cases) were available for phylogenetic and genotypic analyses. Seventy-seven sequences (81%) were assigned subtype B. The remaining strains were assigned subtypes F1 (8 strains; 8.4%), CRF02\_AG (2 strains; 2.1%), D (1 strain; 1%), and unique BF1 recombinants (7 strains; 7.4%).

Table 1 presents the prevalence of mutations known to confer reduced drug susceptibility in the 95 studied subjects. Fifty samples were from treatment-naïve subjects and 45 from

antiretroviral-experienced patients. Among the latter, 38 were on HAART regimens as of sampling and 7 were off-treatment due to diverse reasons such as non-compliance, transient treatment interruption due to adverse events, and previous vertical transmission prophylaxis which was withheld after delivery.

Among 50 strains recovered from drug naïve patients, we found RT inhibitor-associated mutations in 7 (14%), including 1 strain (2%) with intermediate-level resistance (06BRSQ-94), 5 strains with potential low-level resistance and 1 sequence (05BRSQ-83\_P) which harbored the V118I mutation and was considered susceptible to NRTI (Table 2).

Table 3 presents the clinical, epidemiological, and virological data of the 45 treatment-experienced patients. Among 7 patients with prior antiretroviral exposure but who were off treatment as of sampling, 2 (28.5%) harbored strains with reduced drug susceptibility. These mutations were K103N (strain 05BRSQ-21) and M184V (05BRSQ-33). Both these patients were off treatment due to non-compliance.

Among 38 patients on therapy (between 3 months and 10 years) as of sampling, 28 (73.7%) had PVL below detection limit (26 of whom without evidence of resistance mutations). Eleven (28.9%) strains had resistance-associated mutations and reduced drug susceptibility and 27 (71%) had no mutations. Eight strains (21%) had mutations in the RT gene only, 2 (5.2%) in both RT and PR, and 1 (2.6%) in PR only. Recorded mutations in the RT gene were: the nucleoside analog mutations M41L (5 strains), L210W (1), and T215Y (5), which lead to removal of NRTI already incorporated in the growing DNA chain; mutation M184V (5), which causes resistance due to sterical inhibition to NRTI; and mutations associated with NNRTI resistance, such as K103N (3), Y181C (1), Y188L (1), and G190A (2).  
Multinucleoside resistance mutations of the Q151M complex and insertions at codon 69 were

not found. Recorded primary mutations to PR inhibitors were L24I (1), D30N (1), L33F (2), I54V (1), V82A (1), and N88D (1). Genotypic patterns clearly suggestive of non-adherence or drug pharmacokinetic failure were found in at least 3 patients on treatment: strains 04BRSQ-39 and 05BRSQ-70 were recovered from patients on virologic failure, yet no resistance mutations were detected; the patient carrying sequence 05BRSQ-15 was on virologic failure besides no mutation to his current regimen was detected (Table 3). In contrast, 3 patients had PVL levels below detection limits besides the presence of mutations RT-M184V (04BRSAP01), RT-T215Y (04BRSAP07), and PR-L33F (04BRSQ-06). These 3 patients were on highly active, lopinavir-including regimens.

## DISCUSSION

The present study is the most comprehensive analysis of the prevalence of antiretroviral resistance among treatment-naïve and experienced patients followed in small Brazilian cities with universal availability of standard of care HAART regimens. Since we wished to study all patients (regardless of treatment history), including those with PVL below detection limit, we chose to perform resistance testing by targeting HIV-1 DNA from the PBMC proviral compartment, instead of the most commonly used plasma HIV-1 RNA. Although studies have found that the detection of resistance mutations in the HIV-1 RNA plasma compartment may precede that in PBMC,<sup>22,23</sup> it has been shown that HIV DNA recovered from the proviral compartment can reliably be used in drug resistance genotyping.<sup>24-28</sup> In addition, proviral sequences can be useful to detect archived mutations that can compromise future therapeutic options, such as those selected by previously used regimens,<sup>25,29</sup> and have been found to have greater sensitivity after treatment interruption in treatment experienced patients.<sup>30</sup> In fact, in this study we demonstrate the occurrence of previously selected resistance mutations in 3 patients with PVL below detection limit (04BRSAP01, 04BRSAP07, 04BRSQ-06) and 2

patients who were off-treatment as of sampling (05BRSQ-21, 05BRSQ-33). Proviral sequences also allow genotyping analysis in patients with low to undetectable PVL and may be useful in such patients when a change in the antiretroviral combination is being considered due to toxicity or when a simplified regimen is necessary.

