

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E
SAÚDE PÚBLICA**

LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO

**GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1
DO ESTADO DE GOIÁS**

Orientadora:

Professora Doutora Mariane Martins de Araújo Stefani

TESE DE DOUTORADO

Goiânia-GO, 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



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

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

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor(a):	LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO				
CPF:	-	E-mail:	ludimilacardoso@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não					
Vínculo Empregatício do autor		-			
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPq		
País:	Brasil	UF:	Goiás	CNPJ:	33654931/0001-36
Título:	GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1 DO ESTADO DE GOIÁS				
Palavras-chave:	GENOTIPAGEM; PACIENTES HIV-1; MUTAÇÃO; RESISTÊNCIA.				
Título em outra língua:	GENOTYPING FOR PRIMARY AND SECONDARY RESISTANCE IN HIV-1 PATIENTS FROM GOIÁS STATE				
Palavras-chave em outra língua:	GENOTYPING; HIV-1 PATIENTS; MUTATIONS; RESISTANCE.				
Área de concentração:	IMUNOLOGIA				
Data defesa: (dd/mm/aa)	04/08/09				
Programa de Pós-Graduação:	MEDICINA TROPICAL				
Orientador(a):	DRA. MARIANE MARTINS DE ARAÚJO STEFANI				
CPF:	-	E-mail:	mstefani@iptsp.ufg.br		
Co-orientador(a):	-				
CPF:	-	E-mail:	-		

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização?¹ total parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

Capítulos. Especifique: _____

Outras restrições: _____ Gostaria que não fosse divulgado os anexos.

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

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

Data: 01/12/2009

LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO

Assinatura do(a) autor(a)

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

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

LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO

**GENOTIPAGEM PARA RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E
SECUNDÁRIA EM PACIENTES INFECTADOS PELO HIV-1
DO ESTADO DE GOIÁS**

Orientadora:

Professora Doutora Mariane Martins de Araújo Stefani

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Medicina Tropical e Saúde Pública, na área de concentração em Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS do Ministério da Saúde e Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) (CSV: 310-06) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Processo: 141820/2006-3).

Goiânia-GO, 2009

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

C268g Cardoso, Ludimila Paula Vaz.
Genotipagem para resistência primária e secundária em pacientes infectados pelo HIV-1 do Estado de Goiás [manuscrito] / Ludimila Paula Vaz Cardoso. – 2009.
174 f. : il., color., tabs., figs., qds.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Mariane Martins de Araújo Stefani.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia.

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

1. Genotipagem 2. Pacientes – HIV-1 – Mutação 3. Resistência
I. Stefani, Mariane Martins de Araújo II. Universidade Federal de Goiás, **Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública** III. Título.

CDU: 616.98:578.828HIV (817.3)

*“... Seus pensamentos se transformam em suas palavras,
Suas palavras se transformam em suas ações,
Suas ações se transformam em seus hábitos,
Seus hábitos se transformam em seus valores e
Seus valores se transformam no seu próprio destino...”*

Mahatma Gandhi

A todos os pacientes portadores do vírus HIV que participaram de forma voluntária e fizeram-me acreditar que desafios existem para que sejam enfrentados, que o ser humano jamais deve desistir de lutar. Hoje, acredito que existe um propósito maior do porque estamos aqui, por isso, é que lhes dedico.

AGRADECIMENTOS

Durante todo o período do meu Doutorado, diversas pessoas contribuíram de forma direta ou indireta e a todas elas registro aqui a minha sincera gratidão;

Amada família: mãe, pai e irmãos, obrigada pelo apoio, pelo suporte financeiro constante e pela compreensão às minhas constantes ausências em reuniões familiares. Desculpem-me pelas inúmeras impaciências em função do intenso e quase imutável cansaço do cotidiano. Amo vocês e saibam que é maravilhoso tê-los ao meu lado!

Amado Guilherme, em todos os segundos de minha vida devo lhe agradecer, primeiro por me fazer feliz e depois pelo apoio incondicional nas minhas aventuras pela ciência. Obrigada por muitas vezes escutar pacientemente meus monólogos sobre Imunologia e Filogenia. Você é definitivamente o que eu tenho de melhor!

Minha querida orientadora Profa. Dra. Mariane Stefani, obrigada pela educação científica e minha eterna gratidão pela confiança depositada em mim desde o princípio, da qual, muitas vezes nem eu mesma acreditava que eu era capaz.

Ângela, minha amiga, uma amizade que o trabalho científico ajudou a construir. Serei sempre grata pelo incentivo, pela cumplicidade e pela sempre boa vontade em me ajudar. Saiba que sua presença desde o início deste trabalho fez “a” diferença. Muito obrigada por ter apresentado a mim o mundo fascinante da Biologia Molecular.

Aos meus companheiros de laboratório, Adriana, Adriano, Alexander, Ana Lúcia, Bruna, Cristhiane, Janaína, Keila, Lucas, Mônica, Natália, Regiane e Rodrigo, obrigada pelo incentivo, ajuda e amizade.

Aos colegas de outros laboratórios, Aline, Ana Cláudia, Arioldo, Bruna, Ediane, Eduardo, Fernanda, Hélio, Hermínio, Loanda, Lorena, Michelle, Rosidete, Vânia e Yanna, obrigada a todos pela amizade e boa convivência.

Demais pesquisadores do departamento de Imunologia do IPTSP, observando o exemplo de cada um de vocês e absorvendo o que cada um tem de melhor, contribuíram para dar abertura ao meu caminho acadêmico. Muito obrigada por todos os ensinamentos prestados.

Aos funcionários do IPTSP/UFV: Abigail, Almir, Antônia, Divina Helena, Fernando, José Clementino e Kariny, pela atenção e competência.

Meus expressos agradecimentos a equipe do Hospital de Doenças Tropicais/Anuar Auad pela viabilidade da pesquisa de campo e a equipe do Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas em nome do Prof. Dr. Alexandre Guedes Coelho e a doutoranda Ludmila Bandeira pela disponibilidade do uso do sequenciador.

Agradeço ao Prof. Dr. José Carlos Couto-Fernandez da Fundação Oswaldo Cruz pelo valioso treinamento em edições de sequências.

Do mesmo modo, agradeço a equipe do Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, em nome do Prof. Dr. Ricardo Diaz e particularmente à Dra. Maria Cecília Sucupira e as técnicas Érica Fusuma e Michelle Zanoni pelo treinamento em Genotipagem do HIV.

Agradeço a equipe do Laboratório de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro em nome do Prof. Dr. Amílcar Tanuri e particularmente à Dra. Angélica Martins pelo treinamento em Filogenia Molecular do HIV.

Agradeço a banca de exame de qualificação, assim como a banca de exame de defesa de tese: Prof. Dr. Marcelo Alves Soares, Prof. Dr. José Carlos Couto-Fernandez, Dr. João Alves e Profa. Dra. Gisner Pereira pelas preciosas contribuições.

Extenso meus agradecimentos aos financiadores que contribuíram imensamente para viabilização desta tese: ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por meio de bolsa de estudo e ao Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS do Ministério da Saúde e a Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) por meio de financiamento do projeto de pesquisa.

À essa trajetória soma-se imensa gratificação a todos que contribuíram e contribuem para minha formação acadêmica. Tenho consciência dos meus objetivos e há ainda muito a se fazer.

E tudo o que fui e sou está na razão desse engajamento.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: porcentagem

°C: graus Celsius

µl: microlitro

3TC: lamivudina

A: adenosina

ABC: abacavir

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

APS: persulfato de amônia

APV: amprenavir

ARV: antirretroviral

ATV: atazanavir

AZT: zidovudina

bp: pares de base, do inglês, *base pair*

cDNA: DNA complementar

CPR: ferramenta de calibração da população com resistência

CRF: forma recombinante circulante

CTA: centro de triagem anônima

d4T: estavudina

dATP: desoxiAdenina trifosfatada

dCTP: desoxiCitosina trifosfatada

ddC: zalcitabina

ddl: didanosina

dGTP: desoxiGuanina trifosfatada

DLV: delavirdina

DNA: ácido desoxiribonucléico

dNTPs: desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DRV: darunavir

DST: doenças sexualmente transmissíveis

DTT: agente redutor ditioneitol

dTTP: desoxiTimina trifosfatada
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
EFV: efavirenz
ETV: etravirina
FDA: do inglês, *Food and Drug Administration*
FPV: fosamprenavir
FTC: emtricitabina
g: força centrífuga relativa a gravidade
G: guanosinas
gp: glicoproteína
h: hora
H₂O: água
HAART: terapia ARV altamente ativa
HCl: ácido clorídrico
HIV: vírus da imunodeficiência humana, do inglês *Human Immunodeficiency Vírus*
HIV-1: vírus da imunodeficiência humana tipo 1
HIV-2: vírus da imunodeficiência humana tipo 2
HIV-BResNet: Rede Brasileira para Vigilância de Resistência a Drogas para o HIV-1
HMA: análise da mobilidade de heteroduplex
HR: região hepta repetida da gp41
IAS-USA: Sociedade internacional de Aids dos Estados Unidos da América
IC₅₀: concentração da droga necessária para inibir em 50% a replicação viral
IC₉₀: concentração da droga necessária para inibir em 90% a replicação viral
ICB-I/UFG: Instituto de Ciências Biológicas 1
IDV: indinavir
IE: inibidores de entrada
IL-2: interleucina 2
IN: integrase
Inno-LIPA HIV-1: teste de hibridização reversa do HIV-1
IP: inibidores da protease
ITR: inibidores da transcriptase reversa
jpHMM-HIV: do inglês, *Jumping Profile Hidden Markov Model program*
kb: kilobases

kD: kilodaltons

L: litro

LPV: lopinavir

LTRs: repetições terminais longas

M: metionina

M: molar

mA: miliampére

mg: miligrama

MgCl₂: cloreto de magnésio

min: minutos

ml: mililitro

mM: milimolar

mm³: milímetro cúbico

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

NFV: nelfinavir

ng/μl: nanograma/microlitro

nM: nanomolar

nm: nanômetros

NNRTI: inibidores da transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos, do inglês, *Non-Nucleoside Analogs Reverse Transcriptase Inhibitors*

NRTI: inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleosídeos e nucleotídeos, do inglês, *Nucleotide and Nucleoside Analogs Reverse Transcriptase Inhibitors*

NVP: nevirapina

OH: hidroxila

p/μl: picomolar/microlitro

pb: pares de base

PCR: reação em cadeia da polimerase

PICs: complexos de pré-integração

PR: protease

qsp: quantidade suficiente para

RENAGENO: Rede Nacional de Genotipagem do Brasil

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

rpm: rotações por minuto

RT: transcriptase reversa, do inglês, *reverse transcriptase*

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

RTV: ritonavir

seg: segundos

SIVcpz: vírus da imunodeficiência símian do chimpanzé

SQV: saquinavir

T-20: enfurvitida

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TBE: Tris-Borato-EDTA

TDF: tenofovir

TEMED: N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine

TNF: fator de necrose tumoral

TPV: tipranavir

TR: transcriptase reversa

U/ μ l: unidades/microlitro

UDI: usuários de drogas injetáveis

URF: forma recombinante única

V: valina

V: volts

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana-Estrutura e Característica Genômica.....	4
1.2 Ciclo Replicativo do HIV-1.....	7
1.3 Curso da Infecção pelo HIV-1.....	10
1.4 Diversidade Genética do HIV-1.....	13
1.5 Estratégias Terapêuticas para o Tratamento da Infecção pelo HIV-1.....	16
1.5.1 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleosídeos e Nucleotídeos.....	17
1.5.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos a Nucleosídeos.....	19
1.5.3 Inibidores da Protease.....	20
1.5.4 Inibidores da Integrase.....	21
1.5.5 Inibidores de Entrada.....	22
1.6 Resistência do HIV-1 aos Antirretrovirais.....	24
1.7 Ensaios Utilizados na Detecção de Resistência Viral.....	29
1.8 Resistência Primária aos Antirretrovirais.....	31
1.9 Resistência Secundária aos Antirretrovirais.....	37
2. JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	43

3.1 Objetivos Gerais.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4. ARTIGO 1.....	44
5. ARTIGO 2.....	65
6. MANUSCRITO 3.....	86
7. CONCLUSÕES.....	108
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
9. ANEXO - Metodologia.....	134
9.1 Extração do DNA Genômico.....	134
9.2 Extração do RNA Genômico.....	134
9.3 Síntese do DNA Complementar Através da Retrotranscrição do RNA.....	135
9.4 Amplificação Gene <i>env</i> e <i>gag</i> do HIV-1 Através da Reação em Cadeia da Polimerase em Duas Etapas (“nested”-PCR)	136
9.5 Amplificação das Cepas de Referência do Gene <i>env</i> e <i>gag</i> do HIV-1 Através de PCR.....	138
9.6 Amplificação Gene <i>pol</i> e <i>gp41</i> do HIV-1 Através da Reação de “nested”-PCR.....	138
9.7 Eletroforese em Gel de Agarose 1%.....	142
9.8 Análise da Mobilidade de Heteroduplex (HMA) dos Subtipos do Gene <i>env</i> e <i>gag</i> do HIV-1.....	143

9.9 Purificação dos Produtos Amplificados dos Genes <i>pol</i> e <i>gp41</i> do HIV-1 Obtidos Através da “nested”-PCR.....	144
9.10 Sequenciamento Automatizado dos Genes <i>pol</i> e <i>gp41</i> do HIV-1.....	145
9.11 Análise dos Cromatogramas.....	146
9.12 Análise Genética.....	147
10. ANEXO - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	150
11. ANEXO - Questionário.....	153
12. ANEXOS - Pareceres dos Comitês de Ética e Pesquisa.....	155
13. ANEXO - Financiamento do Projeto de Pesquisa.....	157

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Estrutura do HIV-1.....	5
Figura 2: Genoma do HIV-1.....	6
Figura 3. Ciclo Replicativo do HIV-1.....	7
Figura 4. Fusão do Envelope do HIV-1 e a Membrana da Célula Hospedeira.....	9
Figura 5. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleotídeos e Nucleosídeos.....	18
Figura 6. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos a Nucleosídeos.....	20
Figura 7. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Protease.....	21
Figura 8. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Integrase.....	22
Figura 9. Mecanismo de Ação dos Inibidores de Entrada.....	23
Figura 10. Principais Mutações no Gene da TR Associadas à Resistência aos Antirretrovirais.....	27
Figura 11. Principais Mutações no Gene da PR, IN e <i>env</i> Associadas à Resistência aos Antirretrovirais.....	28
Tabela 1. Antirretrovirais Disponíveis no Brasil.....	19
Tabela 2. Sequência dos <i>Primers</i> de 5' → 3' para o Gene <i>env</i> , <i>gag</i> <i>pol</i> do HIV-1.....	141

ARTIGO 1

Figure 1. Phylogenetic classification in PR and RT genes.....	61
---	----

Figure 2. Bootscanning analysis of HIV-1 <i>pol</i> sequences of 3/8 recombinant viruses from Central West Brazil.	62
Table 1. Distribution of HIV-1 subtypes by age, gender, route of infection, year of diagnosis and level of primary resistance in patients from Central West Brazil.....	63
Table 2 Amino acid substitutions in the PR and RT resistance-related codons of patients with primary resistance to antiretroviral drugs.....	64

ARTIGO 2

Figure 1. Phylogenetic classification.	82
Figure 2. Frequency of antiretroviral resistance-associated mutations.	83
Table 1. Resistance Mutations Associated To PR, RT and T-20 of MDR HIV-1 Patients.....	85

MANUSCRITO 3

Table I. Main Characteristics of HIV-1 Pregnant Women Stratified by ARV Use.....	104
Table II. Resistance Mutations Associated To PR And RT of HIV-1 Pregnant Women.....	105
Figure. 1. Phylogenetic classification in PR and RT genes.....	106
Table III. Genetic Diversity in <i>env gag</i> /PR RT Genes Among Pregnant Women.....	107

RESUMO

A resistência do HIV-1 aos antirretrovirais (ARV): inibidores da transcriptase reversa análogos a nucleosídeos e nucleotídeos (NRTI), inibidores da transcriptase reversa não análogos a nucleosídeos (NNRTI), inibidores da protease (IP) e novas classes de drogas antirretrovirais, como o enfurvitida (T-20), representa um desafio para a resposta virológica e imunológica dos pacientes HIV+/Aids. Este estudo descreve a prevalência de resistência primária e secundária do HIV-1 aos ARVs e os subtipos circulantes na região Centro-Oeste do Brasil. A diversidade filogenética do HIV-1 e as mutações de resistência foram avaliadas entre 97 pacientes virgens de tratamento, 48 pacientes em terapia ARV e 77 gestantes HIV+/Aids de Goiânia/GO. Os genes da protease (PR), parte da transcriptase reversa (TR) e da gp41 foram amplificados e sequenciados a partir do RNA plasmático. Os subtipos no gene *pol* foram avaliados através da análise filogenética e no gene *env/gag* foram identificados através da análise da mobilidade do heteroduplex (HMA). As mutações de resistência aos ARVs foram analisadas através do banco de dados da Universidade de Stanford, da Sociedade Internacional de Aids, de Los Alamos e outras fontes. Entre os pacientes virgens de tratamento, a prevalência de resistência primária variou de 8-10%: IP (n=2), NRTI (n=3), NRTI (n=1), IP+NRTI (n=1) e NRTI+NNRTI (n=3). O subtipo B representou 82,5%, o subtipo F1 6,2%, o subtipo C 3,1%, o mosaico B^{PR}/F1^{RT} 7,2% e uma amostra apresentou o mosaico F1^{PR}/CB^{RT}. Entre os pacientes em terapia ARV, a prevalência de resistência secundária foi de 79%: NRTI (n=1), NNRTI (n=1), IP+NRTI or NRTI+NNRTI (n=20), IP+NRTI+NNRTI (n=16, considerados multiresistentes-MDR). No gene *pol* do HIV-1, o subtipo B representou 79,2%, o subtipo F1 4,2%, o subtipo C 2,1%, o mosaico F1^{PR}/B^{RT} 8,3% e o mosaico B^{PR}/F1^{RT} 6,3%. Entre os pacientes MDR, foram identificados o mosaico F1^{PR}/B^{RT}/F1^{ENV} (n=1) e o subtipo B^{PR}/B^{RT}/B^{ENV} (n=13). As mutações de resistência ao T-20, G36E, N42T e N43S, foram observadas em 3 pacientes MDR. No grupo das gestantes, nenhuma apresentou mutação de resistência primária. Entre 42 gestantes em tratamento ARV, 16,7% apresentaram isolados do HIV-1 com mutações de resistência aos ARVs: NRTI (n=2), NRTI+NNRTI (n=2), IP+NRTI (n=2) e IP+NRTI+NNRTI (n=1). Em relação aos subtipos do HIV-1 nos genes *env gag/PR TR*, 66,2% foram do subtipo B, 3,9% subtipo C e 6,5% subtipo F1. Os dados desse estudo do Centro-Oeste do Brasil mostram grande diversidade genética com significativa proporção de recombinantes BF1 e a co-circulação de subtipos B, F1 e C. Além disso, esses dados mostram que pacientes virgens de tratamento e em terapia ARV, incluindo gestantes, podem se beneficiar da genotipagem do HIV-1 para resistência aos ARVs, para melhorar a conduta clínica e a terapia de resgate, que também são importantes para o controle da transmissão do HIV-1.

ABSTRACT

HIV-1 resistance to antiretroviral (ARV): nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI), protease inhibitors (PI) and new ARV classes, like enfurvitide (T-20), represents a challenge for sustainable virological and immunologic responses. This study describes the prevalence of primary and secondary HIV-1 drug resistance and subtypes circulating in Central West Brazil. HIV-1 phylogenetic diversity and ARV resistance mutations were assessed among 97 ARV naïve patients, 48 ARV experienced patients and 77 HIV-1 pregnant women from Goiânia/GO. Protease (PR), partial reverse transcriptase (RT) and gp41 genes were amplified and sequenced from plasma RNA. HIV-1 *pol* subtypes were assigned by phylogenetic analysis and *env/gag* subtypes were identified by heteroduplex mobility analysis (HMA). ARV resistance mutations were analyzed by Stanford University Database, Internacional AIDS Society, Los Alamos Database and other sources. Among ARV naïve patients, primary drug resistance ranged from 8-10%. IP (n=2), NRTI (n=3), NRTI (n=1), IP+NRTI (n=1) e NRTI+NNRTI (n=3). Subtype B represented 82.5%, subtype F1 6.2%, subtype C 3.1%, B^{PR}/F1^{RT} 7.2% and one sample was F1^{PR}/CB^{RT} mosaic. Among ARV experienced patients, secondary drug resistance was 79%: NRTI (n=1), NNRTI (n=1), PI+NRTI or NRTI+NNRTI (n=20), PI+NRTI+NNRTI (n=16, considered multidrug resistant-MDR). In the HIV-1 *pol* gene, subtype B represented 79.2%, subtype F1 4.2%, subtype C 2.1%, F1^{PR}/B^{RT} 8.3% and B^{PR}/F1^{RT} 6.3%. Among MDR patients, the mosaic F1^{PR}/B^{RT}/F1^{ENV} (n=1) and subtype B^{PR}/B^{RT}/B^{ENV} (n=13) were identified. G36E, N42T and N43S T-20 resistance mutations were observed in 3 MDR patients. In the group of pregnant women, none had primary drug resistance mutations. Among 42 ARV experienced pregnant women, 16.7% presented HIV-1 isolates with drug resistance mutations: NRTI (n=2), NRTI + NNRTI (n=2), PI + NTRI (n=2) and PI+NRTI+NNRTI (n=1). Regarding HIV-1 subtypes in *env gag/PR RT* genes, 66.2% were subtype B, 3.9% subtype C and 6.5% subtype F1. This data from Central West Brazil show extensive genetic diversity with a significant proportion of distinct BF1 recombinants and the co-circulation of subtypes B, F1 and C. Moreover this data show that ARV naïve and ARV experienced patients, including pregnant women, can benefit from genotyping for ARV drug resistance, to improve clinical management and salvage therapy, which are also important to control HIV-1 transmission.

APRESENTAÇÃO

Meu interesse pela ciência despertou-se cedo, logo durante o ensino fundamental, através das aulas de ciências. Em seguida, no ensino médio, a grande afinidade com a área da biologia humana influenciou a minha escolha pelo curso de graduação em Biomedicina.

Em 1999, entrei na faculdade para o curso de Biomedicina na Universidade Católica de Goiás (UCG/GO), mas somente em 2002, ao iniciar o 5º período do curso, uma disciplina intrigante e fascinante me chamou a atenção: a Imunologia.

No outro ano, procurei me informar sobre laboratórios de pesquisas na área de Imunologia e então, iniciei um estágio no Laboratório de Citocinas e Imunologia das Leishmanioses do Prof. Dr. Milton Oliveira do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG). A princípio, fui integrada ao projeto de pesquisa “Interações entre Leishmania e Células da Linhagem Mielóide Relacionadas com a Produção de IL-12”. No ano de 2004, já com o curso superior concluído, iniciei o Mestrado com orientação do Prof. Dr. Milton Oliveira e co-orientação da Profa. Dra. Glória Lima, da Universidade de São Paulo (USP/SP) e bolsa financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

No começo do ano de 2006, com o Mestrado já concluído, enquanto dava aulas como professora substituta em Imunologia no IPTSP/UFG preocupava-me em fazer Doutorado. Dada a concepção de que a vida acadêmica é de fato a minha prática, não poderia deixar de desenvolver a pesquisa, em nível de Doutorado, objetivando acrescentar novos conhecimentos à formação de professor. Passei por momentos de dúvidas e hesitações, quanto à definição da pesquisa a ser desenvolvida por mim. Entretanto, a proposta de orientação da Profa. Dra. Mariane Stefani para trabalhar com

o projeto “Genotipagem do HIV-1 para Resistência a Antirretrovirais” e colaboração em projetos de pesquisa envolvendo hanseníase, superavam as minhas expectativas. No segundo semestre de 2006, iniciei o Doutorado com bolsa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Durante esse tempo, realizei treinamentos nos renomados laboratórios de pesquisa em HIV: Laboratório de Retrovirologia do Prof. Dr. Ricardo Dias da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/SP) e Laboratório de Genética do Prof. Dr. Amilcar Tanuri da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/RJ).

Portanto, este trabalho de conclusão de Doutorado apresentado em formato de artigos e manuscrito científicos, constitui uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase que investiga a diversidade genética do HIV-1 e mutações associadas à resistência primária e secundária aos antirretrovirais em pacientes da região Centro-Oeste do Brasil. A primeira parte do trabalho inclui uma revisão da literatura sobre a prevalência de resistência primária e secundária do HIV-1 aos antirretrovirais no Brasil.

O artigo 1 descreve a diversidade filogenética do HIV-1, o perfil e a prevalência de mutações de resistência primária aos antirretrovirais. Este estudo foi baseado em análise de sequências gênicas da protease e da transcriptase reversa do HIV-1 de pacientes virgens de tratamento recrutados no Hospital de Doenças Tropicais/Anuar Auad em Goiânia/Goiás.

O artigo 2 descreve o perfil e a prevalência de mutações de resistência secundária aos antirretrovirais baseada em análise de sequências gênicas da protease e transcriptase reversa do HIV-1. O grupo de estudo foi constituído de pacientes sob terapia antirretroviral recrutados no Hospital de Doenças Tropicais/Anuar Auad em Goiânia/Goiás. Entre pacientes com isolados do HIV-1 multiresistentes foi sequenciado

a gp41 no gene do envelope viral, para avaliar a presença de mutações associadas à resistência ao inibidor de fusão, enfurvitida (T-20).

O manuscrito 3 descreve o perfil e a prevalência de mutações de resistência primária e secundária aos antirretrovirais baseada em análise de sequências gênicas da protease e transcriptase reversa do HIV-1 de gestantes recrutadas no Hospital Materno Infantil em Goiânia/Goiás.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana - Estrutura e Característica Genômica

O vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV), um retrovírus da família *Retroviridae* do gênero *Lentivirus* é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*, aids) (Barré-Sinoussi et al. 1983).

Existem dois tipos de HIV: o HIV-1 e o HIV-2. Essa distinção é feita em função de diferenças na organização do genoma e nas suas relações filogenéticas com outros lentivírus de primatas. O HIV-1 é o responsável pela pandemia de HIV e foi identificado em 1983 em um paciente que apresentava linfadenopatia generalizada (Barré-Sinoussi et al. 1983, Gallo et al. 1983). O HIV-2 foi identificado no oeste da África onde se concentram os casos e, esporadicamente descrito em outras regiões como Portugal, Índia, Coréia e Filipinas (Hu et al. 1996). Apesar dos dois tipos de HIV apresentarem as mesmas vias de transmissão, ambos possuem potenciais patogênicos diferentes. O HIV-1 mantém níveis maiores de viremia e mostra maiores taxas de transmissão que o HIV-2. O HIV-2 apresenta progressão mais lenta para aids (Marlink et al. 1994).

A estrutura de uma partícula viral madura do HIV-1 (vírion) tem formato esférico de 100 a 120 nanômetros (nm) de diâmetro e é composta por um envelope viral constituído de bicamada lipídica derivada da membrana da célula hospedeira (Figura 1). O envelope viral apresenta um complexo de proteínas tetraméricas constituído de duas subunidades associadas não covalentemente: a glicoproteína (gp) de 120 kilodaltons (kD) denominada gp120, que é uma proteína de envelope viral externa e a gp41, uma proteína de envelope viral transmembrânica. Internamente ao envelope,

encontram-se a proteína matriz, p17 e o capsídeo viral composto pela proteína p24. O nucleocapsídeo é composto pelas proteínas p7/p9, o genoma diplóide de duas fitas simples de ácido ribonucléico (RNAs) idênticas e três enzimas virais: protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN) (Barré-Sinoussi 1996, Wyatt et al. 1998).

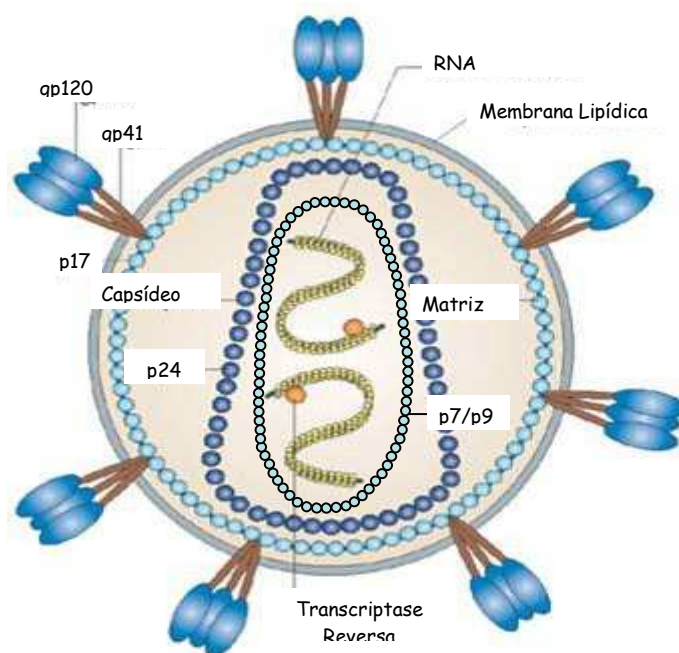


Figura 1. Estrutura do HIV-1.
(Adaptada de Karlsson et al. 2008).

O genoma do HIV-1 tem 9,2 kilobases (kb) de comprimento e é constituído de 3 genes estruturais (*env*, *gag* e *pol*), 2 genes reguladores (*tat* e *rev*) e 4 genes acessórios (*nef*, *vif*, *vpu* e *vpr*) (Barré-Sinoussi 1996) (Figura 2). Repetições terminais longas (LTRs) se localizam em cada extremidade do genoma e regulam a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, a expressão de genes virais e sua replicação. O gene *gag* codifica a proteína matriz (p17), a proteína principal do capsídeo (p24) e as proteínas do nucleocapsídeo (p7/p9). As enzimas PR (p10), TR (p51) e a IN (p32) são

codificadas pelo gene *pol*. E as proteínas do envelope viral, gp120 e gp41, são codificadas pelo gene *env* (Peng et al. 1989).

As proteínas reguladoras e acessórias do vírus HIV-1 possuem diferentes funções na replicação viral. A proteína *tat* regula positivamente a transcrição do promotor viral na região U3 das LTRs através de sua associação aos RNAs recém-transcritos. A proteína *rev* promove a saída de RNAs mensageiros (RNAm), processados ou não, do núcleo para o citoplasma para tradução de novas proteínas de *env*, *gag* e *pol*. Na ausência do gene *rev* nenhuma proteína estrutural pode ser codificada. A proteína *nef* está envolvida na replicação do HIV-1 *in vivo*. As proteínas *tat*, *rev* e *nef* não são incorporadas dentro das partículas virais, mas, são os primeiros componentes a serem produzidos pelo processamento do RNAm (Rosen et al. 1990, Barré-Sinoussi 1996). As proteínas *vif* e *vpu* estão envolvidas na infectividade dos vírions em células não infectadas e na liberação de vírions de células infectadas. A proteína *vpr* influencia a replicação viral em células que não estão em divisão (Lake et al. 2003).

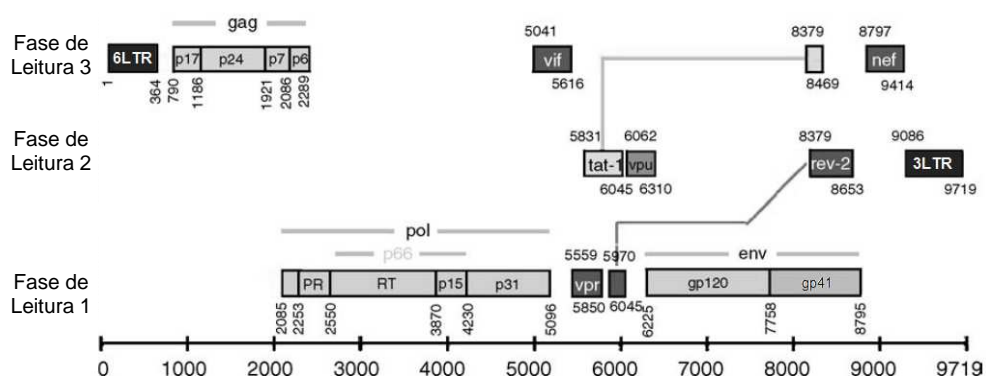


Figura 2. Genoma do HIV-1.

(Adaptada de Sierra et al. 2005)

1.2 Ciclo Replicativo do HIV-1

A entrada do vírus HIV-1 na célula do hospedeiro ocorre pela interação de domínios variáveis da gp120 à molécula CD4, que é o receptor primário e está presente em macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. Essa interação promove modificações conformacionais na molécula da gp120 que expõe novos sítios de ligação aos receptores de quimiocinas, que são considerados receptores secundários ou co-receptores (Figura 3).

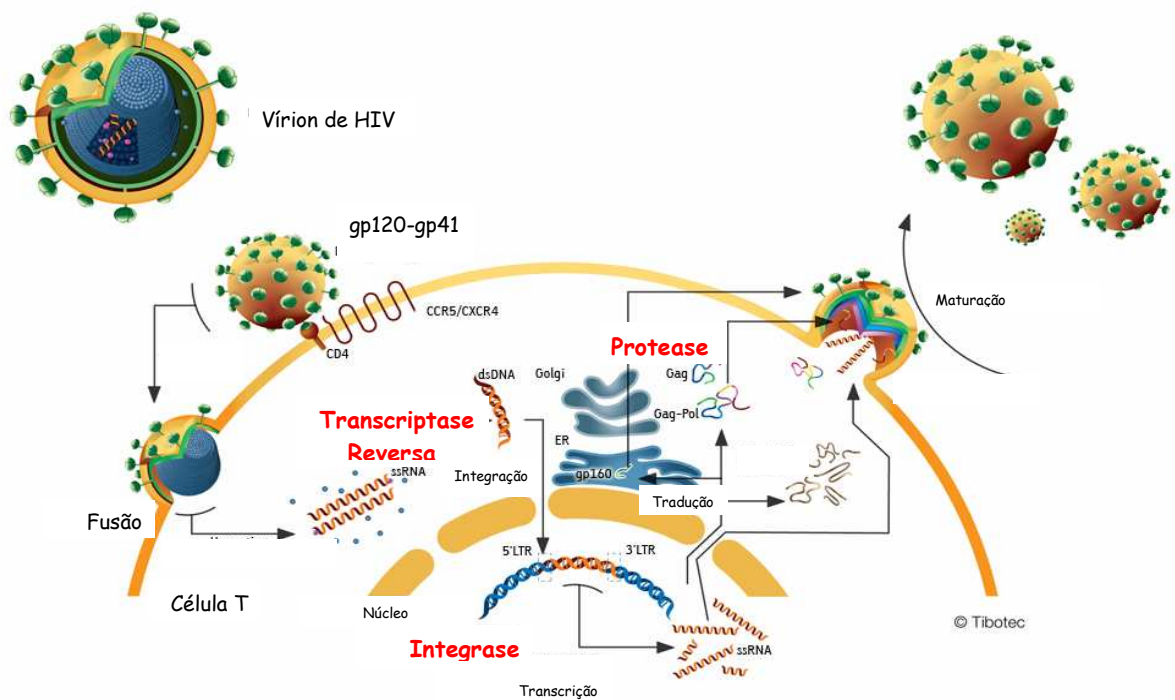


Figura 3. Ciclo Replicativo do HIV-1.

(Adaptada de www.tibotec.com)

Vários co-receptores para o HIV-1 foram descritos e os mais importantes são o CCR5 e o CXCR4. O co-receptor CCR5 está presente em macrófagos e células

dendríticas e o co-receptor CXCR4 é expresso em linfócitos T CD4⁺. O vírus determina a escolha do co-receptor celular, sendo este o evento denominado de tropismo viral. O vírus monotrópico utiliza um único co-receptor para infectar uma célula, ou seja, ou o co-receptor CCR5, conhecido como vírus R5-trópicos ou o co-receptor CXCR4, conhecido como vírus X4-trópicos. Existem também linhagens virais duotrópicas que utilizam simultaneamente os dois receptores (Berger et al. 1999). Na maioria das vezes, em estágios iniciais da infecção, predominam vírus R5-trópicos e em estágios finais da infecção acontece mudança de tropismo e conseqüentemente do co-receptor, com predomínio de vírus X4-trópicos (Busch et al. 1997). Por serem indutores de sincício, diferentemente dos vírus R5-trópicos, os vírus X4-trópicos são mais patogênicos *in vitro*. Essa mudança de tropismo viral coincide com sintomas de aids e pode indicar mau prognóstico e progressão rápida da doença, caracterizada por redução significativa de linfócitos T CD4⁺ (Doms & Peiper et al. 1997, Zhang et al. 1998).

Após a interação dos sítios de ligação da gp120 aos co-receptores, ocorre formação de um complexo intermediário que promove o deslocamento da gp120 e da gp41, seguindo uma série de mudanças conformacionais na gp41, que resulta na exposição da sua região hidrofóbica amino-terminal, rica em glicina, conhecida como peptídeos de fusão (Figura 4). Os peptídeos de fusão inserem-se na bicamada lipídica da célula do hospedeiro e em seguida forma-se um complexo de seis α -hélices do tipo *coiled-coil* ("bobina enrolada") das regiões hepta repetidas da gp41, conhecidas como HR1 e HR2. O emparelhamento da HR1 com a HR2 gera uma forma retrátil da gp41, que promove aproximação e contato entre a membrana celular e a viral, formação de poros de fusão e liberação do capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira (Chan et al. 1998, Broder 1999).

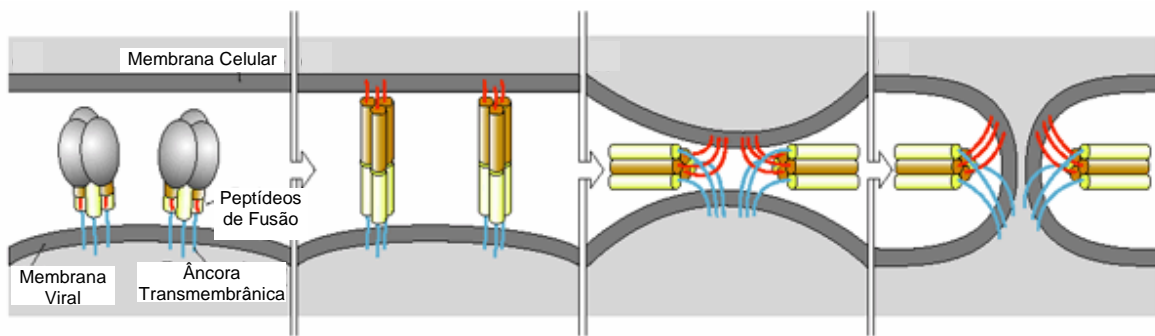


Figura 4. Fusão do Envelope do HIV-1 e a Membrana da Célula Hospedeira.
(Adaptada de www.uhawebsite.hartford.edu)

Nesta etapa ocorre ativação da enzima TR viral responsável pela transcrição do RNA viral em DNA complementar (cDNA) gerando inicialmente um híbrido RNA-DNA. Em seguida, o cDNA é duplicado e transportado para o núcleo a partir de complexos de pré-integração (PICs), quando então a enzima IN promove a integração estável do cDNA viral no genoma da célula hospedeira. O genoma viral integrado ao genoma da célula hospedeira é denominado “provirus”. O DNA proviral integrado ao genoma da célula servirá de molde para a geração de RNA genômicos e mensageiros quando a célula infectada for ativada e começar a transcrever seus próprios genes (Barré-Sinoussi 1996, Frankel et al. 1998).

A transcrição do gene do HIV-1 é realizada através da RNA polimerase celular, contudo, sua expressão é dependente do estado de ativação da célula infectada. A célula infectada pode ser ativada por antígenos ou citocinas, como por exemplo, a fitohemaglutinina (mitógeno), a interleucina 2 (IL-2), o fator de necrose tumoral (TNF) e a linfotóxina que, estimulam a transcrição de genes do HIV-1 (Freed 2001). Entretanto, poucas moléculas de RNAm são realmente sintetizadas, pois o complexo da polimerase geralmente cessa antes do RNAm ser completado. As RNA polimerases são geralmente incapazes de transcrever sequências maiores que algumas centenas de

nucleotídeos. Desse modo, a proteína viral *tat* liga-se ao RNAm incipiente e aumenta a capacidade de processamento da RNA polimerase em centenas de vezes, o que permite que a transcrição se complete para a produção de um RNAm viral funcional. A expressão dos genes virais pode ser dividida em um estágio inicial, cujo produto precoce são os genes reguladores e acessórios (*rev*, *tat* e *nef*) e um estágio final, quando os genes estruturais (*env*, *gag* e *pol*) são expressos e os genomas virais são acumulados. A proteína *rev* é a responsável por promover a mudança da expressão do gene de inicial para final (Antoni et al. 1994, Swanson et al. 2004).

O produto do gene *pol* é uma proteína precursora, sequencialmente clivada para formar as enzimas TR, PR e IN. O gene *gag* codifica uma proteína de 55 kD que é proteoliticamente clivada em polipeptídeos p24, p17 e p15 pela ação da PR viral. O produto primário do gene *env* é a gp160 clivada por uma protease celular dentro do retículo endoplasmático gerando as proteínas gp120 e gp41. A formação de novos vírions ocorre através do empacotamento das proteínas funcionais e do RNA viral. Em seguida, ocorre liberação dos vírions por brotamento a partir da membrana plasmática da célula infectada. Assim, milhares de novas partículas virais liberadas são capazes de infectar outras células, dando continuidade ao ciclo infeccioso (Barré-Sinoussi 1996, Freed 2001).

1.3 Curso da Infecção pelo HIV-1

A infecção pelo HIV-1 apresenta uma fase inicial chamada de síndrome da infecção retroviral aguda ou infecção primária, geralmente assintomática ou oligossintomática e com maciça replicação viral. Em alguns casos, a síndrome aguda do HIV-1 pode ser acompanhada de uma síndrome viral inespecífica, que inclui vários

sinais e sintomas autolimitados, que desaparecem em média em 12 dias. Entretanto, sinais e sintomas clínicos mais exuberantes podem se manifestar, caracterizados por febre, astenia, exantema máculo-papular, linfadenopatia, fotofobia e odinofagia (Kahn et al. 1998, Pope & Haase 2003).

Nesta fase inicial da infecção dependendo do sítio de exposição ao vírus, linfócitos T CD4⁺ e monócitos sanguíneos ou linfócitos T CD4⁺ e macrófagos de mucosa são as primeiras células infectadas. Em sítios de penetração do vírus, as células dendríticas no epitélio capturam os vírus e migram para os linfonodos drenantes promovendo a disseminação inicial do HIV-1 para os tecidos linfóides (Piguet & Blauvelt 2002).

À medida que a infecção avança, o sistema imunológico adaptativo monta respostas imunológicas do tipo humoral e celular, dirigidas contra os antígenos virais. Essas respostas controlam parcialmente a infecção e a produção viral. Esse controle é refletido por uma queda expressiva da viremia após a fase aguda e ativação da resposta imune quando a viremia atinge um patamar bastante variável, de paciente para paciente, mas, ainda assim, é detectável em período de 12 semanas após a exposição primária (Moss et al. 1989, Borrow et al. 1994).

Níveis mais baixos de carga viral atingido logo após o período inicial de infecção têm grande valor prognóstico quanto à evolução para a doença sintomática. Esse dado tem motivado alguns pesquisadores a preconizarem o tratamento antirretroviral (ARV) já na fase aguda de infecção. Nessa fase, como a resposta imune específica contra o HIV-1, ou seja, o repertório de linfócitos T CD4⁺ encontra-se preservado, o tratamento precoce diminuiria o risco de imunossupressão (Schacker et al. 2000). Porém, não se conhece em longo prazo qual seria o impacto do tratamento na fase aguda da infecção pelo HIV-1 (Smith et al. 2004).

Durante a fase assintomática da infecção, o sistema imune permanece competente para lidar com a maioria das infecções, e conseqüentemente pouca ou nenhuma manifestação clínica da infecção pelo HIV-1 é observada. Assim, essa fase da doença é chamada de fase de latência clínica do HIV-1 (Geskus et al. 2007). Durante esse período, que pode durar de 2 a 10 anos, a replicação viral é mantida nos órgãos linfóides. Entretanto, apesar da ausência de sintomas durante essa fase, ocorre destruição lenta e gradativa de linfócitos T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas (Pantaleo et al. 1993, Brenchley et al. 2006).

Ao final do período de latência clínica, além do ciclo contínuo de infecção e do declínio constante no número de linfócitos T CD4⁺ nos tecidos linfóides surgem danos nas mucosas, principalmente da superfície da mucosa gastrointestinal (Nowak et al. 1997, Kahn et al. 1998, Pope et al. 2003). Conseqüentemente, a microbiota intestinal pode translocar-se do lúmen intestinal para outros órgãos, caracterizando a translocação microbiana. A translocação microbiana estimula a ativação do sistema imune e pode indicar a progressão da doença (Brenchley et al. 2006). Na ausência de tratamento, a replicação viral pode acelerar, a contagem de linfócitos T CD4⁺ pode cair abaixo de 200 células/mm³ e manifestações clínicas devido às infecções oportunistas também podem aparecer. Nesse momento, a doença evolui para a fase sintomática, a aids, e em pacientes imunossuprimidos a taxa de destruição do sistema imune e o grau de imunodeficiência podem provocar a morte na ausência de terapia ARV (Margolick et al. 1998, Simon et al. 2006).

O prognóstico da doença e a indicação de início de terapia ARV podem ser monitorados e estimados mediante contagem de linfócitos T CD4⁺ e quantificação da carga viral plasmática do HIV-1 (Mellors et al. 1997).

1.4 Diversidade Genética do HIV-1

Uma das características mais marcantes do HIV-1 é o seu extraordinário polimorfismo genético. Tal polimorfismo tem sido atribuído à alta taxa de erros de incorporações de nucleotídeos da TR viral que leva a substituições, deleções e inserções no momento da transcrição do RNA em cDNA. Como nessa etapa não existem mecanismos que promovam a correção da leitura durante o processo de replicação viral, essas alterações levam à produção de vírus com mutações. Algumas dessas mutações podem gerar vírus com proteínas não funcionais, no entanto, outras podem gerar vírus com mutações que lhes permitam escapar da resposta do sistema imune, podendo até conferir resistência aos medicamentos (Pulsinelli et al. 1991).

Um segundo fator importante para diversidade viral é o rápido *turnover* do vírus *in vivo*: na ordem de 10^{10} vírions produzidos por dia e uma alta taxa replicativa de aproximadamente 300 ciclos por ano (Bebenek et al. 1989, Roberts et al. 1989).

Uma terceira causa de diversidade é o fato da interação entre a enzima TR e a fita molde de RNA ser de baixa afinidade, possibilitando a enzima TR “saltar” de uma fita de RNA para outra gerando uma fita complementar com alterações e conseqüentemente vírus recombinantes. Sendo assim, a recombinação viral pode ocorrer quando dois ou mais subtipos genéticos do HIV-1 iguais ou diferentes infectam simultaneamente a mesma célula. Quando a TR “salta” entre os diferentes transcritos de RNA e faz a leitura nas duas fitas, gera uma nova sequência de DNA proviral recombinante entre os dois genomas (Goodrich et al. 1990, Hu et al. 1990, Stuhlmann et al. 1992).

A alta frequência de recombinação gênica, juntamente com a alta taxa de mutação da TR do HIV-1 resultam em uma população com inúmeras variantes virais

mutantes não idênticas, mas proximamente relacionadas. Essas variantes virais em contínua mutação genética, competição e seleção são denominadas *quasispecies* (Goodenow 1989, Domingo et al. 1998).

Desta forma, variantes virais com mutações podem ser selecionadas e escapam dos efeitos neutralizantes dos anticorpos e das drogas antivirais disponíveis (Coffin 1992). À essa variabilidade genética foi estabelecido um sistema de classificação do HIV-1 que o divide em grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) (Robertson et al. 2000).

O HIV-1 é classificado em três grupos filogenéticos principais, de acordo com a sequência de nucleotídeos: o grupo M (*major*), o grupo O (*outlier*) e o grupo N (*new* ou *non-M/non-O*). O grupo M é o mais prevalente no mundo e é subdividido em nove subtipos virais: A, B, C, D, F, G, H, J e K, e quatro sub-subtipos do subtipo A: A1, A2, A3 e A4 e dois sub-subtipos do subtipo F: F1 e F2, todos originados na África Central (Thomson et al. 2002, Meloni et al. 2004, Vidal et al. 2006). O grupo O do HIV-1 tem uma maior prevalência na África Central e casos isolados na Europa e Américas foram descritos. O grupo N do HIV-1 é restrito ao centro oeste africano (Robertson et al. 2000, Thomson et al. 2002).

A diversidade genética de aminoácidos do gene *env* entre os subtipos do grupo M varia de 25 a 35%, enquanto que, do gene *gag* é em torno de 15% (Thompson et al. 2002). A região *pol* é duas a três vezes mais conservada que *env*, pois, codifica as enzimas do HIV-1, que são críticas no ciclo replicativo e, portanto mutações nesta região podem gerar vírus não funcionais (Spira 2003).

Em pacientes co-infectados simultaneamente ou subsequentemente, dois vírions de diferentes subtipos podem infectar uma mesma célula. Os eventos de recombinação entre os diferentes subtipos têm contribuído de forma significativa para o aumento da

diversidade viral. Durante os eventos de recombinação, a TR realiza a troca da fita molde para leitura, resultando em um mosaico genômico de dois ou mais subtipos, que podem constituir CRFs e ou URFs.

Para nomear uma forma híbrida como uma CRF é preciso demonstrar sequências idênticas no genoma completo viral (*Full-length*) de dois indivíduos sem vínculo epidemiológico e em um terceiro indivíduo com sequenciamento do genoma quase completo (*Near Full-length*) desde que os 3 indivíduos não apresentem vínculo epidemiológico. As CRFs são designadas por um número, segundo a sua ordem de isolamento, seguido do nome dos subtipos parentais. Até o momento, 43 CRFs do HIV-1 foram reconhecidas. Quando o HIV-1 recombinante envolve mais de três subtipos genéticos distintos, a CRF recebe a denominação *cpx* (complexa) (Robertson et al. 2000, Nájera et al. 2002; Los Alamos 2008). Dentro da categoria das URFs encontram-se as cepas de vírus recombinantes que não constituem classe ou grupo filogenético definidos, identificados em apenas um indivíduo ou em um grupo de indivíduos com vínculo epidemiológico (Robertson et al. 2000, Thompson et al. 2002).