A total of 4 group M subtypes (B, D, F1, CRF02\_AG) and several unique BF1 recombinants were uncovered in this survey. The demonstration of such a molecular diversity in these 2 small, inner cities further highlights the complexity of the HIV-1 epidemic in Brazil. An overall low prevalence of mutations conferring antiretroviral resistance was found in both treatment-naïve and experienced patients. The prediction of drug susceptibility found that 1 out of 50 (2%) strains recovered from drug-naïve subjects had intermediate-level resistance to thymidine analog RT inhibitors (with low-level resistance to abacavir, didanosine, and tenofovir). This strain (sequence 06BRSQ-94) harbored one established drug-resistance mutation (D67N) associated with 2 additional mutations at established drug-resistance positions: K70S and T215D. Mutation K70S has already been recorded under a stavudine plus didanosine combination, in a patient with previous exposure to zidovudine and lamivudine.<sup>31</sup> Mutation T215D has been described in drug-naïve subjects as a non-wild type revertant of mutations T215Y or T215F.<sup>32</sup> T215D mutation seems to emerge due to fitness advantage and is fully susceptible to NRTI, yet their presence leads to faster reappearance of resistant 215 viruses under the pressure of thymidine analogues.<sup>33,34</sup> This implies that a strain with intermediate resistance to thymidine analogs has been transmitted or that prior antiretroviral therapy was deliberately omitted.

Six additional strains from drug-naïve subjects harbored mutations known to be associated with resistance to RT inhibitors. Sequence 05BRSQ-83\_P presented mutation V118I, which occurs in around 2% of untreated subjects and has been described in treatment-naïve Brazilian



patients.<sup>5,6</sup> This strain was predicted as susceptible to RT inhibitors. Four strains (05BRSAP26, 05BRSAP28, 06BRSAP31, and 06BRSAP33) harbored the polymorphism V179D, which occurs in 3.1% of subtype B-infected drug-naïve subjects and causes potential low-level resistance to each available non-nucleoside RT inhibitors (NNRTI).<sup>35</sup> Phylogenetic analyses (data not shown) demonstrated that these 4 strains form a strong monophyletic cluster and were recovered from patients who probably took part in the same chain of viral spread. Whether this intriguing cluster from the city of Santo Antonio de Pádua represents a reservoir of a variant with natural resistance to NNRTI and with potential to spread is unknown. Strain 06BRSAP30 presented the T69N mutation, which poses potential low-level resistance to several nucleoside RT inhibitors (NRTI).<sup>36</sup> This mutation is by far the most common non-aspartic acid change at codon 69<sup>36</sup> and has also been reported from drug-naïve Brazilian patients.<sup>7</sup>

Among 38 patients who were on antiretroviral combinations as of sampling, 28 (73.7%) had PVL below detection limits (26 of whom without evidence of resistance mutations). Only 2 strains harbored resistance mutations to both RT and PR inhibitors. Although 3 strains presented a genotypic pattern suggestive of non-adherence (or drug pharmacokinetic failure), the overall figures stand for a high rate of success of antiretroviral therapy in these real-life underprivileged settings.

The present study has a number of limitations. Traditional population-based sequencing may not consistently detect minor drug-resistant variants and thus may be insensitive to strains resistant to previously used drugs and to detect decayed resistant variants transmitted to untreated subjects. A comprehensive panel of strains could only be detected by extensive clonal sequencing from a polymerase chain reaction product. As already discussed, targeting the plasma viral compartment may reveal resistant variants not yet abundant within circulating

PBMC. The overall number of studied subjects is limited, as well as the geographic span of the survey.

The relatively high frequency of plasma viral load below detection limits among patients on treatment and the overall low prevalence of mutations associated with reduced drug susceptibility presented herein are reassuring and in accordance with a previous, smaller survey carried out by our group in another small Rio de Janeiro State city<sup>8</sup>. Nevertheless, the continued widespread access to antiretroviral combinations in Brazil, including in relatively small cities from the innermost parts of the country, needs to be accompanied by an uninterrupted effort to ensure adherence and regular, comprehensive surveys on the prevalence of resistant strains in the community.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to the patients for agreeing to participate in this study. We also wish to thank the many dedicated health care professionals in Saquarema and Santo Antonio de Pádua, without whom this study could not be possible.

## REFERENCES

1. Marins JR, Jamal LF, Chen SY, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* 2003;17:1675-1682.
2. Teixeira PR, Vitoria MA, Barcarolo J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS* 2004;18 Suppl 3:S5-7.
3. Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS* 2004;18 Suppl 3:S9-13.
4. Brindeiro R, Vanderborcht B, Caride E, et al. Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1674-1680.
5. Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, et al. Prevalence of protease and reverse transcriptase drug resistance mutations over time in drug-naïve human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:3075-3079.
6. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;17:1063-1069.
7. Pires IL, Soares MA, Speranza FA, et al. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naïve, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2004;42:426-430.

8. Eyer-Silva WA, Morgado MG. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:869-873.
9. Brigido LF, Franco HM, Custodio RM, et al. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:673-682.
10. Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti AMS, Albuquerque MFPM. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101:845-849.
11. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006;116:201-207.
12. Barreto CC, Nishyia A, Araujo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1--infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:338-341.
13. Sa-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naive Brazilian blood donors. *Transfusion* 2007;47:97-102.
14. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 2007;21:116-128.

15. Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, et al. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;45:251-253.
16. Szwarcwald CL, Bastos FI, Esteves MA, de Andrade CL. The spread of the AIDS epidemic in Brazil from 1987 to 1996: a spatial analysis. *Cad Saude Publica* 2000;16:7-19.
17. Eyer-Silva WA, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG. HIV infection and AIDS in a small municipality in Southeast Brazil. *Rev Saude Publica* 2005;39:950-955.
18. Eyer-Silva WA, Morgado MG. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in a small Brazilian county: usefulness of envelope and polymerase sequences to epidemiologic studies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:664-670.
19. Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:303-308.
20. Eyer-Silva WA, Freire MAL, Gayão ML, Basilio-de-Oliveira CA, Morgado MG. Epidemiologic features of HIV infection in 3 small cities in inner Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, no prelo 2007
21. Learn GH, Jr., Korber BT, Foley B, Hahn BH, Wolinsky SM, Mullins JI. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. *J Virol* 1996;70:5720-5730.

22. Kaye S, Comber E, Tenant-Flowers M, Loveday C. The appearance of drug resistance-associated point mutations in HIV type 1 plasma RNA precedes their appearance in proviral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:1221-1225.
23. Bi X, Gatanaga H, Ida S, Tsuchiya K, Matsuoka-Aizawa S, Kimura S, Oka S. Emergence of protease inhibitor resistance-associated mutations in plasma HIV-1 precedes that in proviruses of peripheral blood mononuclear cells by more than a year. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34:1-6.
24. Devereux HL, Loveday C, Youle M, Sabin CA, Burke A, Johnson M. Substantial correlation between HIV type 1 drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells in treatment-experienced patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:1025-1030.
25. Sarmati L, Nicastrì E, Uccella I, et al. Drug-associated resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected patients for whom highly active antiretroviral therapy is failing. *J Clin Microbiol* 2003;41:1760-1762.
26. Chew CB, Potter SJ, Wang B, et al. Assessment of drug resistance mutations in plasma and peripheral blood mononuclear cells at different plasma viral loads in patients receiving HAART. *J Clin Virol* 2005;33:206-216.
27. Vicenti I, Razzolini F, Saladini F, Romano L, Zazzi M. Use of peripheral blood DNA for genotype antiretroviral resistance testing in drug-naïve HIV-infected subjects. *Clin Infect Dis* 2007;44:1657-1661.