Em escala global, as formas genéticas mais prevalentes do HIV-1 são o subtipo C, responsável por mais de 50% das infecções, o subtipo A e CFR02_AG (17%), que ocorrem principalmente nas regiões oeste e centro-oeste da África. O subtipo B representa 10% dos casos e é prevalente em países da América do Norte, América Latina e Europa (Requejo 2006, Hemelaar et al. 2006).

Em geral, no Brasil, resultados dos estudos sobre a diversidade genética do HIV-1 mostram predomínio do subtipo B, seguido do subtipo F1 e subtipo C além da presença de recombinantes B/F e B/C (Brindeiro et al. 2003, Soares et al. 2003, Brígido et al. 2005, Sá-Filho et al. 2005, Sá-Filho et al. 2006, Stefani et al. 2007, Guimarães et al. 2008). Na região sudeste, onde concentra a epidemia de aids no Brasil, o subtipo B

é o mais prevalente, seguido de recombinantes B/F e casos isolados do subtipo A e subtipo D (Guimarães et al. 2001, Guimarães et al. 2002, Sá-Filho et al. 2005, Couto-Fernandez et al. 2006, Sá-Filho et al. 2006, Sanabani et al. 2006). Na região sul, o subtipo C do HIV-1 é o mais prevalente, diferindo das outras regiões geográficas do país, seguido dos subtipos B, subtipo F e o recombinante B/C (Soares et al. 2003, Soares et al. 2005, Santos et al. 2007). Na região norte e nordeste, o subtipo B é o mais prevalente seguido do subtipo F (Vicente et al. 2000, Gadelha et al. 2003, Medeiros et al. 2006, Cavalcanti et al. 2007). Na região centro-oeste, o subtipo B é o mais prevalente, seguido do subtipo F, C e recombinante B/F (Cerqueira et al. 2004a, Cerqueira et al. 2004b, Pereira et al. 2004, Pereira et al. 2006, Stefani et al. 2007).

Essa alta diversidade na distribuição dos subtipos do HIV-1 reforça a importância de constantes pesquisas para o monitoramento da diversidade e disseminação do vírus em diferentes regiões do mundo. Esse entendimento pode auxiliar ações de controle da epidemia e de tomada de decisões de políticas de saúde pública em relação à prevenção e tratamento da infecção.

1.5 Estratégias Terapêuticas para o Tratamento da Infecção pelo HIV-1

O tratamento da infecção pelo HIV-1 mediante uso de ARVs tem como objetivos a redução da carga viral para prolongar a sobrevivência dos pacientes sem o surgimento de doenças oportunistas relacionadas a aids e a redução da transmissão do HIV (Detels et al. 1998).

O Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a constituir um programa governamental de controle do HIV/aids com acesso gratuito a ARV. Em novembro de 1996, o governo brasileiro publicou a lei nº 9.313 que garantiu acesso universal à

terapia ARV para todos os cidadãos brasileiros com aids e que tenham indicação de recebê-lo, conforme as recomendações terapêuticas vigentes no Brasil (Brasil 2008).

A maioria das drogas ARVs em uso para o tratamento da infecção pelo HIV tem como alvos as enzimas TR e PR, codificadas pelo gene *pol*, que agem impedindo etapas chave do ciclo replicativo, tais como a produção do cDNA e a maturação viral, respectivamente. A pesquisa de novos medicamentos para o tratamento ARV tem resultado em drogas ARV contra alvos que interferem em diferentes etapas do ciclo replicativo do HIV. Dentre eles, são os inibidores de entrada (IE) e os inibidores da IN. Várias outras drogas estão em constante desenvolvimento, não só devido ao surgimento de resistência as drogas atuais, mas também a procura de uma melhor qualidade de vida para os indivíduos infectados pelo HIV.

1.5.1 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleosídeos e Nucleotídeos

Os inibidores da TR (ITR) análogos a nucleosídeos e nucleotídeos (*Nucleotide and Nucleoside Analogs Reverse Transcriptase Inhibitors*, NRTI) são inibidores competitivos da enzima TR. Esses inibidores competem com os nucleosídeos fisiológicos (adenosina, citosina, timidina e guanosina), atuando como substratos alternativos ou “falsos blocos”. Esses diferem dos nucleosídeos fisiológicos em uma simples alteração na molécula de açúcar, ou seja, carecem do grupo hidroxila (OH) no carbono 3 do açúcar. Os análogos a nucleosídeos são endocitados, fosforilados em derivados trifosfatos (3 etapas de fosforilação) e desse modo, convertem-se em metabólicos ativos. Como as pontes de fosfodiésteres não podem ser formadas para

estabilizar a dupla cadeia de DNA, ocorre o impedimento da adição de outros nucleotídeos abortando a transcrição e, conseqüentemente, a síntese de DNA (Robbins 1998) (Figura 5).

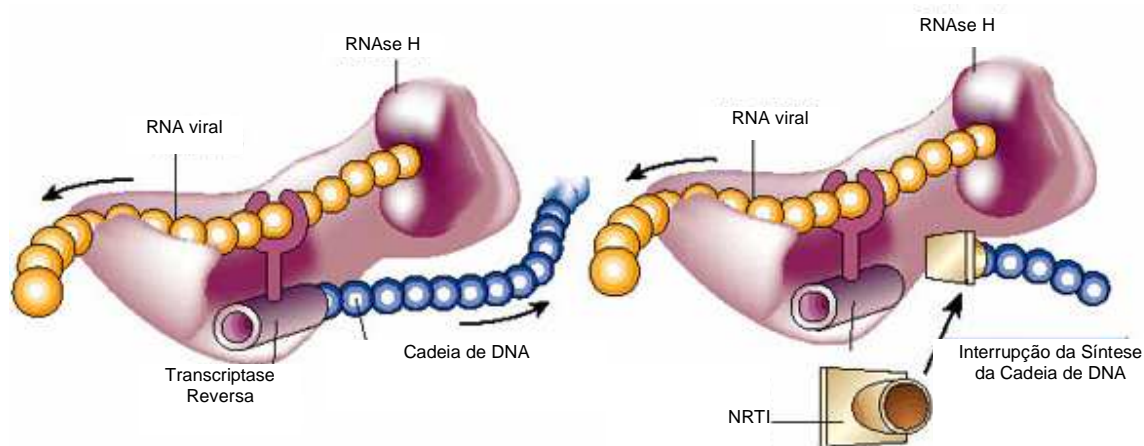


Figura 5. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleosídeos e Nucleotídeos.
(Adaptada de Richman 2001)

Os análogos a nucleotídeos atuam de modo semelhante, contudo, já vem pré-fosforilados, necessitando de uma etapa a menos de fosforilação. Desse modo, os análogos a nucleotídeos são ativados intracelularmente somente através de 2 etapas de fosforilação (Shafer 2002). Os NRTI atualmente disponíveis no Brasil estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Antirretrovirais Disponíveis no Brasil.

NRTI	NNRTI	IP	IE	IN
Didanosina (ddl)	Efavirenz (EFV)	Amprenavir (APV)	Enfurvitida (T-20)	Raltegravir
Tenofovir (TDF)	Nevirapina (NVP)	Atazanavir (ATV)		
Abacavir (ABC)		Darunavir (DRV)		
Estavudina (d4T)		Fosamprenavir (FPV)		
Lamivudina (3TC)		Indinavir (IDV)		
Zidovudina (AZT)		Lopinavir (LPV)		
		Ritonavir (RTV)		
		Saquinavir (SQV)		

NRTI: Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos a Nucleosídeos e Nucleotídeos, NNRTI: Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos a Nucleosídeos, IP: Inibidores da Protease IE: Inibidores de Entrada, IN: Inibidores da Integrase.

1.5.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos a Nucleosídeos

Os ITR não análogos a nucleosídeos (*Non-Nucleoside Analogs Reverse Transcriptase Inhibitors*, NNRTI) são inibidores não competitivos da enzima TR e se ligam diretamente ao sítio ativo da enzima TR em uma região hidrofóbica próxima do local de ligação do substrato para os nucleosídeos. Os complexos resultantes bloqueiam o local de ativação e catalisação da TR, diminuindo a ligação a poucos nucleosídeos e reduzindo drasticamente a polimerização, provocando a interrupção da síntese de DNA (Figura 6). Ao contrário dos NRTI, os NNRTI não requerem ativação intracelular (Esnouf et al. 1997). Os NNRTI atualmente disponíveis no Brasil estão descritos na tabela 1.

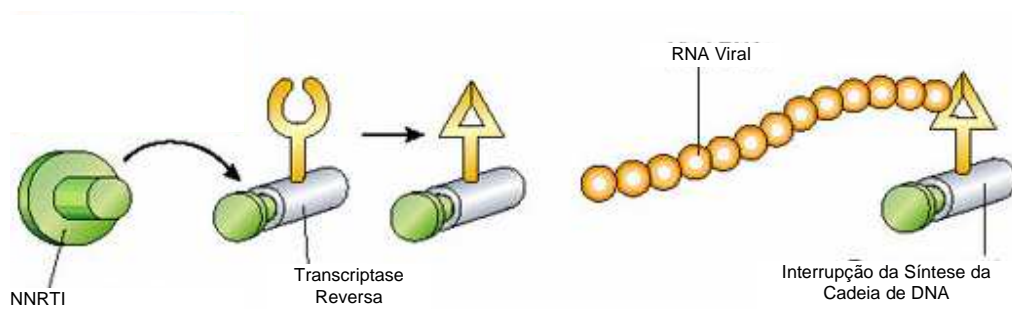


Figura 6. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos a Nucleosídeos.

(Adaptada de Richman 2001)

1.5.3 Inibidores da Protease

A PR do HIV-1 processa a poliproteína viral gag-pol em subunidades funcionais. Devido ao seu tamanho limitado e seu substrato específico, a variabilidade genética do gene da PR é limitada, assim a sua função é preservada. Essas propriedades fazem com que a PR seja alvo de várias drogas ARVs. A inibição da PR previne a fragmentação proteolítica das poliproteínas e a maturação dos vírions e leva à liberação de partículas virais que são incapazes de infectar novas células (Figura 7) (Clavel & Hance 2004). Com o conhecimento da estrutura molecular da PR do HIV-1, os inibidores da PR (IP) foram sendo modificados no sentido de se fixarem exatamente no sítio ativo da enzima (Eron 2001). Os IP atualmente disponíveis no Brasil estão descritos na tabela 1.

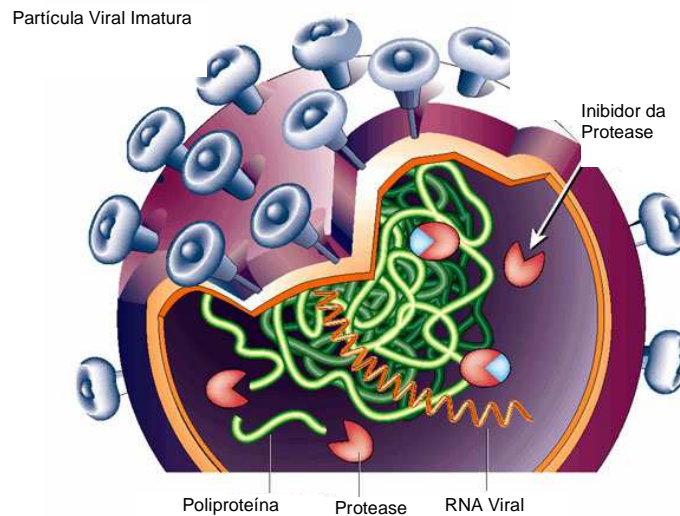


Figura 7. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Protease.
(Adaptada de Richman 2001)

De acordo com o documento “Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV/Ministério da Saúde, 2008” a terapia inicial deve sempre incluir combinações de dois NRTI associados a um NNRTI ou dois NRTI associado a um IP, reforçado com ritonavir (IP/r). A terapia ARV altamente ativa (HAART) é definida como a combinação de 3 ou mais drogas ARVs (Brasil 2008).

1.5.4 Inibidores da Integrase

Em 2007 foi aprovado o primeiro inibidor de IN, o raltegravir, aumentando o número de classes de ARVs disponíveis aos pacientes infectados como parte de terapia combinada (Nair & Chi 2007).

A integração do genoma viral ao DNA da célula hospedeira necessita de duas etapas. Na primeira etapa da integração, dois nucleotídeos são retirados das porções

terminais da fita de DNA viral e na segunda, o DNA viral é inserido no genoma do hospedeiro, passo este denominado transferência de fita e etapa inibida pelo raltegravir. O raltegravir interage com metais divalentes que estão dentro do sítio ativo da IN do HIV, impedindo assim a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira (Figura 8) (Hazuda et al. 2000).

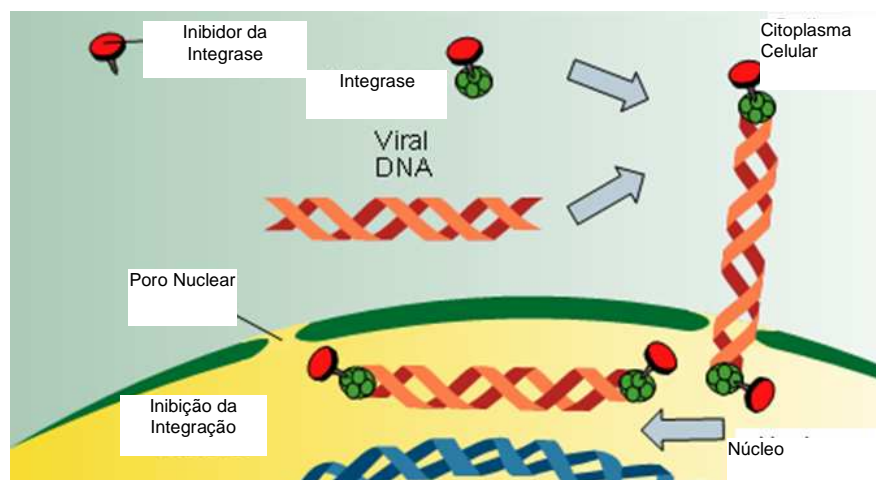


Figura 8. Mecanismo de Ação dos Inibidores da Integrase.

(Adaptada de www.imunopaedia.org)

1.5.5 Inibidores de Entrada

Os IE do HIV nas células hospedeiras podem impedir a ligação do HIV ao receptor CD4 (inibidores de ligação), impedir a ligação aos co-receptores (antagonistas dos co-receptores) e finalmente impedir a fusão do vírus com a célula (inibidores da fusão). Desse modo, as três classes de fármacos, designados inibidores da ligação, antagonistas dos co-receptores e inibidores da fusão são atualmente denominados como IE do HIV na célula alvo (Figura 9).

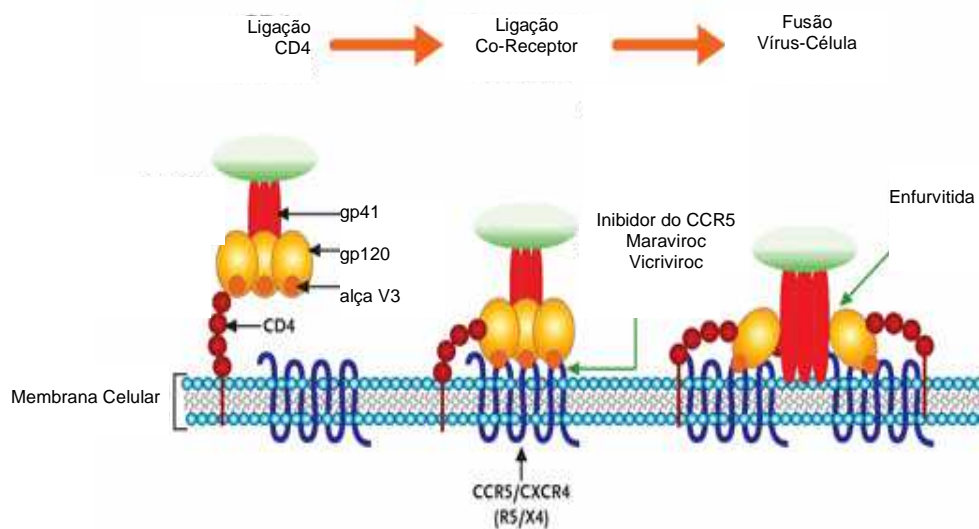


Figura 9. Mecanismo de Ação dos Inibidores de Entrada.
(Adaptada de www.salvagetherapies.org)

Atualmente, estão comercialmente disponíveis os antagonistas do co-receptor CCR5, maraviroc e vicriviroc e o inibidor de fusão, enfurvitida ou T-20.

Os antagonistas de co-receptor têm como mecanismo de ação a inibição do co-receptor CCR5 e, portanto não possui atividade contra variantes virais com tropismo ao CXCR4 (Westby & van der Ryst 2005). Desse modo, os pacientes devem previamente fazer o teste de tropismo viral para terem conhecimento da elegibilidade para o uso desses fármacos.

O T-20 é um peptídeo sintético de 36 aminoácidos lineares homólogos aos resíduos 127 a 162 na porção carboxila-terminal da região HR2 da gp41. Esse medicamento foi sintetizado a partir de um subtipo B do HIV-1 e possui ação contra a região HR1 da gp41.

A fusão da membrana da célula hospedeira e a viral ocorre após as mudanças conformacionais da gp41 e a exposição dos peptídeos de fusão mediado pelo complexo

de seis α -hélices da HR1 e HR2 da gp41 (Figura 4). O T-20 adere-se à região HR1 da gp41, impedindo o emparelhamento desta com a região HR2 e a aproximação das membranas viral e celular, etapa essa fundamental para a entrada do capsídeo viral no citoplasma celular. Portanto, a adesão do T-20 à proteína gp41 não acontece na configuração natural da proteína, mas só ocorre quando esta se encontra na fase intermediária do processo de fusão (Cervia et al. 2003, Moore et al. 2003, Briz et al. 2006).

O tratamento com o T-20, maraviroc/vicriviroc e raltegravir é indicado para indivíduos “multiexperimentados”, ou seja, submetidos a vários esquemas de tratamento e apresentando vírus multiresistentes.

1.6 Resistência do HIV-1 aos Antirretrovirais

O tratamento ARV trouxe, em longo prazo, consequências adversas, como a resistência do HIV aos ARVs e a falha terapêutica. O quadro de resistências às drogas ARVs constitui um grande problema de saúde pública que limita a eficácia do tratamento ARV.

A resistência do HIV é definida pela presença de mutações que reduzem a suscetibilidade do vírus às drogas ARVs, quando comparado ao vírus selvagem (Shafer 2002). Pelo fato do HIV ser geneticamente variável, não existe uma cepa selvagem padrão. No entanto, para estudo de resistência às drogas ARVs, a nomenclatura das mutações é definida baseada nas diferenças dos aminoácidos de uma sequência de referência. A sequência de referência selecionada como protótipo de diversos estudos de resistência viral é a sequência HXB2 do subtipo B do HIV-1 (número de acesso ao GenBank, K03455), pois, essa sequência contém os aminoácidos mais comuns em

cada posição do subtipo B do HIV-1 (Korber et al. 1998). Para indicar uma mutação, usa-se a letra referente ao aminoácido consenso, seguido do número da posição do códon e da letra referente ao aminoácido da mutação. Por exemplo, a mutação M184V, significa que na posição do códon 184, o aminoácido metionina (M) do consenso foi substituído pelo aminoácido valina (V). Havendo mistura de mais de um aminoácido na mesma posição, em decorrência de *quasispecies* do HIV, as letras dos aminoácidos são incluídas, separadas por barras após o número da posição do códon (K103K/N) (Shafer 2002).

As mutações associadas à resistência aos ARVs são classificadas como primárias ou principais e secundárias ou acessórias. As mutações principais situam-se no sítio ativo da enzima ou em local próximo a ele e alteram a ligação da droga ou inibem a atividade viral e conseqüentemente promovem redução de suscetibilidade a uma ou mais drogas. As mutações acessórias surgem para melhorar a capacidade replicativa do vírus já contendo uma mutação principal, ou seja, surgem para compensar a perda da atividade da enzima. Portanto, as mutações secundárias por si só não provocam efeito na suscetibilidade à droga. Porém, em alguns casos, quando associadas às mutações primárias podem reduzir a suscetibilidade à droga. Algumas mutações secundárias estão presentes como polimorfismos, ou seja, substituições que podem ocorrer frequentemente em vírus não expostos a pressão seletiva da droga (Shafer 2002, Spira 2003).

Vários fatores contribuem para o surgimento de resistência aos ARVs como a falta de adesão ao tratamento, fatores farmacológicos, como, alteração na absorção, rápida eliminação da droga, penetração insuficiente dos ARVs em alguns reservatórios anatômicos do HIV-1, interações medicamentosas e transmissão de partículas virais que já carregam genes com mutações de resistência (Pierson et al. 2000, Ghosn et al.

2006). Logo, se a supressão viral pelos ARVs é incompleta, pode ocorrer seleção de variantes virais resistentes que sobrepujam as populações virais sensíveis.

A resistência aos ARVs pode ser observada em pacientes que nunca fizeram uso prévio de tratamento e nestes casos é chamada de resistência primária. Quando a resistência ocorre em pacientes em uso de terapia ARV é denominada resistência secundária. A resistência primária emerge antes mesmo do uso da medicação ARV pelo paciente e isto pode ocorrer pela transmissão de cepas resistentes no momento da infecção. Alternativamente, e menos frequente, a resistência primária pode acontecer devido à geração espontânea de mutações em uma população de *quasispecie* do HIV-1 que permaneceram em um indivíduo infectado. Já, a resistência secundária surge em decorrência da pressão seletiva exercida pelos ARVs. Indivíduos sob tratamento e que já fizeram uso de diferentes esquemas terapêuticos, tem maior probabilidade de falharem ao tratamento e apresentarem vírus com resistência secundária (Boden et al. 1999).

O surgimento de cepas resistentes selecionadas durante o tratamento pode comprometer o impacto positivo da terapia, pois, essas variantes escapam do efeito dos ARVs e podem ser transmitidas, comprometendo a eficácia dos regimes terapêuticos de primeira linha em pacientes virgens de tratamento. As Figuras 10 e 11 mostram as principais mutações no gene *pol* e *env* do HIV-1 associadas à resistência aos ARVs.

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

Nucleoside and Nucleotide Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (nRTIs)¹

Multi-nRTI Resistance: 69 Insertion Complex² (affects all nRTIs currently approved by the US FDA)

M	A	▼ K				L	T	K
41	62	69	70			210	215	219
L	V	Insert	R			W	Y	Q
							F	E

Multi-nRTI Resistance: 151 Complex³ (affects all nRTIs currently approved by the US FDA except tenofovir)

	A		V	F		F	Q	
	62		75	77		116	151	
	V		I	L		Y	M	

Multi-nRTI Resistance: Thymidine Analogue-associated Mutations^{4,5} (TAMs; affect all nRTIs currently approved by the US FDA)

M		D	K			L	T	K
41		67	70			210	215	219
L		N	R			W	Y	Q
							F	E

Abacavir ⁶		K	L		Y	M		
	65		74		115	184		
	R		V		F	V		
Didanosine ^{7,8}		K	L					
	65		74					
	R		V					
Emtricitabine		K				M		
	65					184		
	R					V		
Lamivudine		K				M		
	65					184		
	R					V		
Stavudine ^{4,5,9,10}	M	D	K				L	T
	41		67	70			210	215
	L		N	R			W	Y
								Q
								E
Tenofovir ¹¹		K	K					
	65		70					
	R		E					
Zidovudine ^{4,5,9,10}	M	D	K				L	T
	41		67	70			210	215
	L		N	R			W	Y
								Q
								E

Nonnucleoside Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs)^{1,12}

Efavirenz					L	K	V	V		Y	Y	G		P
					100	103	106	108		181	188	190		225
					I	N	M	I		C	L	S		H
										I	A	A		
Etravirine ¹³		V	A	L	K	V			V	Y	G			
		90	98	100	101	106			179	181	190			
		I	G	I	E	I			D	C	S			
					P				F	I	A			
									T	V				
Nevirapine		L	K	V	V				Y	Y	G			
		100	103	106	108				181	188	190			
		I	N	A	I				C	C	A			
				M					I	L	H			

Figura 10. Principais Mutações no Gene da TR Associadas à Resistência aos Antirretrovirais.

(Johnson et al. 2008)

1.7 Ensaio Utilizados na Detecção de Resistência Viral

As mutações de resistência aos ARVs podem ser identificadas através de ensaios genotípicos, que medem indiretamente a susceptibilidade à droga e ensaios fenotípicos, que medem diretamente a susceptibilidade à droga.

Os ensaios genotípicos (genotipagem) têm como objetivo identificar a resistência às drogas ARVs através das mudanças genéticas ocorridas no genoma viral, capazes de bloquear ou diminuir a eficiência com que os ARVs ligam-se as mesmas. Portanto, esse ensaio se dá de forma indireta. O método genotípico *in house* baseia-se no sequenciamento automatizado com terminadores dideoxynucleotídeos fluorescentes, descrito por Sanger e colaboradores (1977). A primeira etapa metodológica se baseia na reação em cadeia da polimerase (PCR) e na segunda etapa, o fragmento amplificado é sequenciado. Esse é o método mais utilizado, pois, sua vantagem deve-se ao fato de acessar diretamente a sequência dos genes alvo de mutações de resistência. Após o sequenciamento automatizado do gene, uma minuciosa análise da sequência de nucleotídeos é realizada por comparação com a sequência de referência, reconhecidamente sensível às drogas utilizadas (Eshleman et al. 2004).

Outros métodos de genotipagem utilizam kits comerciais como: “ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostics)” e “TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit/OpenGene DNA Sequencing System (Bayer Healthcare, US)”.

O “ViroSeq HIV-1 Genotyping System” (Celera Diagnostics) é um sistema integrado de transcrição reversa, amplificação por PCR e sequenciamento para genotipagem da PR e TR do HIV-1 (Eshleman et al. 2004). O “Trugene HIV-1 Genotyping Kit” também é um sistema integrado de transcrição reversa, amplificação

por PCR e etapa de sequenciamento conjugado (CLIP) à eletroforese do material sequenciado em gel de poliacrilamida (Grant et al. 2003).

Outra metodologia genotípica é o sequenciamento por hibridização, que pode detectar mutações pontuais específicas nos genes da PR e TR do HIV-1 com potencial relevância clínica. O Inno-LIPA HIV-1 (Innogenetics, Ghent, Belgium) é um teste de hibridização reversa, que possui sondas para as principais mutações, fixadas em tiras de nitrocelulose. Produtos de transcrição reversa por PCR (RT-PCR) de isolados virais mutantes marcados com biotina são hibridizados. O complexo enzima-avidina e o substrato produzem uma mudança de cor nos locais da tira onde houve hibridização do produto com a sonda. Esse ensaio é mais barato e possui uma sensibilidade maior na detecção de mutações presentes em pequenas proporções de vírus circulantes. Como requer equipamentos simples de laboratório, é útil em áreas que ainda não têm acesso a sequenciadores sofisticados. Porém, trata-se de um ensaio limitado, porque, detecta apenas determinadas mutações e podem ocorrer falhas de hibridização resultando em erros de interpretação (Shafer 2002).

Nos ensaios fenotípicos (fenotipagem), são utilizados pseudovírus com fragmentos do vírus do paciente por transfecção e depois são cultivados em presença de diferentes concentrações de certas drogas ARVs. Se na presença da droga o patógeno continua se replicando, é resistente a ela; se inibido, é sensível e a droga pode ser usada no tratamento do paciente em questão. Esses testes também medem a concentração da droga necessária para inibir em 50% (IC50) ou em 90% (IC90) a replicação viral (Petropoulos et al. 2000). Os isolados com perfil de resistência aos ARVs podem ser sequenciados para a identificação das mutações selecionadas pela droga. Para comprovar se a mutação realmente está associada à resistência, emprega-se a técnica de mutagênese reversa. Essa metodologia laboratorial reverte as

mutações para o aminoácido do vírus selvagem e se o vírus voltar a ficar sensível, fica confirmada a importância da mutação (Shafer 2002). Os testes fenotípicos têm a vantagem de avaliar com maior fidelidade a sensibilidade do vírus frente a um ARV. Contudo, esses são considerados pouco viáveis pelo fato de serem metodologias trabalhosas e complexas.

O ensaio de fenotipagem virtual é um teste quantitativo que prediz a suscetibilidade fenotípica do HIV aos ARVs, baseado na combinação da genotipagem e fenotipagem (Harrigan et al. 2001). Primeiro, o isolado viral em estudo é genotipado por meio do sequenciamento automatizado. Posteriormente, essa sequência viral genotipada é submetida a um banco de dados para comparação com outros resultados de genotipagem de várias sequências virais procedentes de outros pacientes expostos aos ARVs. O resultado de genotipagem que apresenta o perfil mais parecido com a sequência submetida é então identificado. Além disso, como cada resultado de genotipagem do banco de dados contém um resultado de fenotipagem correspondente, obtém-se por fim, um laudo no formato de um resultado de fenotipagem (virtual). Portanto, enquanto um teste de genotipagem clássico fornece uma resposta qualitativa, o ensaio de fenotipagem virtual, quantifica a perda da suscetibilidade. Esse ensaio pode ser útil para pacientes multiexperimentados apresentando vírus multiresistentes (Gallego et al. 2004).

1.8 Resistência Primária aos Antirretrovirais

Como a resistência do HIV-1 raramente ocorre na ausência de exposição às drogas ARVs, a resistência primária indica, na maioria das vezes, vírus com mutações de resistência transmitidos de uma pessoa com resistência adquirida (Boden et al.

1999). Indivíduos infectados com HIV-1 apresentando resistência primária, ao iniciarem a terapia ARV, já apresentam menor barreira genética para resistência, ou seja, necessitam de um pequeno número de mutações para emergência da resistência a um ARV em questão. Desse modo, esses indivíduos apresentam maior risco de desenvolvimento de resistência para outras drogas que, em um paciente virgem de tratamento e sem mutações de resistência seriam totalmente ativas. Em outras palavras, esses pacientes podem apresentar maior risco de falha virológica (Grant et al. 2002, Oette et al. 2006). A determinação da prevalência de resistência primária pelo HIV-1 é importante para implementação de políticas de redução da transmissão do HIV e para orientação da terapia inicial dos pacientes.

Em países desenvolvidos, a prevalência de transmissão de vírus resistentes a um ou mais ARVs mostrou um aumento expressivo de 3,5 para 14% entre os anos de 1995 a 2000 (Little et al. 1999, Yerly et al. 1999, Salomon et al. 2000, Briones et al. 2001, Little et al. 2001, Little et al. 2002) e uma redução de 12,4 para 6,7% nos anos de 2000 a 2002 (Yerly et al. 2001, Wensing et al. 2003). Atualmente, em países da América do Norte e da Europa, a prevalência de resistência primária varia de 8 a 20% (Grant et al. 2002, Wensing et al. 2003, Vercauteren et al. 2008).

No Brasil, desde os anos de 1996 até os anos de hoje vários estudos vem avaliando a resistência primária do HIV-1 aos ARVs. As primeiras análises por sequenciamento gênico da PR e da TR de isolados de HIV-1 de pacientes virgens de tratamento procedentes das regiões norte e sudeste do Brasil, não detectaram nenhuma mutação para as classes de ARVs disponíveis naquele momento. Porém, nesses estudos, quando empregado o ensaio fenotípico, foram detectadas mutações que conferem resistência aos ARVs (Tanuri et al. 1999, Dumans et al. 2002). Essa discrepância entre os resultados obtidos por metodologias genotípica e fenotípica foi

também relatada em outros estudos (Boden et al. 1999, Little et al. 1999, Wegner et al. 2000, Weinstock et al. 2000). Para o fragmento da TR, sugere-se a presença de mutações de resistência localizadas externamente ao fragmento analisado, como por exemplo, as mutações L238I, Y318F e P236L, que quando associadas a outras podem conferir resistência moderada a NVP e DLV (Brown et al. 2000, Santos et al. 2008).

A análise de mutações na TR mediante ensaio de Inno-LiPA de isolados de pacientes virgens de tratamento dos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul detectou uma frequência de resistência primária de 9,38%. Todas as mutações detectadas (M41L, D67N, K70R e T215F) estavam associadas ao uso de AZT, sugerindo até então, o reflexo dos primeiros sinais do uso extensivo desta droga, que foi a pioneira em terapias ARVs no Brasil (Brindeiro et al. 1999).

Em 2001, visando monitorar a transmissão de vírus resistentes no Brasil foi criada a Rede Brasileira para Vigilância de Resistência a Drogas para o HIV-1 (HIV-BResNet). A HIV-BResNet realizou uma pesquisa sobre prevalência de resistência primária no Brasil que representa o estudo mais abrangente realizado em território nacional. Essa pesquisa foi realizada com 535 isolados de pacientes assintomáticos diagnosticados em centros de triagem anônima (CTA) para o HIV-1 de diversas regiões metropolitanas brasileiras. Fizeram parte desta amostragem, isolados da região norte (estado do Pará), nordeste (estados do Ceará e da Bahia), centro-oeste (estado do Mato Grosso do Sul), sudeste (estados de São Paulo e Rio de Janeiro) e sul (estados do Paraná e Rio Grande do Sul). Entre 409 isolados sequenciados na região da PR e TR, a taxa de resistência primária aos ARVs foi de 6,6%. Nessa casuística, 2,24%, 2,36% e 2,06% dos isolados apresentaram mutações associadas aos IP, NRTI e NNRTI, respectivamente, e um isolado apresentou mutações para NRTI e NNRTI. Portanto, devido à baixa prevalência de resistência primária no Brasil evidenciada por

esse estudo, o programa de controle da aids não recomenda teste de genotipagem pré-tratamento como rotina, mas sugere o seu contínuo monitoramento, exceto em crianças antes do início de terapia ARV, devido à grande utilização de ARV em gestantes, o que poderá possibilitar uma indicação mais precisa do tratamento (Brindeiro et al. 2003, Brasil 2009).

Dois estudos independentes realizados em anos distintos e em diferentes cidades do estado do Rio de Janeiro detectaram frequência similar de resistência primária no gene da TR (14%), porém, com diferentes perfis de mutações (M41L, E44D, T69D e V118I *versus* D67N, K70S, T69N, V118I, V179D e T215D) (Pires et al. 2004, Eyer-Silva et al. 2008). Outros estudos realizados na cidade de Recife/PE e Porto Alegre/RS, também detectaram mutações de resistência primária somente para ITR, porém com menor frequência, 3,6% (M41L e K219E) e 2,78% (M41L, K103N, L210W e T215Y), respectivamente (Medeiros et al. 2006, Rodrigues et al. 2006). De fato é importante salientar que a maioria desses estudos incluiu amostragem limitada e se restringiu a uma única região brasileira: estado do Rio de Janeiro, cidades de Recife e Porto Alegre, respectivamente, não representando, portanto, a população brasileira em geral. No entanto, quando esses resultados são comparados à pesquisa realizada pela HIV-BResNet, verifica-se uma considerável persistência de mutações associadas aos ITR com perfis quantitativo e qualitativo diferentes. Isso se deve ao fato do uso preferencial de ITR no início da terapia e também da maior persistência de mutações associadas aos ITR mesmo na ausência da pressão seletiva dos ARVs.

Em 2004, Maia-Teixeira e colaboradores (2006) pesquisaram o perfil de mutações de resistência primária em dois períodos diferentes: era pré-HAART e pós-HAART em grupos de UDI. Entre 27 isolados de HIV-1 do grupo de UDI na era pré-HAART, 22,2% apresentaram mutações associadas aos ITR. Já na era pós-HAART, de

38 isolados de HIV-1 de UDI, 7,9% apresentaram mutações associadas aos IP (D30N, M46I, V82A e L90M) e 13,2% dos isolados apresentaram mutações associadas aos NRTI (D67N, T69N/A, K70R, V118I, M184V, T215F e K219E/R). Portanto, diferentes perfis de mutações de resistência primária nos dois grupos de UDI foram observados em tempos diferentes da era HAART. Com o início do uso de droga da classe de IP, concomitantemente com os ITR, as mutações associadas aos IP começaram a surgir. A diminuição do número de mutações na TR, de 22,2% para 13,2% da era pré-HAART para a era pós-HAART, indica que ao mesmo tempo em que o vírus começava a ganhar novas mutações de resistência, o mesmo poderia estar perdendo seu *fitness* e sua capacidade de transmissibilidade.

Com o início da era HAART e com o uso extensivo das três classes de ARVs pelos pacientes brasileiros HIV+/Aids, bem como, o significativo aumento da sobrevivência e da qualidade de vida dos pacientes infectados, aumentaram as chances de geração e transmissão de cepas virais resistentes. Dessa forma, a análise genômica de isolados do HIV-1 de uma população recém infectada deve apresentar uma taxa maior de mutações de resistência aos ARVs, comparada com a análise dos isolados virais de pacientes com infecção crônica infectados em um período em que o tratamento com ARV era mais restrito. Em geral, com o passar do tempo, na ausência de pressão seletiva exercida pelo tratamento ARV, os vírus mutantes transmitidos podem ser substituídos pelo vírus do tipo selvagem com melhor capacidade replicativa (Martinez-Picado et al. 1999, Martinez-Picado et al. 2000, Deeks et al. 2001). Assim, resultados de estudos entre indivíduos com infecção crônica podem subestimar a taxa de resistência primária. Entretanto, alguns estudos mostram a persistência de vírus resistentes por até 7 anos, mesmo na ausência de terapia ARV (Brenner et al. 2002, Barbour et al. 2004, Brenner et al. 2004, Pao et al. 2004).

Estudo realizado no período de 1998 a 2001 compreendendo 341 doadores de sangue do estado de São Paulo mostrou elevada taxa de resistência primária em doadores recentemente infectados (12,7%) comparados a doadores com infecção crônica (5%). A prevalência de resistência primária de forma geral foi de 6,16% (Barreto et al. 2006). Outro estudo realizado com doadores de sangue cronicamente infectados mostrou uma taxa de 6,5% de resistência primária (Gonzalez et al. 2007). Esses dados mostram uma certa estabilidade na prevalência de resistência primária entre indivíduos cronicamente infectados do estado de São Paulo. Além disso, esses resultados sugerem que isolados com mutações de resistência podem estar sendo transmitidos com frequência e, que em indivíduos virgens de tratamento, os vírus resistentes transmitidos podem reverter a vírus tipo selvagem ao longo do tempo. Nesse caso, a prevalência de resistência será menor em pacientes com infecção crônica quando comparada com pacientes recém infectados (Goudsmit et al. 1996, Yerly et al. 1998, de Ronde et al. 2001).

Em 2007, estudos conduzidos em duas cidades portuárias brasileiras apontaram um cenário preocupante em relação à resistência primária. A cidade de Santos/SP, primeira cidade brasileira a fornecer ARV e, portanto com exposição maior às drogas ARVs que outras áreas brasileiras, mostrou uma das maiores taxas de resistência primária do mundo entre indivíduos recentemente infectados (36,8%) e em pacientes com infecção crônica (25%) (Sucupira et al. 2007). Outro estudo na cidade de Salvador/BA mostrou que de 132 isolados de HIV-1 de adultos virgens de tratamento e de 26 crianças infectadas verticalmente, 18,9% e 26,9% apresentaram mutações de resistência aos ARVs, respectivamente (Pedroso et al. 2007). Essas diferenças regionais na prevalência de resistência primária no Brasil provavelmente refletem o tempo em que a HAART está disponível na área e, portanto, indicam o extensivo uso

de drogas ARV de primeira linha, o fluxo migratório, o intercâmbio entre brasileiros e turistas e o sexo sem proteção afetando a geração e a transmissão de vírus resistentes. A princípio, acredita-se que existe forte tendência de mutações relacionadas aos ITR persistirem, pois, não alteram significativamente a capacidade replicativa do vírus e possuem baixa barreira genética (Geretti 2007). Portanto, em algumas áreas específicas do país, sugere-se um sistema de monitoramento da resistência primária sustentado pelo Ministério da Saúde com a finalidade de demonstrar os benefícios e a relação custo-efetividade da genotipagem para resistência (Soares et al. 2004, Sax et al. 2005).

Embora múltiplos fatores determinam o risco de aquisição de resistência em diferentes regiões e populações, existe uma necessidade real de monitoramento da resistência primária visando fornecer subsídios para adoção de estratégias para sua redução (Geretti 2007).

1.9 Resistência Secundária aos Antirretrovirais

Após a instituição da terapia ARV, basicamente três parâmetros caracterizam a falha terapêutica: o aumento da carga viral, a redução da contagem de linfócitos T CD4⁺ e a ocorrência de eventos clínicos. A falha virológica é caracterizada por carga viral acima de 400 cópias/ml após 24 semanas de tratamento ou acima de 50 cópias/ml após 48 semanas de tratamento ou carga viral detectável após supressão virológica inicial (*Painel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents*, 2008). A falha imunológica caracteriza-se pelo declínio progressivo da contagem de linfócitos T CD4⁺, enquanto que a falha clínica se expressa por meio de infecções oportunistas (Turner et al. 1994).

Existe uma associação frequente entre a presença de falha virológica e o surgimento de resistência aos ARVs. De fato, na falha virológica, é identificada resistência em mais de 90% dos casos (Sucupira et al. 2001, Huang et al. 2008). Entretanto, inúmeros fatores podem contribuir para falha virológica na ausência de resistência viral, como por exemplo, a falta de aderência ao tratamento, potência insuficiente do ARV, fatores farmacológicos (má absorção, baixa penetração e rápida eliminação das drogas), transativação heteróloga do HIV após imunização (elevação transitória da carga viral e diminuição da contagem de linfócitos T CD4⁺ após imunização), resistência celular (através da glicoproteína *p* expressa na superfície celular que provoca extrusão dos ARVs e conseqüentemente queda na concentração intracelular da droga) e por fim, a presença de uma população viral minoritária com resistência (Günthard et al. 1998, Deeks et al. 2001, García-Bujalance et al. 2007, Johnson et al. 2007).

A maioria dos pacientes em que ocorre seleção de variantes genéticas resistentes aos ARVs necessita de novos esquemas terapêuticos, denominados esquemas de resgate. Os testes de genotipagem são muito utilizados para auxiliar na escolha de um esquema de resgate adequado para a situação, ou seja, um esquema “personalizado” (Tural et al. 2002).

Em países desenvolvidos, a prevalência de resistência entre pacientes em falha terapêutica ao HAART é alta. Uma estimativa revela que 76% dos pacientes que recebem terapia ARV nos Estados Unidos possuem isolados com mutações de resistência para uma ou mais drogas ARVs (Kenyon 2001, Richman et al. 2004).

No Brasil, estudos de prevalência da falha terapêutica em consequência de resistência secundária ao uso de HAART mostram altas taxas de mutações. No estado de São Paulo, o primeiro estado a ter acesso à terapia ARV no Brasil, um estudo

avaliou 791 pacientes em falha terapêutica entre os anos de 1997 e 2000. Aproximadamente 97% dos isolados de HIV-1 apresentavam mutações de resistência secundária no gene da TR, 90% no gene da PR e 99% em ambas as regiões gênicas analisadas (Sucupira et al. 2001). De fato, se a carga viral torna-se detectável na presença de um tratamento, deve-se questionar a ocorrência de resistência viral.

No estado do Distrito Federal, segundo local de acesso à terapia ARV no Brasil, estudos de monitoramento da resistência secundária aos ARV entre os anos de 1998 e 2002 mostraram prevalência de 84% de pacientes apresentando mutações de resistência associadas ao HAART (Cerqueira et al. 2004a, Cerqueira et al. 2004b). Estes resultados estão de acordo com uma pesquisa realizada em território nacional com 267 pacientes procedentes dos estados de São Paulo (n=17), Rio de Janeiro (n=86), Santa Catarina (n=67), Espírito Santo (n=24) e Distrito Federal (n=43) que indicou a mesma frequência de resistência aos ARVs, sendo que as maiores taxas se encontravam nos estados de São Paulo e Distrito Federal (Tanuri et al. 2002). Devido à disponibilidade inicial dos ARVs ter ocorrido nesses dois estados brasileiros, os pacientes dessas regiões foram expostos às drogas ARVs por um tempo maior do que pacientes de outros locais do país, resultando na seleção mais precoce de cepas virais resistentes.

Estudos realizados com crianças em falha terapêutica mostram diferentes perfis de mutações de resistência entre grupos sob dupla (NRTI + NNRTI) e tripla terapia (2 NRTI + IP ou NNRTI), evidenciando que o tempo de exposição à terapia está diretamente relacionada ao acúmulo de mutações de resistência. Durante a vigência da dupla terapia, um grande número de mutações para ITR podem surgir e se acumular lentamente no genoma viral. Após falha virológica com dupla-terapia e devido à necessidade de introduzir a tripla terapia, o acúmulo prévio de mutações pela dupla

terapia poderia prejudicar o impacto positivo do tratamento e aumentar as chances de falha terapêutica (Brindeiro et al. 2002, Machado et al. 2004a, Machado et al. 2004b). Além disso, a resistência cruzada (resistência selecionada por uma droga que leva à resistência a uma outra droga ainda não utilizada) em decorrência do acúmulo de mutações, pode levar ao aumento da carga viral em indivíduos tratados e conseqüentemente a uma resposta subótima ao tratamento.

A correlação direta entre o tempo de exposição à terapia e isolados apresentando multiresistência aos ARVs também foi descrita. Em São Paulo no ano de 2001, a frequência de isolados resistentes às três classes de ARVs foi de 36,8% (Sucupira et al. 2001). Na região nordeste, um estudo realizado em 518 pacientes dos estados de Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas mostrou que 18,9% dos isolados apresentaram multiresistência aos ARVs (Cavalcanti et al. 2007). Esses dados sugerem que a multiresistência aos ARV no Brasil acompanha uma seqüência histórica de seu uso que iniciou mais cedo na região sudeste do país (Brito et al. 2005).

O número de falhas terapêuticas acumuladas também pode influenciar no desenvolvimento de mutações de resistência para cada classe de ARVs. Assim, o acúmulo de mutações de resistência em pacientes com falha poderá afetar as futuras opções para tratamento ARV no Brasil (Couto-Fernandez et al. 2005, Medeiros et al. 2007). Conseqüentemente, o resultado será o aumento proporcional de cepas resistentes às drogas.

No sentido de melhorar estratégias de terapia para pacientes em falha terapêutica, reorientando o tratamento e buscando um esquema de resgate, o Ministério da Saúde através do Programa Nacional de DST e Aids, criou em 1999, o programa da Rede Nacional de Genotipagem, RENAGENO do Brasil. Suas atividades

foram iniciadas em 2001, com testes de genotipagem do HIV-1 em pacientes sob critérios de falha terapêutica. Atualmente, a rede é composta por 22 laboratórios distribuídos pelo país e de médicos de referência treinados para interpretação destes testes (Brasil 2006).

A caracterização da diversidade genética do HIV-1 no Brasil é um outro componente importante da epidemia de aids e juntamente com o estudo da resistência viral aos ARVs são essenciais para o desenvolvimento de estratégias de prevenção, controle e recomendações no manuseio dos pacientes em terapia ARV.

2. JUSTIFICATIVA

A capacidade científica brasileira na área do HIV/aids vem crescendo rapidamente nos últimos anos, entretanto, a maioria dos estudos sobre diversidade genética do HIV-1 no Brasil está concentrada nas principais regiões metropolitanas industrializadas do Brasil: as regiões sudeste e sul. A região sudeste concentra mais da metade dos pacientes HIV+/Aids do país e em segundo lugar a região sul. Em outras regiões geográficas do Brasil, como a região centro-oeste, existe pouca informação em relação à diversidade do HIV-1 e a real dimensão da resistência viral aos ARVs. No estado de Goiás, os testes de genotipagem para resistência são realizados em um número reduzido de pacientes que preenchem os critérios de falha terapêutica pela RENAGENO. Essa situação compromete parcialmente a tentativa de avaliar nacionalmente o surgimento de resistência aos ARVs em pacientes brasileiros.

Os resultados dos três estudos aqui apresentados visam contribuir para o conhecimento sobre a prevalência de mutações associadas à resistência aos ARVs em pacientes HIV+/Aids virgens de tratamento e em pacientes tratados e, conseqüentemente para o acompanhamento da disseminação de vírus resistentes. Além disso, esses estudos contribuem para o entendimento da epidemiologia molecular do HIV-1 na região centro-oeste.

Assim, no contexto da epidemia de aids no Brasil com acesso universal a terapia ARV desde 1996, o monitoramento do polimorfismo genético do HIV-1 e da resistência aos ARVs representam temas relevantes de saúde pública.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o perfil e a prevalência de mutações de resistência primária e secundária aos ARVs e identificar os subtipos genéticos entre isolados de pacientes infectados pelo HIV-1 do estado de Goiás.

3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar os subtipos genéticos do HIV-1 através do sequenciamento dos genes da PR e TR visando monitorar a diversidade genética do HIV-1 no estado de Goiás;
2. Descrever a frequência e o perfil de mutações associadas à resistência primária aos ARVs (IP, NRTI e NNRTI) em isolados de pacientes HIV+/Aids do estado de Goiás;
3. Descrever a frequência e o perfil de mutações associadas à resistência secundária aos ARVs (IP, NRTI e NNRTI) em isolados de pacientes HIV+/Aids do estado de Goiás;
4. Descrever a frequência e o perfil de mutações de resistência secundária associadas ao inibidor de fusão, enfurvitida (T-20) entre isolados multiresistentes para os IP, NRTI e NNRTI de pacientes HIV+/Aids do estado de Goiás.

4. ARTIGO 1 – RESISTÊNCIA PRIMÁRIA

Artigo Aceito para Publicação na Revista *Journal Clinical Virology*

JOURNAL CLINICAL VIROLOGY

Enc: Your submission JCV-D-09-00065R2

Mariane Martins de Araújo Stefani- Imunologia

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública- Universidade Federal De Goiás

fone:62.209.61.11

----- Mensagem Original -----

De: William Carman <netta.horn@ggc.scot.nhs.uk

Para: mstefani@iptsp.ufg.br <mstefani@iptsp.ufg.br

Assunto: Your submission JCV-D-09-00065R2

Data: 15/07/09 13:51

Ms. Ref. No.: JCV-D-09-00065R2

Title: HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil

Journal of Clinical Virology

Dear Dr Stefani,

Thank you for submitting your manuscript; HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil to the Journal of Clinical Virology.