28. Parisi SG, Boldrin C, Cruciani M, et al. Both HIV Cellular DNA and Plasma RNA Sequencing are Useful for Detection of Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Naive Patients. *J Clin Microbiol* 2007
29. Parisi SG, Mazzi R, Zazzi M, et al. HIV-proviral DNA and plasma-RNA sequencing for detection of resistance mutations in antiretroviral naive patients. Paper presented at: 3rd IAS International Conference on HIV Pathogenesis and Treatment, 2005; Rio de Janeiro.
30. Venturi G, Romano L, Carli T, et al. Divergent distribution of HIV-1 drug-resistant variants on and off antiretroviral therapy. *Antivir Ther* 2002;7:245-250.
31. Lawrence J, Schapiro J, Winters M, et al. Clinical resistance patterns and responses to two sequential protease inhibitor regimens in saquinavir and reverse transcriptase inhibitor-experienced persons. *J Infect Dis* 1999;179:1356-1364.
32. Miller V, Ait-Khaled M, Stone C, et al. HIV-1 reverse transcriptase (RT) genotype and susceptibility to RT inhibitors during abacavir monotherapy and combination therapy. *AIDS* 2000;14:163-171.
33. Garcia-Lerma JG, Nidtha S, Blumoff K, Weinstock H, Heneine W. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naive persons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13907-13912.
34. Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, et al. Risk of failure in patients with 215 HIV-1 revertants starting their first thymidine analog-containing highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2004;18:227-235.



- 35.** Rhee SY, Fessel WJ, Zolopa AR, et al. HIV-1 Protease and reverse-transcriptase mutations: correlations with antiretroviral therapy in subtype B isolates and implications for drug-resistance surveillance. *J Infect Dis* 2005;192:456-465.
- 36.** Winters MA, Merigan TC. Variants other than aspartic acid at codon 69 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene affect susceptibility to nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2276-2279.

**Table 1.** Prevalence of mutations known to confer reduced susceptibility to antiretroviral agents among 50 treatment-naïve and 45 antiretroviral-experienced HIV-1-infected patients receiving care in 2 small cities of Rio de Janeiro State, Brazil, 2004-2006.

	No.	Presence of mutations known to confer reduced susceptibility			Total
		RT only	PR only	RT + PR	
<b>Treatment-experienced patients (n=45)</b>					
Patients on HAART as of sampling	38	8 (21%)	1 (2.6%)	2 (5.2%)	11 (28.9%)
Patients off-treatment as of sampling	7	2 (28.5%)	-	-	2 (28.5%)
<b>Treatment-naïve subjects</b>	50	7 (14%)	-	-	7 (14%)
<b>Total</b>	95	17 (17.9%)	1 (1%)	2 (2.1%)	19 (20%)

**Table 2.** Clinical, epidemiological, and virological data of 7 treatment-naïve patients whose samples yielded polymerase sequences harboring mutations known to confer reduced antiretroviral susceptibility.

patient <sup>a</sup>	sex/age/ CDC	subtype	RT/ PR <sup>b</sup>	RT mutations	PR mutations
05BRSAP26	F/32/A2	B	S/S	V179D	-
05BRSAP28	F/38/C3	B	S/S	V179D	-
06BRSAP30	M/32/A1	B	S/S	T69N	-
06BRSAP31	F/23/A2	B	S/S	V179D	-
06BRSAP33	M/23/A3	B	S/S	V179D	-
05BRSQ-83_P	M/06/A2	B	S/S	V118I	-
06BRSQ-94	F/46/C3	B	<u>R</u> /S	D67N, K70S, T215D	-

<sup>a</sup> The first 2 digits indicate the year of sample collection; the suffix \_P indicates a pediatric patient.

<sup>b</sup> Prediction of drug susceptibility to RT and PR inhibitors: S (susceptible or potential low-level resistance); R (low-level, intermediate or high-level resistance to any drug).