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal and has been forwarded to the publishers. They will be in touch shortly with proofs and we ask that you check these carefully for any errors. Thank you once again for your interest in the Journal.

With kind regards,

William Carman

Editor-in-Chief

Journal of Clinical Virology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil

Ludimila Paula Vaz Cardoso^a, Boaventura Braz de Queiroz^b, Mariane Martins de Araújo Stefani^{a*}

Affiliations:

^a**Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia/Goiás, Brazil.**

^bAnuar Auad Hospital, HAA/HDT/SUS, Al Contorno Q Área, 3556 km 1 n° 3556 Setor Jardim Bela Vista 74000-000, Goiânia/Goiás, Brazil.

***Correspondence:** Mariane Martins de Araújo Stefani. Address: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia-Goiás/Brazil. Fax: 55 62 3209 6363, Phone: 55 62 3209 61 11. email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Abbreviations: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), circulating recombinant forms (CRF), antiretroviral therapy (ART), highly active antiretroviral therapy (HAART), protease (PR), reverse transcriptase (RT), complementary DNA (cDNA), nested polymerase chain reaction (nested-PCR), Jumping Profile Hidden Markov Model (jpHMM-HIV), Neighbor-Joining (NJ), simian immunodeficiency virus from chimpanzee (SIVcpz), Calibrated Population Resistance (CPR), Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM), International AIDS Society-USA (IAS-USA), confidence interval (CI), Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), men who have sex with men (MSM), intravenous drug users (IDU), protease inhibitors

(PI), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) and heteroduplex mobility assay (HMA).

Abstract: 249 words

Text: 2010 words

ABSTRACT

Background: Primary resistance represents a challenge for the control of HIV-1 because it can reduce the efficacy of first line antiretroviral therapy and may impact clinical outcomes.

Objectives: To describe the prevalence of primary HIV-1 drug resistance and subtypes circulating in Central West Brazil.

Study design: 103 antiretroviral naïve patients were recruited in Goiânia city, Central West Brazil during 2007-2008. Protease and partial reverse transcriptase regions were retrotranscribed from plasma HIV-1 RNA and 97 were sequenced after direct nested PCR. HIV-1 subtype was assigned by phylogenetic analysis. Primary drug resistance was analyzed by the Calibrated Population Resistance (CPR) tool using Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) and International AIDS Society-USA (IAS-USA) major mutation list.

Results: Primary drug resistance mutations ranged from 8% (IAS) to 10% (SDRM). High level resistance to at least one antiretroviral drug was observed. T215D/S revertant mutations were identified in 4/97 patients. HIV-1 subtype B represented 82.5%, subtype F1 6.2%, subtype C 3.1%, B/F1 7.2% and one sample was a F1/C/B mosaic. HIV-1 subtype C sequences formed a monophyletic cluster with other Brazilian subtype C sequences.

Conclusions: Our HIV-1 *pol* sequences from Central West region include the first inland HIV-1 subtype C sequences and help compose the molecular epidemiology map of HIV-1 in Brazil. This data also show that a significant proportion of the naïve patients presented important drug resistance mutations. Therefore naïve patients from this setting may benefit from pre-treatment genotypic testing to optimize the choice of antiretroviral drugs and to help control HIV-1 transmission.

Keywords: HIV-1, primary resistance, mutations, Central West Brazil.

Background

Brazil is a huge country where different human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes mainly subtype B, followed by lower proportions of subtypes F1 and C co-circulate and co-evolve. Recently increasing proportions of B/F unique recombinants, B/F circulating recombinant forms (CRF) and other recombinant genomes have been reported in the country.¹⁻⁶ Moreover important regional differences in the distribution of HIV-1 subtypes, especially subtype C in the south region have been reported.⁷ The molecular epidemiology of HIV-1 in the south and southeast regions is very well characterized; however there is limited data about subtypes circulating in areas away from the epicenter of the epidemics which is the southeast region.

Extensive experience in the use of antiretroviral therapy (ART) has been accumulated by the Brazilian public health care that pioneered, in developing countries, the universal free-of-cost access of AIDS patients to licensed ART.⁸ The introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in 1996 has substantially improved AIDS-related morbidity and mortality.⁹ However there have been concerns about the emergence and transmission of drug resistant HIV-1 in developing countries with widespread exposure to ART due to poor adherence and suboptimal ART doses.¹⁰ In 2006 around 180,000 Brazilian AIDS patients were under ART.¹¹ Transmitted or primary resistance represents a challenge for the control of HIV-1 infection since it can reduce the efficacy of first line ART and may impact clinical outcomes. Pre-treatment genotypic testing is considered important to guide the choice of ART regimens reducing the risk of treatment failure in persons with resistant virus.¹²

Objectives

This study describes HIV-1 phylogenetic diversity and reports the prevalence of primary antiretroviral resistance mutations based on sequence analyses of protease (PR) and of reverse transcriptase (RT) genes among naïve patients recruited in Central West Brazil.

Study Design

Patients

One hundred-three consecutive cases of naive patients with recent or chronic HIV-1 infection, both sexes, all age groups, were recruited during 2007-2008 at the main regional reference public hospital for HIV-1 care (Anuar Auad Hospital, Goiânia, Goiás State, Central-West Brazil) which is the only State health care unit entitled to prescribe ART and monitor patients. Our study group represented 25.9% of the 398 naïve patients that attended this hospital during the study period. Socio-behavioural, clinical and laboratory data (HIV RNA load: bDNA, Bayer Diagnostic; NASBA, Organon Teknika and RT-PCR, Roche Diagnostic and CD4 counts: FACSCalibur, Becton Dickison) were obtained in a standardized questionnaire. Research Ethical Committees approved this study (HAA/HDT/SUS, CEPMHA/HC/UFG Protocol # 073/05). All participants signed the informed consent and the mother signed the child's informed consent.

Genetic analysis

RNA was extracted from plasma (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) (Invitrogen) and used as the target for nested polymerase chain reaction (nested-PCR) employing HIV-1 PR and RT K1/K2 external primers and DP10/F2 internal primers.^{13,14} Entire PR gene (corresponding to positions 2253-2549 relative to HXB2 genome, GenBank accession no. K03455) and a 750 bp fragment of RT gene (corresponding to positions 2550-3299 relative to HXB2 genome) were amplified. After amplicons purification (QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) genomic sequencing was performed at Federal University of Goiás (DYEnamic ET Dye Terminator kit, GE Healthcare, USA; ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). All generated sequences were subjected to quality control analysis by HIV-1

Quality Analysis Pipeline Tool (<http://www.sanbi.ac.za>) and screening by visual inspection of the alignment by Bioedit software to exclude sample mix-ups and contamination.^{15, 16}

Phylogenetic analysis

REGA automated genotyping tool version 2.0, Jumping Profile Hidden Markov Model (jpHMM-HIV) software and phylogenetic inference defined HIV-1 genetic subtype.^{17,18} Study sequences were aligned with reference set from the Los Alamos HIV database ([ww.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)) using the Clustal X software and adjusted manually by the BioEdit software.^{16,19} Phylogenetic inferences were performed by the Neighbor-Joining (NJ) method under Kimura's two-parameter correction using MEGA4 software.^{20,21} Bootstrap values (1000 replicates) above 70% were considered significant. Isolates with discordant PR/RT subtypes were analyzed by SIMPLOT 3.5.1 software in 200 bp sliding window advanced in 20 bp steps size increments (1000 replicates).²² Sequences were gap-stripped, the transversion-to-transition ratio was set to 2.0, and distances were calculated according to Kimura's two-parameter model.

Resistance analysis

Primary drug resistance was analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool employing the Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) and International AIDS Society-USA (IAS-USA) major mutation lists. ART mutation susceptibility profile was analyzed by Stanford HIV Drug Resistance Database (hivdb.stanford.edu). Possible low-level resistance was not included due to its unknown clinical relevance (Accessed: January/2009).

GenBank accession numbers of the sequences presented in this study are FJ548786-FJ548823 and FJ594127-FJ594185.

Statistical analysis

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

Results

Ninety-seven out of 103 naïve patients recruited had HIV-1 *pol* genes sequenced. Most patients were males (68%), median age was 32 years (15-71 years range) and one 2 years old case was included.

The major risk factor identified was heterosexual unprotected sex (48.5%) followed by 25.8% men who have sex with men (MSM). Two patients were intravenous drug users (IDU), one vertical transmission case and two MSM who were IDU were also included. For 20.6% of the patients the route of transmission was unknown. Among adult patients the median of CD4 cell counts was 232.8 cells/ μ l (4-1184 cells/ μ l range); the 2 years old child had 2941 CD4 cells/ μ l. Plasma viral loads of 19.6% (19/97) of the patients were below 10,000 copies/ml, between 10,000 and 100,000 copies/ml for 43.3% (42/97) and over 100,000 copies/ml for 37.1% (36/97) of the participants.

Most sequences analyzed (89/97, 91.8%) clustered with a single HIV-1 subtype in PR and RT genes: 82.5 % (80/97) were assigned subtype B, 6.2% (6/97) were subtype F1 and 3.1% (3/97) were subtype C (Figure 1). The closely related BRGO3056-BRGO3057 samples come from a heterosexual couple and BRGO3065-BRGO3066 samples come from a mother-vertical transmission pair.

Eight patients (8.2%) had discordant HIV-1 subtypes and recombination was confirmed by bootscanning analysis (Figure 2): F1^{PR}/B^{RT} (n=4), B^{PR}/F1^{RT} (n=3) and one F1^{PR}/C^{RT}/B^{RT}.

According to SDRM-2009 and IAS-USA, 10.3% (CI 95%, 4.8-17.1%) and 8.2% (CI 95%, 3.4-14.7%) of patients respectively presented primary drug resistance mutations. T215 revertant

mutations (T215D/S), which are part of the SDRM-2009 list differently from IAS-USA list, have been found in 4/97 of naïve patients. Table 1 indicates that most resistance mutations occurred among subtype B isolates from young adult males.

Table 2 depicts individual mutation profiles of ART naïve patients and the level of resistance to distinct antiretroviral drugs. Most resistant viruses described herein were detected in MSM (5/10) and one B/F1 resistant virus was identified in a male IDU. The median CD4 count from patients with transmitted resistance was 166.5 cells/ μ l (22-660 cells/ μ l) and the median viral load was 25717 copies/ml (5828-150458 copies/ml range) and one patient had viral load above the detection limit of the assay. Transmitted drug resistance was observed in one patient diagnosed in 2002 (FJ548807) and the others were diagnosed from 2006 to 2008.

The majority of isolates (6/10) presented mutations associated with one class of ART. Two patients had mutations associated with protease inhibitors (PI) (M46I/L90M; I85V) and 3 patients had mutations associated with nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) (M41L/T215D; T215S; L210W). One patient presented K103N mutation associated with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI). Four patients had mutations associated with more than one class of ART: PI and NRTI (M46L/L210W); NRTI and NNRTI (V118I/T215D/Y188L; V118I/Y181C; T215S/G190S).

Discussion

A considerable level of HIV-1 primary resistance was detected in Central West Brazil. This information fills a gap about the level of primary resistance in this geographic region of the country and contrasts with mostly lower levels of resistance reported in other areas.^{23,2,24-29}

Brazil is a continental country where recent reports from the northeast and southeast regions have shown very high levels of primary drug resistance.^{30,31} These studies together with ours indicate Brazilian areas with higher prevalence rates of primary drug resistance. Baseline antiretroviral

resistance testing has been recommended by the World Health Organization in areas of antiretroviral resistance higher than 5%.³² Therefore regional primary resistance surveillance studies may indicate the usefulness of pre-ART genotypic testing to optimize the introduction of treatment.

Considering that most patients included in this study were chronic cases (81/97 had CD4 counts <350 cells/ μ l), the prevalence of primary resistance presented herein may be underestimated because these patients, diagnosed from 2006 to 2008, have probably been infected for several years. Resistance mutations negatively affect the viral replicative fitness therefore they tend to decline overtime and may no longer be detectable in the absence of selective drug pressure. However some reports show persistence of primary resistance mutations for up to 7 years.^{33,34} Additionally standard bulk sequencing genotypic assay used in this study does not identify variants that constitute less than 20-30% of the viral population.³³ Studies employing more sensitive techniques such as real time PCR have detected a considerable proportion of transmitted HIV-1 drug resistant variants which were undetectable by conventional bulk genotyping.³⁵ A recent case control study has shown that these minority mutations can have clinical impact.^{36,37} Therefore a limitation of this study is the possible underestimation of the prevalence of resistance mutations among naïve patients.

In this study T215 revertant mutations (T215D/S) have been found in about 4% (4/97) of naïve patients compared to 0.2-5% reported in other studies.^{38,39} T215 revertant mutations are due to the transmission of a T215 revertant subset virus previously exposed to selective antiretroviral pressure. Failure to detect T215Y/F may indicate that these variants have been replaced by the more fit T215 revertants or that T215 revertants have been transmitted. T215 revertants have been weakly associated with an increased risk of virologic failure because revertants have been considered surrogate markers of T215Y/F mutants. Alternatively T215 revertants may present

lower genetic barrier since one nucleotide change in the T215 codon can lead to the development of T215Y resistant mutation (ACC for TAT/TAC).⁴⁰

The dynamics of HIV-1 molecular epidemiology in Central West Brazil overtime can be monitored by comparing these *pol* diversity results with previous *env/gag* heteroduplex mobility assay (HMA) data.⁶ An increase in the relative proportion of HIV-1 non-subtype B was observed. The current analysis of HIV-1 *pol* gene showed 6.2% subtype F1 and 3.1% subtype C whereas *env/gag* HMA results from 2001 to 2004 identified 1.5% subtype F1 and 1.5% subtype C. A slight decrease in B/F1 mosaics was observed from 2001-2004 to 2007-2008 (11.4% versus 7.4%). Nevertheless our data confirm that B/F1 recombinants represent the second most frequent HIV-1 genetic variant in this area. Another study of HIV-1 *pol* and *env* sequences from Central Brazil (Brasília, federal capital, 200 km away from our study area) indicated 4.9% B/F recombinants and 95.1% subtype B.⁴¹ Our data corroborates the importance of B/F1 mosaic samples in the epidemics in Central West Brazil similarly to other reports.^{3,42-44,6} Our study describes the first subtype C sequences from inland Brazil which formed a monophyletic cluster with other subtype C sequences from south and southeast. This study confirms the spread of HIV-1 subtype C, which predominates in the Brazilian south region, inland towards the north region.⁷ Our data from HIV-1 *pol* sequences from Central West Brazil help compose the molecular epidemiology map of HIV-1 in country.

In conclusion our study indicates relative increase in subtypes F1 and C overtime and reinforces the importance of B/F1 mosaics in the molecular epidemiology of HIV-1 in Central West Brazil. Our findings also describe the circulation of HIV-1 strains with resistance mutations to three antiretroviral classes in patients from Central West Brazil who have never received antiretroviral treatment. As ART use expands in the country it becomes increasingly important to monitor HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance mutations in areas where the epidemic is spreading as Central Brazil. Recent data showing an increase in primary drug resistance may

promote a discussion about public health policy regarding the usefulness of the recommendation of pre-ART genotypic testing to naive patients in Brazil.

Acknowledgments

This study was supported by UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health (Grant #310-06). Cardoso, LPV was supported by a scholarship from the National Counsel of Technological and Scientific Development/CNPq (Process 141820/2006-3). Stefani, MMA is a recipient of fellowship from CNPq (grant#304869/2008-2). We are thankful to the medical staff of HDT/HAA/SUS for support during recruitment. We also thank Ludmila Bandeira and Dr Alexandre Coelho for technical support with ABI Prism apparatus; Dr Ricardo Diaz and Dr Maria Sucupira for training; Dr Amilcar Tanuri for helpful discussions; Angélica Martins for phylogenetic advice and Ângela Viegas for sample collection.

Conflict of interest declaration

All authors had no conflicts.

References

1. Brígido LF, Franco HM, Custodio RM, Oliveira CA, Ferreira JL, Eira M et al. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; **21**: 673-82.
2. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC Morgado MG, Pires IL, Brigido L et al. Brazilian network for HIV drug resistance surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; **17**: 1063-9.
3. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008; **22**: 433-8.

4. Sa-Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS Munerato P, Brunstein A, Fusuma E et al. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; **21**: 145-51.
5. 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.
6. Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA et al. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 2007; **39**: 205-9.
7. Soares EAJM, Martínez AMB, Souza TM, Santos AF, Hora V, Silveira J et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; **19** (Suppl 4): 81-6.
8. Teixeira PR, Vitoria MA, Barcarolo J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. *AIDS* 2004. **18** (Suppl. 3): 5-7.
9. Galvão J. Access to antiretroviral drugs in Brazil. *Lancet* 2002; **360**:1862-5.
10. Bangsberg DR, Perry S, Charlebois ED, Clark RA, Roberston M, Zolopa AR et al. Non-adherence to highly active antiretroviral therapy predicts progression to AIDS. *AIDS* 2001; **15**:1181-3.
11. Nunn AS, Fonseca EM, Bastos FI, Gruskin S, Salomon JA. Evolution of antiretroviral drug costs in Brazil in the context of free and universal access to AIDS treatment. *PLOS* 2007; **4**: 1-14.
12. Oette M, Kaiser R, Däumer M, Petch R, Fätkenheuer G, Carls H et al. Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; **41**: 573-81.
13. Frenkel LM, Wagner LE, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S. Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. *J Clin Microbiol* 1995; **33**: 342-347.

14. Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan T et al. Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Med* 1996; **2**: 753-759.
15. Lehvaslaiho H, Hide W, Oliveira T. South African National Bioinformatics Institute, University of Western Cape, South Africa. <http://www.sanbi.ac.za>. (January/2009, date last accessed).
16. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; **41**: 95-8.
17. Oliveira T, Deforche K, Cassol S, Salminen M, Paraskevis D, Seebregts C et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. *Bioinformatics* 2005; **21**: 3797-800.
18. Zhang M, Schultz AK, Calef C, Kuiken C, Leitner T, Korber B et al. jpHMM at GOBICS: a web server to detect genomic recombinations in HIV-1. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: 463-5.
19. 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.
20. 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.
21. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol and Evol* 2007; **24**: 1596-9.
22. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999; **73**:152-60.

23. Barreto CC, Nishyia A, Araújo 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.
24. Dumans AT, Soares MA, Pieniazek D, Kalish ML, De Vroey V, Hertogs K et al. 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.
25. 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.
26. Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Morgado MG. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**:143-9.
27. Medeiros LB, Lacerda HR, Cavalcanti, MAS, Albuquerque M. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; **101**: 845-9.
28. Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhacke RD, Ferreira JL 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: 201-7.
29. Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS* 2004; **18** (Suppl 1): 9-13.
30. Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N 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**: 251-3.

31. Sucupira MC, Caseiro MM, Alves K, Tescarollo G, Janini LM, Sabino EC 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.
32. World Health Organization. 2003. Guidelines for Surveillance of HIV Drug Resistance. http://wwwn.cdc.gov/dls/ila/cd/who-afro/resisguide12_12.pdf (November/2008, date last accessed).
33. Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, Busch MP et al. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS* 2004; **18**:1683-9.
34. Brenner B, Routy JP, Quan Y, Moisi D, Oliveira M, Turner D et al. Persistence of multidrug-resistant HIV-1 in primary infection leading to superinfection. *AIDS* 2004; **20**:1653-60.
35. Günthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; **14**: 869-76.
36. Jourdain G, Ngo-Giang-Huong N, Le Coeur S, Bowonwatanuwong C, Kantipong P, Leechanachai P et al. Intrapartum exposure to nevirapine and subsequent maternal responses to nevirapine-based antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 2004; **15**: 229-40.
37. Johnson JA, Li JF, Wei X, Lipscomb J, Irlbeck D, Craig C et al. Minority HIV-1 drug resistance mutations are present in antiretroviral treatment-naïve populations and associate with reduced treatment efficacy. *PLoS Med* 2008; **29**:158.
38. Mitsuya Y, Varghese V, Wang C, Liu TF, Holmes SP, Jayakumar P et al. Minority HIV-1 variants in antiretroviral naive persons with reverse transcriptase codon 215 revertant mutations. *J Virol* 2008; **82**: 10747-55.
39. Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Vincenti A, D'Elia S, Chiodo F 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**: 227-35.

40. de Ronde A, van Dooren M, van Der Hoek L, Bouwhuis D, de Rooij E, van Gemen B et al. Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol* 2001; **75**: 595-602.
41. Vérias NM, Vérias VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM et al. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007; **23**: 1481-90.
42. Pereira GA, Stefani MM, Araújo-Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg* 2004; **71**: 679-84.
43. Pereira GA, Stefani MM, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira EM, Carneiro MA et al. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J Med Virol* 2006; **78**: 719-23.
44. Sanabani S, Neto WK, 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 São Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 2006; **6**:368-77.

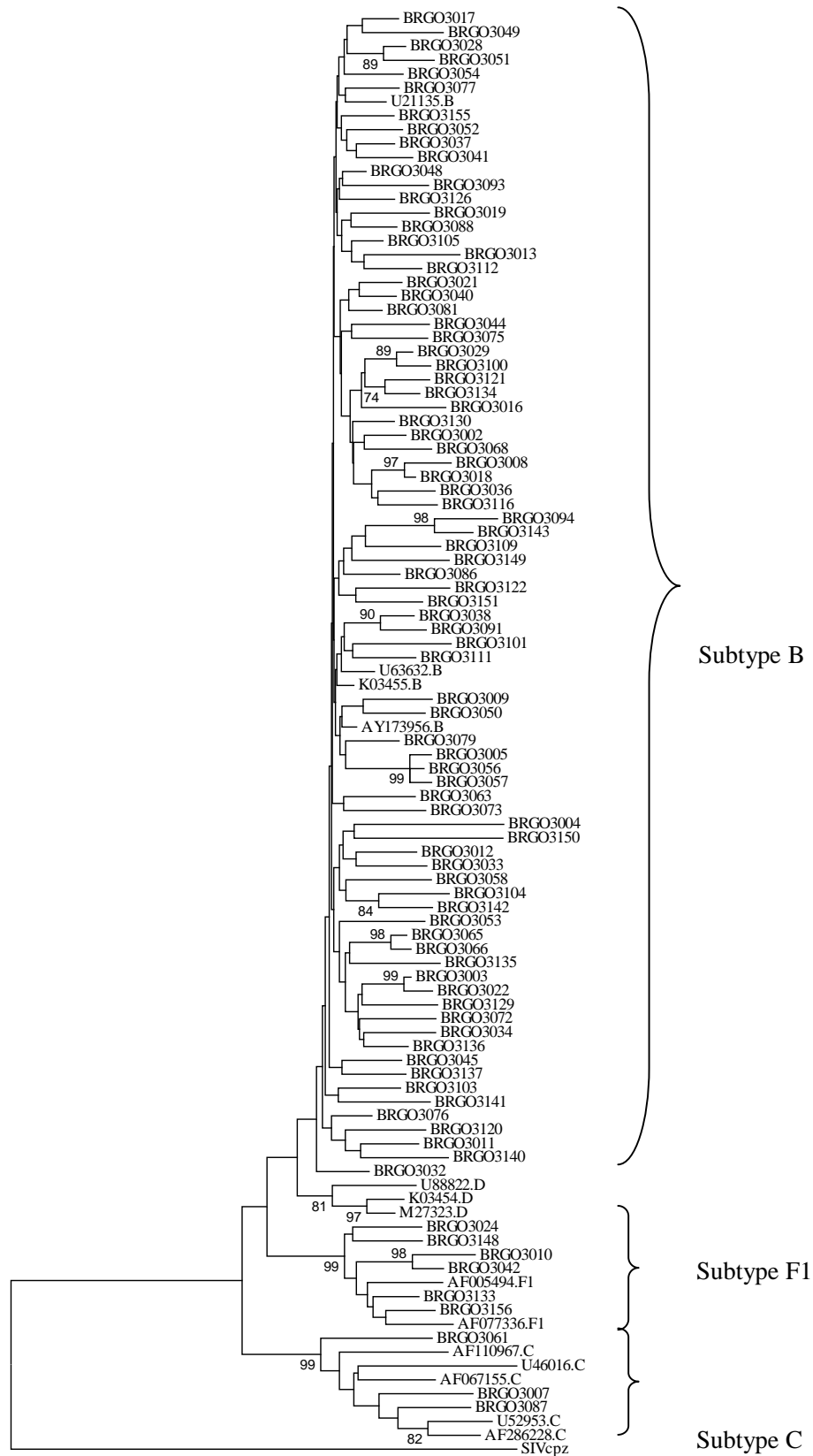


Fig. 1. Phylogenetic classification in PR and RT genes. The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analysis are subtype B, AY173956, K03455 and U63632; subtype C, U52953, AF286228, AF110967, U46016 and AF067155; subtype D, K03454, M27323 and U88822; subtype F, AF077336, AF005494 and the simian immunodeficiency virus sequence from chimpanzee (SIVcpz), X52154.