**Table 3.** Clinical, epidemiological, virological and treatment history data of 45 antiretroviral-experienced patients.

patient <sup>a</sup>	sex/age/ CDC	drugs used on therapy <sup>b</sup>	time on therapy <sup>c</sup>	VL <sup>d</sup>	subtype	RT/ PR <sup>e</sup>	RT mutations	PR mutations
<b>Patients who were on treatment as of sampling (n=38)</b>								
04BRSAP01	F/23/C2	<u>AZT, 3TC, LPV</u>	3 mo	BDL	B	<u>R/S</u>	M184V	-
04BRSAP02	M/54/C3	AZT, DDI, IDV, RTV, NRV, <u>D4T, 3TC, NVP, LPV</u>	6 yr	<u>D</u>	B	<u>R/R</u>	M41L, Y181C	L24I, I54V, V82A
04BRSAP03	F/58/C3	DDI, IDV, <u>AZT, 3TC, EFV</u>	7 yr	BDL	B	S/S	-	-
04BRSAP04	F/30/C1	IDV, <u>AZT, 3TC, EVZ</u>	6 yr	BDL	B	S/S	-	-
04BRSAP07	F/49/C3	<u>AZT, 3TC, LPV</u>	5 mo	BDL	<u>F1</u>	<u>R/S</u>	T215Y	-
04BRSAP08	F/39/C2	AZT, DDI, NVP, RTV, IDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	10 yr	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	M41L, T215Y, K103N	-
04BRSAP13	M/36/A3	AZT, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	1.5 yr	BDL	<u>F1</u>	S/S	-	-
04BRSAP18	M/48/C3	DDI, RTV, IDV, <u>AZT, 3TC, EFV</u>	2 yr	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	M41L, M184V, T215Y, K103N, G190A	-
04BRSAP19	M/43/C3	<u>AZT, 3TC, NVP</u>	2.5 yr	BDL	<u>D</u>	S/S	-	-
05BRSAP23	M/39/A3	<u>AZT, 3TC, NRV</u>	1.5 yr	BDL	<u>BF1</u>	S/S	-	-
04BRSQ-01	M/32/A2	<u>AZT, 3TC, NVP</u>	3.5 yr	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	K103N, M184V	-
05BRSQ-05	M/42/C3	<u>AZT, 3TC, NVP</u>	3 yr	BDL	<u>F1</u>	S/S	-	-
04BRSQ-06	M/37/C3	AZT, NVP, <u>D4T, 3TC, LPV</u>	4 yr	BDL	B	<u>S/R</u>	-	L33F
04BRSQ-07	F/42/A2	<u>D4T, 3TC, EFV</u>	3.5 yr	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-14	M/44/C3	<u>D4T, 3TC, NRV</u>	4 yr	<u>D</u>	B	<u>R/R</u>	M41L, M184V, T215Y	D30N, L33F, N88D
05BRSQ-15	M/37/A2	NVP, <u>AZT, 3TC, ABC</u>	5 yr	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	G190A	-
04BRSQ-20	F/65/C3	IDV, RTV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	4 yr	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-24	M/21/C3	AZT, IDV, <u>D4T, 3TC, EFV</u>	9 yr	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	M41L, M184V, L210W, T215Y	-
04BRSQ-25	F/21/A2	<u>AZT, 3TC, NVP</u>	2.5 yr	BDL	B	S/S	-	-
06BRSQ-26	M/33/A3	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	2 yr	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-31	M/21/C2	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	3 yr	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-32	F/34/C3	<u>AZT, 3TC, LPV</u>	2 yr	BDL	B	S/S	-	-
04BRSQ-39	M/35/C2	AZT, IDV, <u>D4T, 3TC, LPV</u>	3 yr	<u>D</u>	<u>F1</u>	S/S	-	-
04BRSQ-40	M/20/C3	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	3.5 yr	<u>D</u>	B	<u>R/S</u>	Y188L	-
04BRSQ-41	F/28/A2	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	3 mo	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-42	M/50/C3	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	3 yr	BDL	<u>F1</u>	S/S	-	-
05BRSQ-43	M/39/C3	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	3 yr	BDL	B	S/S	-	-
04BRSQ-46	F/27/A2	<u>AZT, 3TC, EFV</u>	2 yr	BDL	<u>BF1</u>	S/S	-	-
04BRSQ-48	F/37/A3	<u>AZT, 3TC, LPV</u>	8 mo	BDL	B	S/S	-	-