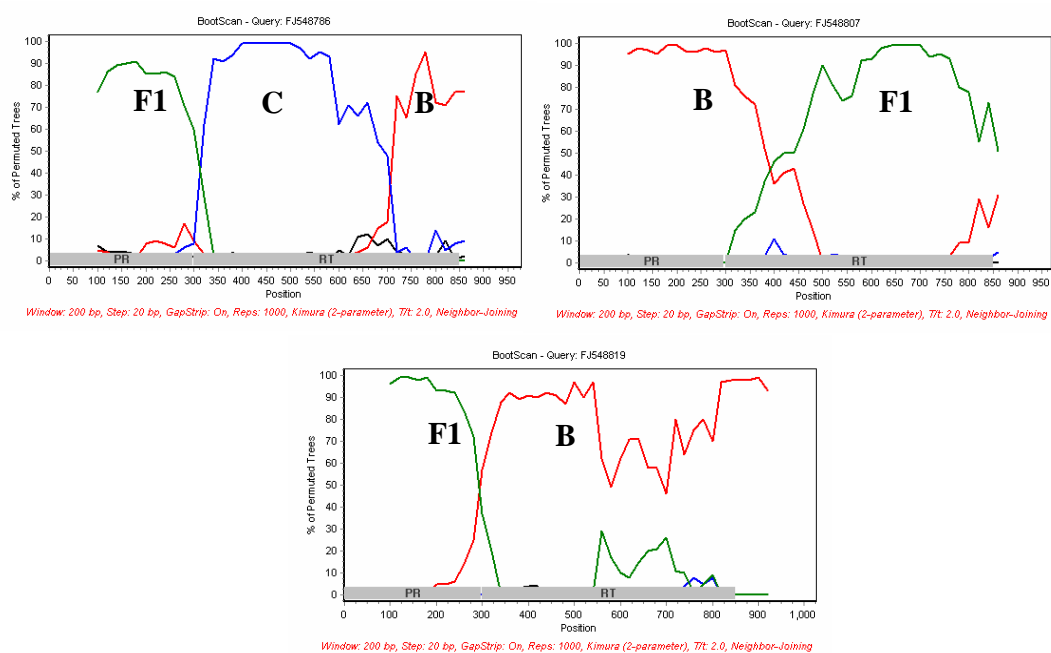


Fig. 2. Bootscanning analysis of HIV-1 *pol* sequences of 3/8 recombinant viruses from Central West Brazil. The GenBank accession numbers used in the analysis are subtype A, AF004885; subtype B, AY173956, K03455; subtype C, U52953, AF286228, U46016, subtype F, AF077336, AF005494.

Table 1

Distribution of HIV-1 subtypes by age, gender, route of infection, year of diagnosis and level of primary resistance in patients from Central West Brazil.

	Subtype B		Subtype F1		Subtype C		Mosaic F1 ^{PR} /B ^{RT} , B ^{PR} /F1 ^{RT} , F1 ^{PR} /CB ^{RT}		Total
	n	%	n	%	n	%	n	%	n
	80	82.5	6	6.2	3	3.1	8	8.2	97
Age (year)									
2-18	2	2.1	-	-	1	1	-	-	3
20-40	60	61.8	6	6.2	2	2.1	5	5.1	73
> 40	18	18.6	-	-	-	-	3	3.1	21
Gender									
Male	57	58.8	4	4.1	1	1	4	4.1	66
Female	23	23.7	2	2.1	2	2.1	4	4.1	31
Route of infection									
Sexual	58	59.8	5	5.2	3	3.1	6	6.2	72
IDU	1	1	-	-	-	-	1	1	2
Vertical	1	1	-	-	-	-	-	-	1
MRF	2	2.1	-	-	-	-	-	-	2
Unkown	18	18.6	1	1	-	-	1	1	20
HIV-1 diagnosis (year)									
1997-2006	22	22.7	4	4.1	1	1	4	4.1	31
>2007	58	59.8	2	2.1	2	2.1	4	4.1	66
Primary resistance (SDRM)	9	9.3	-	-	-	-	1	1	10
Primary resistance (IAS-USA)	7	7.2	-	-	-	-	1	1	8

IDU: Intravenous drug user; vertical: vertical transmission; MRF: multiple risk factors (men who have sex with men (MSM) + IDU), SDRM: Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation, IAS-USA: International AIDS Society-USA.

Table 2

Amino acid substitutions in the PR and RT resistance-related codons of patients with primary resistance to antiretroviral drugs.

GenBank accession number	Route of infection/ Diagnosis (year)	Sex/ age (years)/ HIV-1 Subtype	PI major mutations	PI minor mutations	NRTI mutations	NNRTI mutations	Resistance profile		
							Low	Intermediate	High
FJ548807	IDU/2002	M/27/B/F1	-	L10I	-	V90I, K103N	-	-	NVP, DLV, EFV
FJ548812	MSM/2006	M/37/B	-		M41L, T215D		ABC, ddI, TDF	AZT, d4T	-
FJ548813	MSM/2007	M/28/B	-	-	V118I, T215D	Y188L	AZT, d4T, ETR	DLV	NVP, EFV
FJ548822	Hetero/2007	M/32/B	-	-	T215S	-	AZT, d4T	-	-
FJ594140	IDU/2007	M/45/B	M46L	-	L210W	-	AZT, d4T	NFV	-
FJ594159	Hetero/2008	F/50/B	-	A71T	T69N, V118I	Y181C	-	EFV, ETR	DLV, NVP
FJ594160	MSM/2006	M/30/B	-	-	T215S	K101E, G190S	AZT, d4T	DLV, ETR	EFV, NVP
FJ594175	Hetero/2006	F/28B	-	L10I, A71T	L210W	-	AZT, d4T	-	-
FJ594182	MSM/2007	M/26/B	-	Q58E, I85V	-	-	TPV	-	-
FJ594183	MSM/2008	M/31/B	M46I, L90M	L33I	-	-	FPV, LPV	ATV, IDV, SQV	NFV

PI: protease gene; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Hetero: heterosexual; IDU: intravenous drug user; MSM: men who have sex with men. M: male, F: female. ATV: atazanavir; AZT: zidovudine; DLV: delavirdine; d4T: stavudine; EFV: efavirenz; ETR: etravirine; FPV: fosamprenavir; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine, SQV: saquinavir and TPV: tipranavir.

5. ARTIGO 2 – RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA

Artigo Aceito para publicação na Revista **AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES**

AIDS Research and Human Retroviruses

----- Mensagem Original -----

De: btf@lanl.gov

Para: mariane.stefani@pq.cnpq.br, ludimilacardoso@gmail.com

Assunto: Decision on Manuscript ID AID-2009-0060.R1

Data: 30 de junho de 2009 13:06

Dear Dr. Stefani

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "High Level of Multidrug Resistance Mutations in HIV-1 pol Gene and Resistance-Associated Mutations to Enfuvirtide (T-20) Among Antiretroviral Experienced Patients from Central Brazil" in its current form for publication in AIDS Research and Human Retroviruses. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

All authors will get a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement form.

Failure by all authors to submit this form may result in a delay of publication

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Authors who would like their papers to be made free online immediately after publication can sign up for Liebert Open Option for a one-time fee. If the paper has NIH funding, it will also be uploaded onto PubMedCentral on behalf of the author. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of AIDS Research and Human Retroviruses, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Brian Foley

Editor, AIDS Research and Human Retroviruses, btf@lanl.gov

Reviewer(s)' Comments to Author:

Thank you for making the changes as requested by the reviewers.

High Level of Multidrug Resistance Mutations in HIV-1 *pol* Gene and Resistance-Associated Mutations to Enfuvirtide (T-20) Among Antiretroviral Experienced Patients from Central Brazil

Ludimila Paula Vaz Cardoso

Mariane Martins de Araújo Stefani

Affiliation:

Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Goiania/Goias, Brazil.

Running Title: HIV-1 Multidrug Resistance Mutations in Central West Brazil

Correspondence: Mariane Martins de Araújo Stefani. Address: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia-Goiás/Brazil. Fax: 55 62 3209 6363 Phone: 55 62 3209 61 11. email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Abstract

HIV-1 resistance mutations to antiretroviral (ARV) drugs (nucleoside reverse transcriptase inhibitors - NRTI, non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors - NNRTI and protease inhibitors - PI) represent a challenge for sustainable virologic and immunologic responses. HIV-1 phylogenetic diversity and ARV resistance mutations associated to protease (PR) and reverse transcriptase (RT) were assessed among 48 ARV experienced patients from Goiania/Goias, central west Brazil. The gp41 resistance mutations to fusion inhibitor (T-20) were analyzed among multidrug resistant (MDR) patients. PR, partial RT and gp41 genes were amplified and sequenced from plasma RNA. HIV-1 subtype was assigned by phylogenetic analysis. ARV mutations in PR/RT were analyzed by Stanford Database. T-20 resistance mutations in gp41 were identified by Stanford, Los Alamos Database and other sources. Subtype B represented 79.2% (38/48), subtype F1 4.2% (2/48), subtype C 2.1% (1/48), F1^{PR}/B^{RT} 8.3% (4/48) and B^{PR}/F1^{RT} 6.3% (3/48). Secondary drug resistance was observed in 79% (38/48): NRTI resistance (n=1), NNRTI resistance (n=1), PI+NRTI or NRTI+NNRTI resistance (n=20), PI+NRTI+NNRTI resistance, considered MDR (n=16). Almost half MDR patients had viral loads below 10000 copies/ml. The gp41 sequences from 14 MDR revealed one F1^{PR}/B^{RT}/F1^{ENV} recombinant and 13 subtype B^{PR}/B^{RT}/B^{ENV} isolates. G36E, N42T and N43S T-20 resistance mutations were observed in 3 MDR patients, two of them previously treated with T-20 and the other had never used T-20. Our data among ARV experienced patients showed high proportion of drug resistance mutations and MDR. T-20 resistance mutations were detected among MDR patients corroborating the importance of T-20 genotyping for clinical management and salvage therapy.

Introduction

Despite great advances in antiretroviral (ARV) therapy, sustainable virologic and immunologic responses among highly treatment-experienced patients infected with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) remains a challenge. Poor penetration of drugs into HIV-1 reservoir sites, drug toxicity, changes in bioavailability and metabolism and lack of adherence to complex treatment regimens contribute to this scenario. Highly active ARV therapy (HAART) usually includes at least 3 drugs from well-established classes: nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI) and/or protease inhibitors (PI). HAART has substantially reduced morbidity and mortality of patients; however development of resistance mutations may lead to progressive disease and to an increasing number of patients with fewer treatment options.¹

Salvage therapy after virus rebound should include a drug from an ARV class not previously used. Newer drugs from well established classes and new classes of ARV to different life cycle targets such as Enfuvirtide (T-20), a fusion inhibitor, represent important salvage therapy options.² Brazil, which was the first developing country to implement universal access to free ARV, has included T-20 for salvage therapy in its guidelines in 2005. Resistance mutations associated with T-20 have been described along the 36-45 amino acid sequence in HIV-1 subtype B gp41 consensus sequence.³

Brazil is a vast and diverse country where HIV-1 subtypes B, F1 and C and multiple recombinant forms, mainly B/F1 and B/C co-circulate.^{4,5,6,7,8} Only recently new information about the molecular epidemiology of HIV-1 in other Brazilian areas away from the epicenter of the epidemics, in the southeast region, has become available.^{9,10,11,12,13}

In this study we evaluated HIV-1 phylogenetic diversity and the prevalence of secondary ARV resistance mutations associated to protease (PR) and reverse transcriptase (RT) inhibitors among

patients from central west Brazil. Moreover among multidrug resistant (MDR) patients, we have described polymorphisms and drug resistance mutations in *env* gene (gp41) associated with T-20.

Materials and Methods

Study population

This study included ARV experienced HIV-1 infected patients recruited between 2007-2008 at Anuar Auad Hospital, HAA/HDT/SUS, Goiania city, capital of Goias State, central west Brazil. Eligible ARV experienced patients included subjects from both sexes in any age range and exposure category, under current ARV treatment composed by at least 3 drugs (2 NRTI plus 1 PI or 2 NRTI plus 1 NNRTI) with and without criteria for virologic failure (patients under ARV therapy with previous undetectable viral load which further became positive or viral load above 400 copies/ml after 24 weeks ARV or above 50 copies/ml after 48 weeks of ARV therapy or patients with previous sustained viral suppression with rebound viral load above 400 copies/ml). Moreover female patients who have previously received prophylactic ARV therapy to prevent vertical transmission were included. Socio-behavioral data, clinical characteristics and laboratory results (HIV RNA load: bDNA, Bayer Diagnostic; NASBA, Organon Teknika and RT-PCR, Roche Diagnostic and CD4 counts: FACSCalibur, Becton Dickison) were obtained in a standardized questionnaire. Research Ethical Committees approved this study (HAA/HDT/SUS, CEPMHA/HC/UFG Protocol # 073/05). All participants signed the informed consent and for patients under 18 years of age, the informed consent was signed by one of the parents or the legal tutor.

Genetic analysis

RNA was extracted from plasma (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and retrotranscribed into complementary DNA (cDNA) (Invitrogen). Entire HIV-1 PR (corresponding to positions 2253-2549 relative to HXB2 genome, GenBank accession n° K03455), approximately 750bp of RT gene (corresponding to positions 2550-3299 relative to HXB2 genome) and 766bp of HIV-1 gp41 gene (corresponding to positions 7641-8406 relative to HXB2 genome) were amplified by nested polymerase chain reaction (nested-PCR). The external and internal pairs of primers employed were respectively: K1/K2 and DP10/F2 primers for HIV-1 PR/RT genes. HR /HJ 54 and Ava I/HJ 53 primers were used for HIV-1 gp41 gene. The samples were sequenced by DYEnamic ET Dye Terminator kit (GE Healthcare, USA) at Federal University of Goiás using an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US). All generated sequences were subjected to quality control analysis by HIV Quality Analysis Pipeline Tool to check for contamination.¹⁴ The alignment of sequences by Bioedit software were also screened by visual inspection to ensure that there were no sample mix-ups or contamination.¹⁵

Phylogenetic analysis

HIV-1 subtypes were identified by REGA automated genotyping tool version 2.0 and by comparing them to reference sequences from the Los Alamos HIV database.^{16,17} All sequences were aligned using Clustal X. Trees were performed by Neighbor-Joining (NJ) method under Kimura's two-parameter correction (1000 replicates) using MEGA4 software.^{18,19,20} Isolates with discordant PR/RT or ENV subtypes were analyzed by Simplot 3.5.1.²¹ The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analysis are subtype B, AY173956, AY331295, AY423387, DQ853463, K03455 and U63632; subtype C, AF286228, AF110967,

AY772699, U46016, U52953 and AF067155; subtype D, AY371157, K03454, M27323 and U88822; subtype F, AF077336, AF005494 and AJ249238 and the simian immunodeficiency virus sequences from chimpanzee (SIVcpz), X52154.

Resistance analysis

ARV mutation susceptibility profile in PR and RT genes was analyzed by Stanford HIV Drug Resistance Database (Accessed: January/2009). HIV-1 *env* gp41 mutations associated with T-20 drug were identified according to Stanford online HIV Drug Resistance Database (G36D/E/S, V38A/E/M, Q40H and N43D), Los Alamos HIV Drug Resistance Database (G36V, N42D/T, N43D, L44M and L45M) and other sources (I37V, V38G, Q39R and N43K/S).^{22,23,24,25} Other differences between HIV-1 *env* gp41 amino acid translation and the reference sequence HXB2 were designated as gp41 polymorphisms. MDR HIV-1 isolates were defined as the ones presenting mutations associated with high-level genotypic drug resistance to the 3 major ARV classes: PI, NRTI and NNRTI.

Statistical analysis

Frequencies, medians of main variables and 95% confidence interval (CI) and statistical significance was assessed by Mann-Whitney for comparison between two groups ($p < 0.05$) using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software for Windows version 13.0 (Chicago, IL, USA).

Results

Patients' characteristics

This study recruited 54 consecutive HIV-1 infected patients and for 48 of them HIV-1 PR and RT *pol* genes were amplified, sequenced and analyzed. Patients under ARV therapy included (n=48) were diagnosed from 1984-2007, the median age was 39 years (7-64 years range), 58.3% were males. The major risk factor identified was heterosexual unprotected sex (52.1%), 20.8% were men who have sex with men (MSM), 12.5% were vertical transmission cases, one was an intravenous drug user (IDU) and another was an IDU MSM. For 10.4% of the patients the route of transmission was ignored. The median of CD4 cells counts was 275.5 cells/ μ l (3-1226 cells/ μ l range). Plasma viral loads of 47.9% (23/48) of the patients were below 10000 copies/ml, between 10000 and 100000 copies/ml for 35.4% (17/48) and over 100000 copies/ml for 16.7% (8/48) of the participants.

Forty patients were under ARV therapy, one patient was treated from 1997-2005 when treatment was discontinued. Seven female patients had been submitted to prophylactic treatment to vertical transmission from 2003-2006: 2 of them were pregnant during the study period and sample was collected before the second prophylactic treatment and for the remaining 5 female patients, sample was collected before therapeutic treatment.

Phylogenetic analysis of PR and RT sequences

The majority of sequences (41/48, 85.5%) clustered with a single HIV-1 subtype in both the PR and RT genes: 79.2% (38/48) were assigned subtype B, 4.2% (2/48) were subtype F1 and 2.1% (1/48) was classified as subtype C (Figure 1). Seven isolates (14.6%) had discordant HIV-1 subtypes in PR and RT genes and bootscanning analysis confirmed recombination: F1/B (n=4; 8.3%) and B/F1 (n=3; 6.3%) (data not shown).

Resistance analysis of PR and RT sequences

Most ARV experienced patients tested (38/48, 79.2%) presented HIV-1 resistance mutations (CI 95%, 56.4-82%). Regarding year of diagnosis of 38 patients with resistance mutations most (n=27) were diagnosed from 1990-1999, 10 were diagnosed from 2000-2007 and one was diagnosed in 1984. One female patient with secondary resistance mutation was submitted to AZT + nevirapine (NVP) prophylaxis to vertical transmission in 2006. The rest of the patients with resistance mutations were under ARV therapy. Among patients included, 5 were considered virologic failure and all of them had drug resistance mutations.

Two patients (4.2%) had resistance mutations to RT inhibitors: one to NRTI and the other to NNRTI. Twenty patients (41.7%) presented mutations to two ARV classes: PI and NRTI, PI and NNRTI or NRTI and NNRTI. Sixteen patients (33.3%) had resistance mutations to PI, NRTI and NNRTI (MDR patients) and 2 of them were virologic failure. Six out of 38 patients with resistance mutations were vertical transmission cases (7-15 years old), 3 had mutations to 2 ARV classes and 3 were MDR.

Figures 2A, B and C depict PI, NRTI and NNRTI mutations respectively. The 16 MDR patients were diagnosed from 1992-1999, all of them were already symptomatic AIDS cases at diagnosis and initiated treatment after diagnosis, except for the patient diagnosed in 1992 that initiated treatment 4 years later. All of the MDR patients were considered adherent to ARV medication according to the information retrieved from their medical files.

Excluding the 16 MDR patients, the median time of treatment of the 22 patients with resistance mutations was 6 years (ranging from 1 month to 13 years) and the median time of treatment among the 16 MDR patients was 11 years (8-12 years range) ($p=0.0002$). Median CD4 values of 22 patients with resistance mutations was 343.5 cells/ μ l (3-1226 cells/ μ l) and 134.5 cells/ μ l (11-926 cells/ μ l range) among 16 MDR patients ($p=0.22$). Medians of viral loads of patients with

resistance mutations was 9243 copies/ml (1181-67003 copies/ml range) and 28013 copies/ml (2228-202675 copies/ml range) for MDR patients ($p=0.092$).

Regarding viral diversity 78.9% (30/38) were assigned subtype B^{PR}/B^{RT}, 4 were F1^{PR}/B^{RT}, 2 were B^{PR}/F1^{RT} and 2 were F1^{PR}/F1^{RT} mosaics.

The gp41 polymorphisms and T-20 resistance mutations among MDR HIV-1 patients

The gp41 sequences from 14 MDR patients (13 assigned subtype B^{PR}/B^{RT}/B^{ENV} and one assigned subtype F1^{PR}/B^{RT}/F1^{ENV}) indicated that 21.4% (3/14) presented T-20 resistance mutations, 2 of them were under T-20 salvage therapy and the other had never used T20. G36E mutation was observed in one patient, another had N42T mutation. The third case had N42T and N43S mutations in heptad repeat domain (HR1) and the S138A compensatory mutation in the HR2. Table 1 depicts resistance mutations associated to PR, RT and T-20 in MDR patients.

All 14 sequences from MDR HIV-1 infected patients presented several polymorphisms related to T-20. The most frequent polymorphisms were H114N and I69V present in all 14 patients, D121E and H132Y (n=13), T115M (n=12), L173I (n=11), N125D and V182I (n=10), A101T, E119Q and L54M (n=9), E148D, I135L and N163D (n=8), E109S, K77R, L7M and N113D (n=7), A189T, R122K and S133N (n=6), A96T, E109D/N, G3T, S107N, S129G, S129Q and S157N (n=5).

Discussion

In the current study 33.3% MDR patients were observed among ARV experienced patients from Central West Brazil. The prevalence of secondary ARV resistance in Brazil is high and the reported frequencies of MDR HIV-1 isolates have also been increasing. Different proportions of MDR isolates among treatment-experienced patients have been observed in the country: 36.8%

in the southeast and 18.9% in the northeast.^{10,26} It's well accepted that the rate of MDR depends on the level of exposure to ARV drugs. These regional differences in the proportion of MDR among southeast-central west and northeast may be due to the earlier introduction and wider use of ARV therapy in the southeast-central west when compared to the northeast. In northeast Brazil the AIDS epidemic has been introduced later and delayed or inadequate access to diagnostic and therapeutic measures, particularly to ARV therapy has been reported²⁷.

In our study group we have identified patients with resistance mutations to one or two classes of ARV drugs and patients resistant to all classes of ARV drugs (MDR). It is noteworthy that the patterns of resistance observed between these two groups were related to the time ARV therapy was started. MDR patients had been treated longer than patients with resistance mutations and this difference had a highly significant *p* value. On the other hand, no statistical significant difference was observed between medians of CD4 cell counts and viral loads of these two groups. However, almost half of our MDR patients had viral loads below 10000 copies/ml, indicating important accumulation of multidrug resistance among patients with lower plasma viremia.

The fusion of HIV-1 into target cells is mediated by ENV proteins gp120 and gp41 which has two highly conserved heptad repeat domains (HR1 and HR2) in its ectodomain. HR1 and HR2 participate in the formation of the six-helix bundle which is critical for the fusion of HIV-1 envelope and target cell membrane.²⁸ T-20 is a 36 amino acid synthetic peptide that mimics the amino acids 127-162 of the HR2 and prevents the formation of the six-helix bundle blocking HIV-1 entry into host cells. T-20 was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) in 2003 and became available for salvage therapy in Brazil in 2005.²⁹ Previous studies in patients under HAART with resistance mutations in PR and RT genes showed gp41 mutations which resulted in significant loss of susceptibility to T-20.^{30,31} A recent Brazilian study showed

G36D mutation in 5/65 MDR patients who had never been treated with T-20.³² Our study showed G36E, N42T and N43S resistance mutations related to T-20 among 3 MDR patients, 2 of them were under T-20 salvage therapy for 2-3 years and the other had never received T-20. The identification of T-20 mutations in MDR patients favors the possibility that resistance mutations in PR and RT genes can promote T-20 resistance mutations resulting in lower T-20 efficacy for salvage therapy.³¹ Despite the small sample size, the evidence of 3/14 MDR patients with T-20 mutation is a strong indication of the benefit of T-20 genotyping among MDR patients. However, a bigger sampling is necessary in order to define the cost-effectiveness of T-20 genotyping recommendation for patients highly experienced with other ARV.

The present study confirms the inland dissemination of B/F1 recombinant forms identified in 14.6% of patients under treatment. Moreover sporadic cases of subtypes F1 and C were also detected. These *pol* sequence data corroborate previous screening studies which employed *env* and *gag* heteroduplex mobility assays (HMA).^{9,12,33,34} Although HIV-1 subtype C has been first detected in central west Brazil (Goias State) almost a decade ago, its presence is still occasional in this region. In our study HIV-1 resistance mutations to T20 were seen in subtype B and B/F1 recombinant. Further studies are necessary to evaluate the impact of HIV-1 genetic diversity on the emergence of resistance-associated mutations to T20.

Our study indicates high proportion of secondary drug resistance mutations and multidrug resistance mutations among treatment experienced patients. It also adds gp41 sequence data related to T-20 resistance mutations and polymorphisms in MDR patients from inland Brazil. T-20 has been shown to be an effective ARV treatment; however drug resistance mutations may compromise its salvage therapy efficacy for patients with limited remaining treatment options. Our phylogenetic data of isolates from inland Brazil contribute to the molecular epidemiology of HIV-1 in the country.

Acknowledgments

This study was supported by UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health (Grant #310-06). Stefani MMA is a recipient of a fellowship from The National Council of Technological and Scientific Development/CNPq (grant # 304869/2008-2) and Cardoso LPV was supported by a fellowship from CNPq (grant# 141820/2006-3). We thank Dr Amilcar Tanuri for helpful discussions and Angélica Nascimento for providing ENV primers sequences. We acknowledge the technical assistance of Ms Ângela Viegas during sample collection.