05BRSQ-53	F/35/B3	<b><u>AZT, 3TC, NFV</u></b>	3 yr	BDL	B	S/S	-	-
04BRSQ-54	M/29/C3	<b><u>AZT, 3TC, EFV</u></b>	3 mo	BDL	<b><u>BF1</u></b>	S/S	-	-
05BRSQ-60	M/37/A2	<b><u>AZT, 3TC, EFV</u></b>	7 mo	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-65	M/38/A3	<b><u>AZT, 3TC, EFV</u></b>	6 mo	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-66	M/32/C3	EFV, <b><u>AZT, 3TC, ABC</u></b>	3.5 yr	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-67	F/32/C2	<b><u>AZT, 3TC, NVP</u></b>	2.5 yr	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-68	M/53/C2	<b><u>AZT, 3TC, EFV</u></b>	5 mo	BDL	B	S/S	-	-
05BRSQ-69	M/55/C3	<b><u>AZT, 3TC, EFV</u></b>	1 yr	BDL	<b><u>F1</u></b>	S/S	-	-
05BRSQ-70	M/40/C3	<b><u>AZT, 3TC, LPV</u></b>	1 yr	<b><u>D</u></b>	B	S/S	-	-

**Patients who were off-treatment as of sampling (n=7)**

04BRSQ-09	F/24/A2	AZT, 3TC, NVP	<b><u>VTP</u></b>	-	B	S/S	-	-
05BRSQ-21	M/41/A2	AZT, 3TC, NVP	<b><u>OFF</u></b>	-	B	<b><u>R/S</u></b>	K103N	-
06BRSQ-27	M/31/A2	AZT, 3TC, EFV	<b><u>OFF</u></b>	-	B	S/S	-	-
06BRSQ-29	F/34/A2	AZT, 3TC, NVP, LPV	<b><u>OFF</u></b>	-	B	S/S	-	-
05BRSQ-33	M/44/C3	AZT, 3TC, NFV	<b><u>OFF</u></b>	-	B	<b><u>R/S</u></b>	M184V	-
05BRSQ-36	F/25/C3	AZT, 3TC, NVP	<b><u>VTP</u></b>	-	B	S/S	-	-
05BRSQ-44	M/43/C2	AZT, 3TC, EFV	<b><u>OFF</u></b>	-	<b><u>F1</u></b>	S/S	-	-

<sup>a</sup> The first 2 digits indicate the year of sample collection.

<sup>b</sup> Drugs used as of sampling time are displayed in **boldface, underlined**. ABC (abacavir); AZT (zidovudine); DDI (didanosine); 3TC (lamivudine); D4T (stavudine). NVP (nevirapine); EFV (efavirenz); IDV (indinavir); RTV (ritonavir); NFV (nelfinavir); LPV (co-formulation of lopinavir and ritonavir).

<sup>c</sup> Time in years (**yr**) or months (**mo**) under HAART as of sampling. Also indicated are treatment naïve subjects (*naïve*), patients not on therapy as of sampling but with prior exposure to antiretroviral drugs due to vertical transmission prophylaxis (**VTP**) or who were off-therapy (**OFF**) due to diverse reasons.

<sup>d</sup> VL (HIV-1 RNA plasma viral load within 3 months of sampling: below detection limits (*BDL*) or with detectable (**D**) viral load.

<sup>e</sup> Prediction of drug susceptibility to RT and PR inhibitors: S (susceptible or potential low-level resistance); **R** (low-level, intermediate or high-level resistance to any drug).

# 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](#)