Sequence Data

GenBank accession numbers of the sequences presented in this study are FJ618909-FJ618910, FJ638422-FJ638467 and FJ687040-FJ687053.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Petrella M, Brenner B, Loomba H, Wainberg MA: HIV drug resistance and implications for the introduction of antiretroviral therapy in resource-poor countries. *Drug Resist Updat* 2001;4:339-346.
2. Lalezari JP, Henry K, O'Hearn M, *et al*: Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med* 2003;348:2175-2185.
3. Xu L, Hue S, Taylor S, *et al*: Minimal variation in T-20 binding domain of different HIV-1 subtypes from antiretroviral naïve and experienced patients. *AIDS* 2002;16:1684-1686.

4. 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.
5. Brígido 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.
6. Sa-Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS, *et al*: Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005;21:145-151.
7. 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.
8. Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG: Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008;22:433-438.
9. Pereira GA, Stefani MM, Martelli CM, *et al*: Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J Med Virol* 2006;78:719-723.
10. Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S: Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:785-792.
11. Medeiros MS, Arruda EAG, Guerrant RL, *et al*. Genotype Testing and Antiretroviral Resistance Profiles from HIV-1 Patients Experiencing Therapeutic Failure in Northeast Brazil *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2007;11:390-394.

12. Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, *et al*: Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 2007;39:205-209.
13. Vêras NMC, Vêras VS, Ramalho E, *et al*. HIV Type 1 Genetic Variability In Central Brazil. *Aids Research and Human Retroviruses* 2007;23:1481-1489.
14. Lehvaslaiho H, Hide W, Oliveira T: South African National Bioinformatics Institute, University of Western Cape, South Africa. <http://www.sanbi.ac.za>. Accessed January, 2009.
15. Hall TA: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/MT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.
16. Los Alamos HIV database: <http://ww.hiv.lanl.gov>. Accessed February, 2009.
17. Oliveira T, Deforche K, Cassol S, *et al*: An Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics* 2005;21:3797-3800.
18. 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;25:4876-4882.
19. Kimura M: A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980;16:111-120.
20. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol and Evol* 2007;24:1596-1599.
21. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG: Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 1999;73:152-160.
22. Stanford HIV Resistance Database: Antiretroviral drug summaries: Enfuvirtide (ENF, Fuzion). <http://hivdb.stanford.edu>. Accessed February, 2009.

23. Los Alamos HIV Drug Resistance Database: http://resdb.lanl.gov/Resist_DB. Accessed February, 2009.
24. Eshleman SH, Hudelson SE, Bruce R, *et al*: Analysis of HIV Type 1 gp41 Sequences in Diverse HIV Type 1 Strains. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:1593-1598.
25. Shafer RW, Schapiro JM: HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev* 2008;10:67-84.
26. Sucupira MC, Souza IE, Costa LJ, Scheinberg MA, Diaz RS: Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil, *Antiviral. Antivir Ther* 2001;6:263-264.
27. Brito AM, 2, Castilho EA, Szwarcwald CL. Regional Patterns of the Temporal Evolution of the AIDS Epidemic in Brazil Following the Introduction of Antiretroviral Therapy. *BJID* 2005;9:9-19.
28. Moore JP, Doms RW: The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *PNAS* 2003;100:10598-10602.
29. Robertson D: US FDA approves new class of HIV therapeutics *Nature Biotechnology* 2003;21:470-471.
30. Poveda E, Rodés B, Labernardière JL, *et al*. Evolution of genotypic and phenotypic resistance to Enfuvirtide in HIV-infected patients experiencing prolonged virologic failure. *J Med Virol* 2004;74:21-28.
31. Si-Mohamed A, Piketty C, Tisserand P, *et al*. Increased polymorphism in the HR-1 gp41 env gene encoding the enfuvirtide (T-20) target in HIV-1 variants harboring multiple antiretroviral drug resistance mutations in the pol gene. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007;44:1-5.

32. Oliveira ACA, Martins AN, Pires AFNPC, *et al.* Enfurvitide (T-20) Resistance-Related Mutations in HIV Type 1 Subtypes B, C and F Isolates from Brazilian Patients Failing HAART. *Aids Research and Human Retroviruses* 2009; 25:193-198.
33. Stefani MM, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvao-Castro B: Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;2:205-207.
34. Pereira GA, Stefani MM, Araújo-Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co-infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg* 2004;71:679-684.

Address reprint requests to:

Mariane Martins de Araújo Stefani

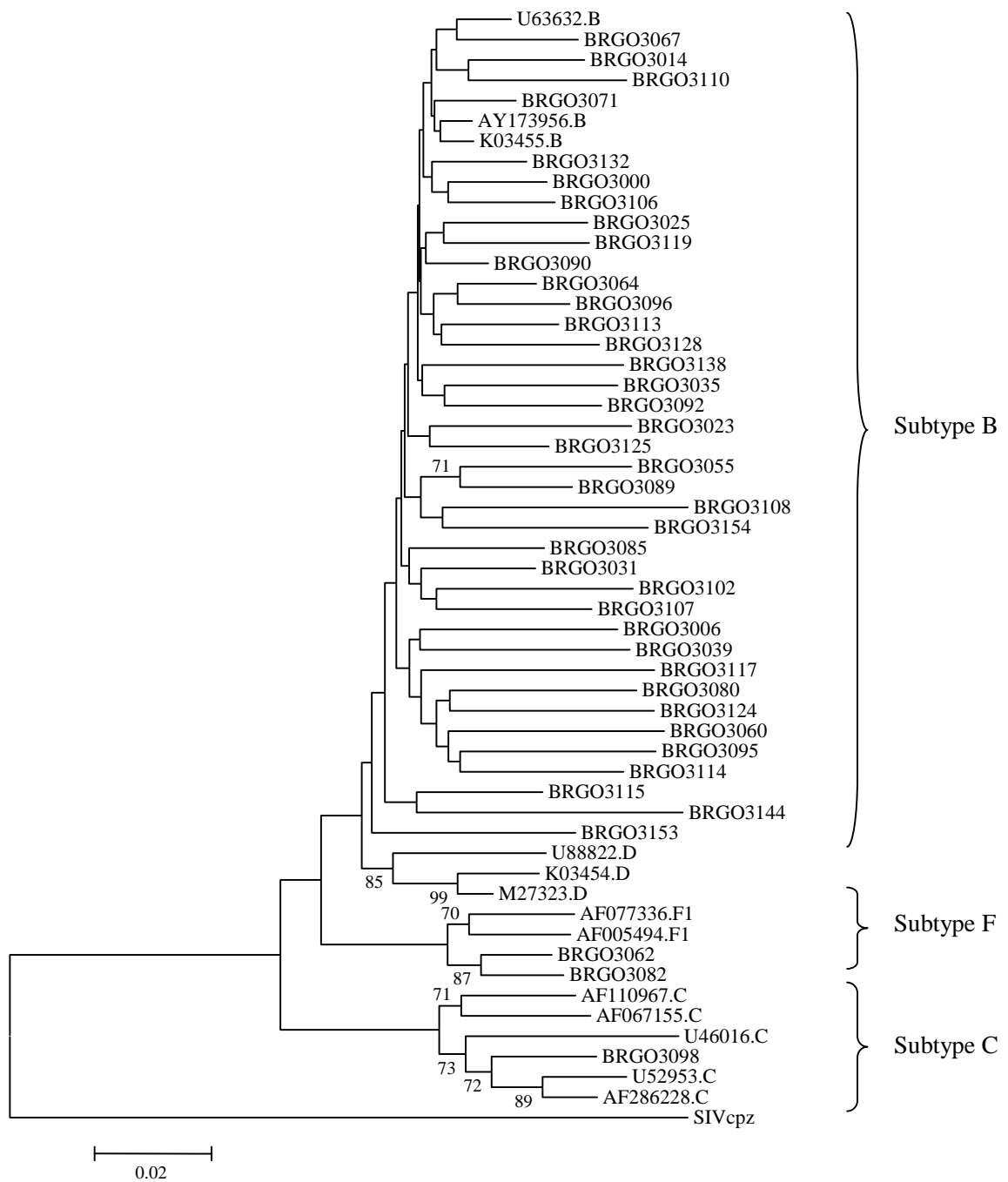
Universidade Federal de Goiás

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Rua 235, s/n Setor Universitário

Goiânia GO, Brazil 74605-050

email: mariane.stefani@pq.cnpq.br



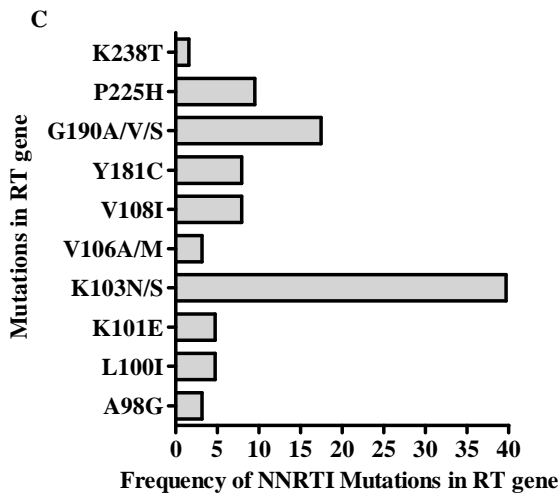
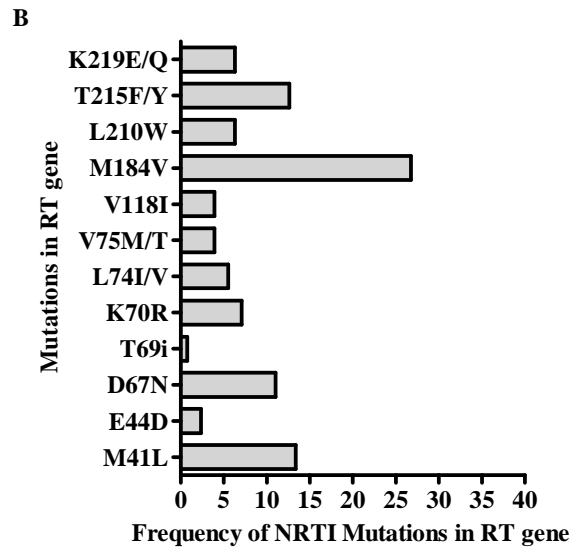
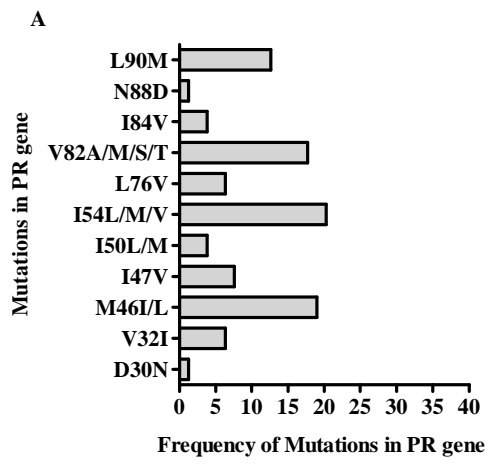


FIG. 1. Phylogenetic classification. The tree was generated by NJ method under Kimura's two parameter correction. Bootstrap (1000 replicates) values above 70% were considered significant. The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analysis are subtype B, AY173956, K03455 and U63632; subtype C, AF286228, U46016, U52953 and AF067155; subtype D, K03454, M27323 and U88822; subtype F, AF077336, AF005494 and the simian immunodeficiency virus sequences from chimpanzee (SIVcpz), X52154.

FIG. 2. Frequency of antiretroviral resistance-associated mutations. A, mutations in the PR gene related to PI resistance, B, mutations in the TR gene related to NRTI resistance and C, mutations in the TR gene related to NNRTI resistance.

TABLE 1. RESISTANCE MUTATIONS ASSOCIATED TO PR, RT AND T-20 OF MDR HIV-1 PATIENTS

GenBank Accession Number	Sex/Age/ Route of Infection	Diag	CD4 cell/ µl	PVL copies/ ml	HIV-1 Subtype PR/RT/ENV	PI Mutations	NRTI Mutations	NNRTI Mutations	T-20 Mutations
FJ638424	F/55/Hetero	1996	139	202675	B	M46I, I47V, I54M, V82A, I84V	D67N, T69NT, K70R, V118I, M184V, T215F, K219Q	K103S, Y181C, G190A	-
FJ638426	M/38/MSM	1995	761	4418	B	I54V, L90M	M41L, M184V, L210W, T215Y	K103N, V108I, K238T	-
FJ638428	M/32/Hetero	1999	20	9375	B	V32I, M46I, I47V, V82A, L90M	D67N, T69N, K70R, L74I, M184V, T215F, K219Q	V106AV, G190AV	-
FJ638430	M/8/Vertical	1998	926	5040	B	V32I, M46I, I47V, I54V, V82A	M41L, D67N, M184V, T215Y	K101E, G190S	-
FJ638431	F/56/Hetero	1996	469	2547	B	M46I, I54V, V82A	T69N, K70R, M184V	K103N, P225H	-
FJ638436	M/47/MSM	1995	291	2228	B	M46I, I54V, V82T, I84V, L90M	M41L, E44D, D67N, V118I, M184V, L210W, T215Y	K101E, K103N, G190A	-
FJ638448	M/45/Hetero	1995	66	AVL	B	M46I, I54V, V82A	M41L, L74V, M184V, T215Y	K101E, V108I, Y181C, G190A	-
FJ638449	F/39/Hetero	1996	130	83706	B	V32I, I47V, I54L, L90M	M41L, A62V, D67N, V75I, M184V	G190A	-
FJ638452	M/43/na	1999	11	54524	B	L90M	D67N, T69D, K70R, L74V, M184V, T215F, K219Q	L100I, K103N	N42T
FJ638454	F/39/Hetero	1996	461	7227	B	M46I, I54V, L76V, V82A, L90M	D67N, K70R, M184V	K103N	-
FJ638456	M/34/MSM	1992	15	110103	B	M46I, I54V, L76V, I84V, L90M	M41L, D67N, K70R, V75M, M184V, L210W, T215Y, K219E	K103S, G190A	-
FJ638457	F/15/Vertical	1996	339	7975	B	M46I, I54V, V82A	M41L, T215Y	A98G, K103N, Y181C, G190A	-
FJ638460	M/42/Hetero	1999	91	188518	F1/B/F1	M46L, I54V, L76V, V82M, L90M	D67N, K70R, V75M, M184V, T215F, K219E	K103N	G36E
FJ638464	M/13/Vertical	1995	393	28013	B	M46I, I50V, I54V, L76V, V82A	M41L, D67N, T69D, L74I, V75T, V118I, M184V, T215F, K219Q	Y181C	N42T, N43S

Hetero: heterosexual; MSM: men who have sex with men; Vertical: vertical transmission; na: not available; Diag: year of diagnosis; CD4: CD4 cell counts (cells/µl); PVL: plasma viral load (copies/ml); PR: protease gene; RT: reverse transcriptase gene; ENV gp41 gene; PI: protease inhibitor; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors; T-20: enfurvitide. GenBank accession numbers in bold were the patients with virologic failure. na: not available.

6. MANUSCRITO 3 – RESISTÊNCIA PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA EM GESTANTES

Manuscrito Submetido para publicação

HIV-1 PRIMARY AND SECONDARY ANTIRETROVIRAL DRUG RESISTANCE AND GENETIC DIVERSITY AMONG HIV-1 PREGNANT WOMEN FROM CENTRAL WEST BRAZIL

Ludimila Paula Vaz Cardoso, Gisner Alves Souza Pereira, Ângela Alves Viegas, Luiza Emylce Pelá Rosado Schmaltz, Mariane Martins de Araújo Stefani*

Affiliations:

Tropical Pathology and Public Health Institute, Federal University of Goiás, Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia/Goiás, Brazil.

Institution at which the work was performed: Tropical Pathology and Public Health Institute at Federal University of Goiás, Brazil.

*Correspondence to: Mariane Martins de Araújo Stefani. Address: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. Rua 235 s/n Setor Universitário, 74605-050, Goiânia-Goiás/Brazil. Fax: 55 62 3209 6363, Phone: 55 62 3209 61 11. email: mariane.stefani@pq.cnpq.br

Shortened Title: Drug resistance and HIV-1 subtypes among pregnant women

ABSTRACT

HIV-1 antiretroviral (ARV) resistance mutations may reduce the efficacy of prophylactic therapy to prevent mother to child transmission (MTCT) and impact future treatment options. ARV resistance mutations and HIV-1 phylogenetic diversity associated to protease (PR) and reverse transcriptase (RT) genes were assessed among 77 pregnant women (35 naïve, 42 ARV experienced) from central west Brazil. ARV mutations in PR/RT genes were analyzed by Stanford Database, PR/RT HIV-1 subtypes were assigned by phylogenetic analysis and *env/gag* subtypes were identified by heteroduplex mobility analysis (HMA). Only accessory mutations in PR gene A71T (1/6), L10V (2/6), L10I (3/6) and in RT gene V118I (2/6), V179D (1/6), V106I (1/6), K101Q (1/6), H221Y (1/6) were observed among 35 naïve patients. ARV experienced patients presented drug resistance mutations (16.7%, 7/42): 2 to one ARV class, four patients to two ARV classes, one patient had resistance mutations to three ARV classes. In PR/RT genes 67.5% were subtype B, 11.7%, subtype F1, 3.9% subtype C. Recombinant B^{PR}/F1^{RT} viruses represented 10.4% and F1^{PR}/B^{RT} 6.5%. Subtypes in *envgag*/PRRT genes identified 66.2% subtype B, 3.9% subtype C, 6.5% subtype F1 and around 25% discordant B and F1 recombinant viruses. Secondary drug resistant were identified among a considerable number of ARV experienced pregnant women indicating the importance of genotypic testing during pregnancy for optimal MTCT prophylactic regimen. The first study in central Brazil to describe HIV-1 genetic diversity in *envgag*/PRRT genes, indicates the spread and dissemination of BF1 recombinant viruses among a significant proportion of patients in this region.

Key Words: HIV-1 pregnant women; resistance mutations; antiretroviral treatment.

INTRODUCTION

HIV-1 mother to child transmission (MTC) can take place transplacentally, intrapartum through the birth canal or post partum via breastfeeding. However MTC is known to occur mainly in the late third trimester and intrapartum [Van Dyke et al., 1999]. Without any intervention, HIV-1 MTC ranges from 15-30% and can reach 20-45% among breastfeeding mothers [De Cock et al., 2000]. HIV-1 MTC is multifactorial but high viral load during pregnancy and delivery is considered the most important risk factor [Garcia et al., 1999]. Since 1994 when zidovudine (ZDV) therapy during pregnancy was shown to reduce MTC transmission, several prophylactic regimens have also proven to be effective [Connor et al., 1994; Guay et al., 1999; Lallemand et al., 2004; Suksomboon et al., 2007]. In Brazil since 1995, universal free of charge access to antiretroviral (ARV) drugs has been provided for the prevention of HIV-1 MTC. Combination therapy rather than mono or dual prophylactic regimens have been shown to have greater efficacy in preventing MTC transmission due to ARV drug resistance mutations [Mandelbrot et al., 2001; Cooper et al., 2002; Volmink et al., 2007]. The emergence and transmission of HIV-1 ARV resistance mutations may reduce the efficacy of prophylactic therapy and impact future treatment options for women and children [Eshelman et al., 2001; Lyons et al., 2005]. Pre-prophylaxis or pre-treatment ARV resistance genotypic testing while debatable for overall naïve patients is recommended to guide the choice of ARV drugs in pregnant women.

Recent Brazilian studies about HIV-1 diversity have indicated that despite the predominance of subtype B, recombinant forms, especially involving subtypes B and F1 are being transmitted and disseminated among different study groups in different geographic regions away from the epicenter of the epidemics in the southeast region [Cavalcanti et al., 2007; Medeiros et al., 2007; Stefani et al., 2007; Guimarães et al., 2008]. In a continental country like Brazil, HIV-1

molecular epidemiology studies in different populations from distinct regions are important to map HIV-1 diversity.

This study among HIV-1 pregnant women recruited in central west Brazil describes the prevalence of primary and secondary ARV resistance based on sequence analysis of the protease (PR) and of the reverse transcriptase (RT) genes. Moreover HIV-1 genetic diversity in the *env*, *gag* and *pol* genes is reported.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Inclusion criteria for this study were: HIV-1 infected pregnant women from any age range, ARV naïve (when HIV-1 diagnosis was performed during the index pregnancy) and ARV experienced (when ARV therapy was initiated prior to the index pregnancy). HIV-1 experienced women included patients previously submitted to ARV to prevent MTCT which was then discontinued after delivery and women under ARV therapy for the treatment of their infection. ARV drug regimens included nucleoside reverse transcriptase inhibitor -NRTI (ZDV, lamivudine - 3TC, didanosine - ddI and stavudine - d4T), non nucleoside reverse transcriptase inhibitor - NNRTI (nevirapine - NVP) and protease inhibitor - PI (nelfinavir - NFV, indinavir – IDV and ritonavir - RTV). Patients were recruited in 2003 at the main regional reference center for HIV-1 infected pregnant women (Hospital Materno Infantil, HMI) in Goiania/Goias, central west Brazil. Socio-behavioural data, clinical characteristics and laboratory results (HIV RNA load: bDNA, Bayer Diagnostic; NASBA, Organon Teknika and RT-PCR, Roche Diagnostic and CD4 counts: FACSCalibur, Becton Dickison) were obtained by a standardized questionnaire answered during individual interviews. Blood-EDTA samples were collected, aliquoted for

genomic DNA extraction. Plasma samples for viral RNA extractions were stored at -80°C. Research Ethical Committees approved this study and all participants signed the informed consent. For patients under 18 years, the informed consent was signed by one of the parents or the legal tutor.

Pol Genetic Analysis

RNA was extracted from plasma (QIAamp® Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany), reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) (Invitrogen) and used as the target for nested polymerase chain reaction (nested-PCR) employing HIV-1 PR and RT K1/K2 external primers and DP10/F2 internal primers [Frenkel et al., 1995; Kozal et al., 1996]. Entire PR gene (corresponding to positions 2253-2549 relative to HXB2 genome, GenBank accession n° K03455) and a 750 bp fragment of RT gene (corresponding to positions 2550-3299 relative to HXB2 genome) were amplified. After amplicon purification (QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN, Qiagen GmbH, Hilden, Germany) genomic sequencing was performed at Federal University of Goiás (DYEnamic ET Dye Terminator kit, GE Healthcare, USA; ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). All generated sequences were subjected to quality control analysis by HIV-1 Quality Analysis Pipeline Tool (<http://www.sanbi.ac.za>) and screening by visual inspection of the alignment by Bioedit software to exclude sample mix-ups and contamination [Hall 1999].

Phylogenetic Analysis

The isolates were subtyped by REGA automated genotyping tool version 2.0 and by comparing them to reference sequences from the Los Alamos HIV database ([ww.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)) [Oliveira et al., 2005]. All sequences were aligned using Clustal X. Trees were performed by Neighbor-

Joining (NJ) method under Kimura's two-parameter correction (1000 replicates) using MEGA4 software [Kimura 1980]. Isolates with discordant PR/RT subtypes were analyzed by Simplot 3.5.1 [Lole et al., 1999]. The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analysis are subtype B, AY173956, AY331295, AY423387, DQ853463, K03455 and U63632; subtype C, AF286228, AF110967, AY772699, U46016, U52953 and AF067155; subtype D, AY371157, K03454, M27323 and U88822; subtype F, AF077336, AF005494 and AJ249238 and the simian immunodeficiency virus sequences from chimpanzee (SIVcpz), X52154.

Resistance Analysis

Primary drug resistance was analyzed using the Calibrated Population Resistance (CPR) tool employing the Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation (SDRM) and International AIDS Society-USA (IAS-USA) major mutation lists. ART mutation susceptibility profile was analyzed by Stanford HIV Drug Resistance Database (hivdb.stanford.edu). Possible low-level resistance was not included due to its unknown clinical relevance (Accessed: April/2009).

GenBank accession numbers of this study are FJ784162-FJ784238.

Heteroduplex Mobility Assay (HMA) for *env* and *gag* Genes

HIV-1 subtype determinations for *env* and *gag* genes were performed by heteroduplex mobility analysis (HMA) employing reagents provided by the NIH/AIDS Reagent Program [Heyndrickx et al., 2000]. In brief, whole blood-EDTA stored at -80°C was used for genomic DNA extraction. Ethanol-precipitated DNA was resuspended in TE buffer (Tris-EDTA) and stored at -80°C and HIV-1 *env* and *gag* genes were amplified by nested-PCR as described previously [Stefani et al., 2007].

Statistical Analysis

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

RESULTS

Patient's Characteristics

This study included 77 pregnant women infected with HIV-1, 35 were ARV naïve and 42 were ARV experienced. Similar median ages (around 24 years) and median CD4 T cell counts (around 400 cells/ μ) were observed in both groups. The majority of ARV naïve patients had plasma viral loads below 100000 copies/ml and most of ARV experienced had viral loads below 10000 copies/ml (Table I).

Among 42 ARV experienced pregnant women, 23 were under ZDV monotherapy, 5 were under NRTI therapy (ZDV+3TC or ZDV+d4T), 13 were under NRTI + NNRTI therapy (ZDV+3TC+NVP) or NRTI + IP therapy (ZDV+3TC+NFV, ZDV+3TC+RTV, d4T + ddI + IDV + RTV); treatment information for one patient was missing.

Primary and Secondary ARV Resistance in PR and RT Genes

According to SDRM-2009 and IAS-USA mutation list, none of the 35 ARV naïve pregnant women presented any principal drug resistance mutation. However, the following accessory drug resistance mutations were observed: A71T (16.67%, 1/6), L10V (33.33%, 2/6), L10I (50%, 3/6) in the PR gene and V118I (2/6), V179D (1/6), V106I (1/6), K101Q (1/6), H221Y (1/6) in the RT gene.

Among 42 ARV experienced HIV-1 pregnant women ARV, seven (16.7%) presented HIV-1 isolates with secondary drug resistance. Table II depicts the individual mutation profiles and the level of resistance to distinct ARV drugs conferred by these mutations. Two patients had resistance mutations to one ARV class (NRTI), four patients presented resistance mutations to two ARV classes (NRTI + NNRTI, n=2 and PI + NTRI n=2). One HIV-1 pregnant woman had virus with resistance mutations to all three classes of ARV drugs: PI, NRTI and NNRTI.

HIV-1 Genetic Diversity in PR and RT Genes

Among 77 HIV-1 infected pregnant women, the majority sequences (64/77, 83.12%) clustered with a single HIV-1 subtype in both the PR/RT genes: 67.5% (52/77) were assigned subtype B, 11.7% (9/77) were subtype F1 and 3.9% (3/77) were classified as subtype C (Figure 1). Recombinant HIV-1 isolates in PR/RT genes were observed in 13 patients and were confirmed by bootscanning analysis: B/F1 (10.4%, 8/13) and F1/B (6.5%, 5/13) (data not shown).

Genetic Diversity in PR, RT, GAG and ENV Genes

Most HIV-1 isolates (76.6%, 63/77) screened by *env/gag* HMA and sequenced in the *pol* genes have shown a single HIV-1 subtype in PR, RT, ENV and GAG genes: 66.2% (51/77) subtype B, 3.9% (3/77) subtype C and 6.5% (5/77) subtype F1. Almost 30% of the isolates (18/77) had discordant HIV-1 subtypes in PR, RT, ENV and GAG genes (Table III).

DISCUSSION

This study among pregnant women infected with HIV-1 indicated only accessory mutations in PR gene and in RT genes among naïve patients. A significant level of secondary drug resistance mutations was observed in ARV experienced ones. Maternal and newborn ARV prophylaxis

together with other preventive measures such as elective caesarean section and proscriptio of breastfeeding contribute to reduce the risk of MTC [Newell et al., 2006]. However transmitted ARV resistance and the emergence of significant HIV-1 mutations in pregnant women taking temporary ARV prophylaxis therapy may impair the response to treatment and favor the vertical transmission of drug resistant virus.

The absence of primary resistance mutations in this group of pregnant women recruited in 2003 contrasts with 10% prevalence of primary drug resistance among 97 male and female patients recruited in the same setting in 2007-2008 [Cardoso et al., 2009 in press]. It's possible that small sample size of this study may have contributed to the inability to detect primary drug resistance. More recent studies in Brazil have shown significant levels of primary drug resistance in northeast and southeast regions [Pedroso et al., 2007; Sucupira et al., 2007; Eyer-Siva et al., 2008) whereas previous data have not revealed primary drug resistance [Tanuri et al., 1999; Dumans et al., 2002]. The increasing trend in the prevalence of primary drug resistance in Brazil within time is compatible of higher levels of exposure of patients to ARV drugs. The investigation of drug resistance mutations following temporary ARV therapy during pregnancy and discontinuation after delivery which may reduce further treatment options was out of the scope of this study [Lyons et al., 2005].

Genotypic tests performed among ARV experienced pregnant women from this study showed secondary drug resistance in over 15% of participants. This finding is of concern since resistance can reduce the efficacy of MTC preventive measures and further treatment options. PI resistance mutations were less frequent than RT inhibitor mutations, due to PIs higher genetic barrier and also due to the more recent introduction of this class of ARV in Brazil [Wu et al., 2003]. In this study HIV-1 isolates with secondary resistance harbored either mutations in the RT gene only or mutations in both RT and PR genes. The most common RT gene mutation was

M184V, responsible to resistance to 3TC at rates as high as 39%, which also increases susceptibility to ZDV and d4T [Clarke et al., 1999; Mandelbrot et al., 2001]. M41L and T215Y NRTI mutations, which remove ZDV and d4T already incorporated in the DNA chain, were detected. D67N, K70R and K219Q mutations, known to contribute to some degree of resistance to ZDV and d4T NRTI were also present. ARV experienced pregnant were under ZDV + 3TC or d4T which are commonly employed drugs in MTC prophylactic regimens [Tanuri et al., 2002]. ZDV and d4T select thymidine analogue resistance mutations (TAMs) which were detected in codons 41, 67, 70 and 215. The accumulation of TAMs may lead to a varying degree of cross-resistance between NRTIs representing a significant obstacle to effective rescue/prophylactic regimens [Clavel & Hance 2004]. The resistance data herein presented highlights the importance of genotypic resistance testing for pregnant women under ARV to optimize prophylactic/therapeutic regimens reducing the chances of MTC HIV-1 transmission.

This is the first study to describe HIV-1 genetic diversity central Brazil in four genes. Previous studies from this geographic region have analyzed either *env* and *gag* or PR and RT genes [Stefani et al., 2000; Cerqueira et al., 2004; Pereira et al., 2004; Pereira et al., 2006; Stefani et al., 2007; Vêras et al., 2007, Cardoso et al., 2009 in press]. The analysis of four HIV-1 genes among pregnant women indicate higher level of recombinant viruses as more genes are analyzed, similarly to previous reports [Guimarães et al., 2002; Oliveira et al., 2008]. The combined *env gag*/PR RT data presented here show that recombination between subtypes B and F1 is occurring frequently in central Brazil and these recombinant viruses have been disseminating among heterosexual couples. The identification of recombinant circulating forms (CRF) by full length or near full length genome deserves further investigations. Moreover results from this study confirm that infections with “pure” HIV-1 subtypes F and C are sporadic

in central Brazil as reported in other regions [Brindeiro et al. 2003, Brígido et al. 2005, Sa-Filho et al. 2006, Guimarães et al. 2008].

Prevention of MTCT by prophylactic ARV therapy is considered one of the best successful approaches to avoid transmission of HIV-1. However drug resistance mutations can impact ARV effectiveness. Our study showed significant prevalence of secondary resistance among ARV experienced patients indicating the importance of genotypic testing during pregnancy. The long term consequences of temporary exposure to ARV to prevent MTC transmission and the possible selection of resistance mutations following discontinuation of ART immediately post partum deserve further evaluation.

Acknowledgments

This study was supported by UNESCO AIDS/STD National Program, Brazilian Ministry of Health (Grant #310-06). Stefani MMA is a recipient of a fellowship from The National Counsel of Technological and Scientific Development/CNPq (grant # 304869/2008-2) and Cardoso LPV was supported by a scholarship from CNPq (grant# 141820/2006-3). We thank the staff from Hospital Materno Infantil, Goiania/Goias Brazil, for the support during this study.

References

- Brígido LF, Franco HM, Custódio RM, Oliveira CA, P Ferreira JL, Eira M, Bergel F, Araújo F, Carvalheiro JR, Rodrigues R. 2005. Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 21: 673-682.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A, Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. 2003. Brazilian

Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 17: 1063-1069.

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

Cerqueira DM, Ramalho ED, Oliveira CP, Silva RR, Franchini M, Felipe MSS, Martins CRF. 2004. HIV-1 subtypes and mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 35: 187-192.

Clarke JR, Braganza R, Mirza A, Stainsby C, Ait-Khaled M, Wright A, Lyall H, Parker D, McClure MO, Weber JN, Taylor GP. 1999. Rapid development of genotypic resistance to lamivudine when combined with zidovudine in pregnancy. *J Med Virol*. 59:364-368.

Clavel F, Hance AJ. 2004. HIV drug resistance. *N Engl J Med*. 350:1023-1035.

Connor EM, Sperling RS, Gelber R, Kiselev P, Scott G, O'Sullivan MJ, VanDyke R, Bey M, Shearer W, Jacobson RL, Eleanor Jimenez, Edward O'Neill, Brigitte Bazin, Jean-Francois Delfraissy, Mary Culnane, Robert Coombs, Mary Elkins, Jack Moye, Pamela Stratton, James Balsley. 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med*. 331:1173-1180.

Cooper ER, Charurat M, Mofenson L, Hanson IC, Pitt J, Diaz C, Hayani K, Handelsman E, Smeriglio V, Hoff R, Blattner W; Women and Infants' Transmission Study Group. 2002. Combination antiretroviral strategies for the treatment of pregnant HIV-1-infected women and prevention of perinatal HIV-1 transmission. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 29:484-494.

De Cock KM, Fowler MG, Mercier E, de Vincenzi I, Saba J, Hoff E, Alnwick DJ, Rogers M, Shaffer N. 2000. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *JAMA*. 283:1175-1182.

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-naive human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 46:3075-3079.

Eshleman SH, Mracna M, Guay LA, Deseyve M, Cunningham S, Mirochnick M, Musoke P, Fleming T, Glenn Fowler M, Mofenson LM, Mmiro F, Jackson JB. 2001. Selection and fading of resistance mutations in women and infants receiving nevirapine to prevent HIV-1 vertical transmission (HIVNET 012). *AIDS*. 19:1951-1957.

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Morgado MG. 2008. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103:143-149.

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

Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, Kornegay J, Jackson B, Moye J, Hanson C, Zorrilla C, Lew JF. 1999. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med*. 341:394-402.

Guay LA, Musoke P, Fleming T, Bagenda D, Allen M, Nakabiito C, Sherman J, Bakaki P, Ducar C, Deseyve M, Emel L, Mirochnick M, Fowler MG, Mofenson L, Miotti P, Dransfield K,

Bray D, Mmiro F, Jackson JB. 1999. Intrapartum and neonatal single-dose nevirapine compared with zidovudine for prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 in Kampala, Uganda: HIVNET 012 randomised trial. *Lancet*. 354:795-802.

Guimarães ML, Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG: Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS* 2008;22:433-438.

Guimarães ML, Moreira ASantos, Loureiro R, Galvão-Castro B, The Brazilian Network For HIV Isolation And Characterization, Morgado MG. 2002. High Frequency of Recombinant Genomes in HIV Type 1 Samples from Brazilian Southeastern and Southern Regions. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 17:1261–1269.

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.

Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G, Coppens S, Vereecken K, De Witte K, Van Rampelbergh R, Kahindo M, Morison L, McCutchan FE, Carr JK, Albert J, Essex M, Goudsmit J, Asjö B, Salminen M, Buvé A, van Der Groen G. 2000. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. *J Virol*. 74:363-370.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 16: 111-120.

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

Lallemant M, Jourdain G, Le Coeur S, Mary JY, Ngo-Giang-Huong N, Koetsawang S, Kanshana S, McIntosh K, Thaineua V; Perinatal HIV Prevention Trial (Thailand) Investigators.

2004. Single-dose perinatal nevirapine plus standard zidovudine to prevent mother-to-child transmission of HIV-1 in Thailand. *N Engl J Med.* 351:217-228.

Leal E, Holmes EC, Zanotto PM. 2004. Distinct patterns of natural selection in the reverse transcriptase gene of HIV-1 in the presence and absence of antiretroviral therapy. *Virology.* 325:181-191.

Lehvaslaiho H, Hide W, Oliveira T: South African National Bioinformatics Institute, University of Western Cape, South Africa. <http://www.sanbi.ac.za>. Accessed February, 2009.

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

Los Alamos HIV Drug Resistance Database: [ww.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov). Accessed April, 2009.

Lyons FE, Coughlan S, Byrne CM, Hopkins SM, Hall WW, Mulcahy FM. 2005. Emergence of antiretroviral resistance in HIV-positive women receiving combination antiretroviral therapy in pregnancy. *AIDS.* 19:63-67.

Mandelbrot L, Landreau-Mascaro A, Rekecewicz C, Berrebi A, Bénifla JL, Burgard M, Lachassine E, Barret B, Chaix ML, Bongain A, Ciraru-Vigneron N, Crenn-Hébert C, Delfraissy JF, Rouzioux C, Mayaux MJ, Blanche S; Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS) 075 Study Group. 2001. Lamivudine-zidovudine combination for prevention of maternal-infant transmission of HIV-1. *JAMA.* 285:2083-2093.

Medeiros MS, Arruda EAG, Guerrant RL, *et al.* Genotype Testing and Antiretroviral Resistance Profiles from HIV-1 Patients Experiencing Therapeutic Failure in Northeast Brazil *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* 2007;11:390-394.

Newell ML, Patel D, Goetghebuer T, Thorne C; European Collaborative Study. 2006. CD4 cell response to antiretroviral therapy in children with vertically acquired HIV infection: is it associated with age at initiation? *J Infect Dis.* 193:954-962.

Oliveira CM, Almeida FJ, Rodrigues R, Crozatti M, Vazquez CM, do Socorro Carneiro Ferrão M, Campeas AE, Marques SR, Berezin EN, de Macedo Brígido LF. 2008. High frequency of BF mosaic genomes among HIV-1-infected children from Sao Paulo, Brazil. *Arch Virol.* 153:1799-1806.

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

Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, Brites C. 2007. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 45: 251-253.

Pereira GA, Stefani MM, Araújo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg* 71:679-684.

Pereira GA, Stefani MM, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira EM, Carneiro MA, Martins RM. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J Med Virol.* 78:719-723.

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.

Stanford HIV Drug Resistance Database. <http://www.hivdb.stanford.edu>. Accessed April, 2009.

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, Maya NC, Mussi AH. 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol.* 39:205-209.

Stefani MM, Pereira GA, Martelli CM, Shindo N, Galvao-Castro B. 2000. Evidence of HIV-1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV-1 in Central Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2:205-207.

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

Suksomboon N, Poolsup N, Ket-Aim S. 2007. Systematic review of the efficacy of antiretroviral therapies for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *J Clin Pharm Ther.* 32:293-311.

Tanuri A, Caridea 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.

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.* 20:60-66.

Van Dyke RB, Korber BT, Poppek E, Macken C, Widmayer SM, Bardeguet A, Hanson IC, Wiznia A, Luzuriaga K, Viscarello RR, Wolinsky S. 1999. The Ariel Project: A prospective

cohort study of maternal-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the era of maternal antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 179:319-328.

Véras NM, Véras VS, Ramalho ED, Kyaw C, Silva RR, Brígido MM, Martins CR. 2007. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 23: 1481-90.

Volmink J, Siegfried NL, van der Merwe L, Brocklehurst P. 2007. Antiretrovirals for reducing the risk of mother-to-child transmission of HIV infection. *Cochrane Database Syst Rev.* 24:CD003510.

Wu TD, Schiffer CA, Gonzales MJ, Taylor J, Kantor R, Chou S, Israelski D, Zolopa AR, Fessel WJ, Shafer RW. 2003. Mutation patterns and structural correlates in human immunodeficiency virus type 1 protease following different protease inhibitor treatments. *J Virol.* 77:4836-4847.

TABLE I. Main Characteristics of HIV-1 Pregnant Women Stratified by ARV Use.

	ARV Naive n=35	ARV experienced n=42
Age, years (median range)	24 (17-35)	23.5 (15-35)
CD4 cells/ μ (median range)	467 (180-1362)	420 (144-1271)
HIV-1 RNA copies/ml		
<10000	36.84% (7/19)	76% (19/25)
10000 – 100000	36.84% (7/19)	16% (4/25)
>100000	26.32% (5/19)	8% (2/25)
HIV-1 Diagnosis (year)		
1992 – 2000	2.9% (1/35)	23.8% (10/42)
After 2000	85.7% (30/35)	69% (29/42)
Unknown	11.4% (4/35)	7.1% (3/42)

ARV: antiretroviral.

TABLE II. Resistance Mutations Associated To PR And RT of HIV-1 Pregnant Women.

GenBank Accession Number	HIV-1 subtype <i>env</i> gag/ PRRT ARV regimen	PR Major Mutations	PR Minor Mutations	NRTI Mutations	NNRTI Mutations	Resistance Profile		
						Low	Intermediate	High
FJ784169	B/B ZDV+3TC+NF	-	A71T	M41L, M184V, T215Y	E138A	TDF	ABC, ZDV, d4T, ddI	3TC, FTC
FJ784180	B/BF1 3TC+d4T	-	-	M184V	K103N, P225H	ETR	-	3TC, FTC, NVP, DLV, EFV
FJ784182	B/B ZDV+3TC	D30N	A71V	D67N, K70R, M184V, K219Q	E138K	ABC, d4T, DLV, NVP	ZDV	NFV, 3TC, FTC
FJ784206	F1/F1 ZDV+3TC	-	-	M184V	K103N	-	-	3TC, FTC, DLV, EFV, NVP
FJ784213	B/B d4T+ddI+IDV+RTV	M46L, V82A	L10V	M184V	-	ATV, FPV, SQV	IDV, LPV	NFV, 3TC, FTC
FJ784221	B/B ZDV+ddI	-	L10I, A71T	M41L, T215Y	-	-	ABC, ZDV, d4T, ddI, TDF	-
FJ784237	-/B ZDV+3TC+NVP	D30N, N88D	-	M184V	-	ATV	-	NFV, 3TC, FTC

PR: protease, RT: reverse transcriptase; ARV: antiretroviral; NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. ABC: abacavir; ATV: atazanavir; DLV: delavirdine; ddI: didanosine; d4T: stavudine; EFV: efavirenz; ETR: etravirine; FPV: fosamprenavir; FTC: emtricitabine; IDV: indinavir; LPV: lopinavir; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapine, SQV: saquinavir TDF: tenofovir; ZDV: zidovudine and 3TC: lamivudine.

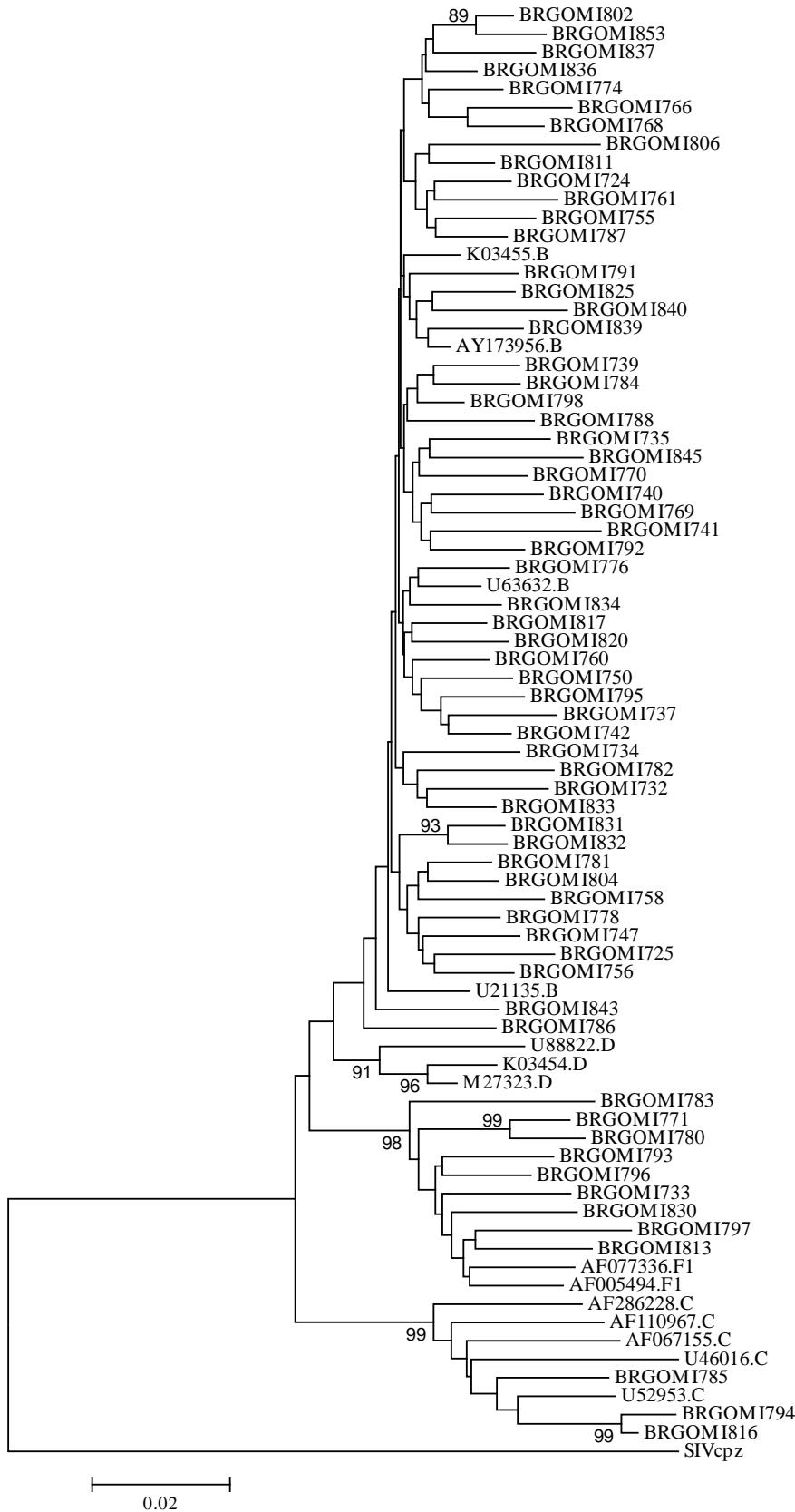


Fig. 1. Phylogenetic classification in PR and RT genes. The GenBank accession numbers used in the comparative phylogenetic analysis are subtype B, AY173956, K03455, U21153 and U63632; subtype C, U52953, AF286228, AF110967, U46016 and AF067155; subtype D, K03454, M27323 and U88822; subtype F, AF077336, AF005494 and the simian immunodeficiency virus sequence from chimpanzee (SIVcpz), X52154.

TABLE III. HIV-1 Genetic Diversity in *env gag*/PR RT Genes Among Pregnant Women.

HIV-1 Subtype <i>env gag</i> /PR RT	n	%
B/B	51	66.2
C/C	3	3.9
F1/F1	5	6.5
B/BF1	5	6.5
B/F1B	1	1.3
BF1/F1B	2	2.6
BF1/F1	3	3.9
F1B/F1	1	1.3
BF1/B	1	1.3
-F1/F1B	1	1.3
-/BF1	3	3.9
-/F1B	1	1.3
Total	77	100

PR: protease; RT: reverse transcriptase; -: not available.

7. CONCLUSÕES

Quanto à prevalência de mutações associadas à resistência primária a ARVs observamos:

- a. Alta prevalência (~10%) de resistência primária ou resistência transmitida em isolados do HIV-1 de pacientes virgens de tratamento do estado de Goiás recrutados em 2007-2008;
- b. Entre gestantes virgens de tratamento recrutadas em 2003 não foram detectadas mutações de resistência primária a ARVs.

Esses dados sugerem que vírus resistentes estão sendo transmitidos e reforça a necessidade de monitoramento da transmissão de vírus com resistência, o que pode comprometer os esquemas terapêuticos de primeira linha e futuras opções terapêuticas.

Quanto à prevalência de mutações associadas à resistência secundária a ARVs observamos:

- c. Alta proporção (79,2%) de resistência secundária;
- d. Alta prevalência (33,3%) de isolados do HIV-1 MDR às três classes de ARVs disponíveis;
- e. Entre 14 isolados MDR do HIV-1, 3 isolados apresentaram mutações de resistência ao inibidor de fusão, T-20, em pacientes com ou sem tratamento prévio com T-20;

Esses dados indicam o benefício dos testes de genotipagem para o resgate de pacientes com mutações de resistência, principalmente para os pacientes apresentando isolados MDR.

Quanto à diversidade genética do HIV-1, independente do grupo de estudo avaliado no estado de Goiás, gestantes, pacientes virgens de tratamento, pacientes em terapia ARV observamos:

- f. Predominância do subtipo B que co-circula com subtipos F1 e C. A presença dos subtipos F1 e C ainda é esporádica;
- g. Formas recombinantes do HIV-1 envolvendo os subtipos B e F1 representaram a segunda forma genética mais frequente depois do subtipo B. Vários padrões de recombinação entre os subtipos F1 e B foram observados;

Esses dados ajudam a compor o mapa genético molecular do HIV-1 no Brasil.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados do estudo da diversidade genética do HIV-1 em diferentes subgrupos populacionais do estado de Goiás, gestantes, pacientes virgens de tratamento, pacientes em terapia ARV indicou extensa variabilidade genética, sobretudo de formas recombinantes envolvendo os subtipos B e F1. Esses dados ajudam a compor o mapa genético molecular do HIV-1 no Brasil.

A alta prevalência de resistência primária encontrada no centro-oeste Brasileiro sugere que vírus resistentes estão sendo transmitidos. Esses dados reforçam a necessidade de monitoramento da transmissão de vírus com mutações de resistência, o que pode comprometer os esquemas terapêuticos de primeira linha e futuras opções terapêuticas. A alta prevalência de resistência secundária e presença de mutações às novas drogas ARVs indicam o benefício dos testes de genotipagem para o resgate de pacientes com mutações de resistência.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

Antoni BA, Stein SB, Rabson AB 1994. Regulation of human immunodeficiency virus infection: implications for pathogenesis. *Adv Virus Res* 43: 53-145.

Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, Busch MP Segal MR, Petropoulos CJ, Grant RM 2004. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS* 18:1683-1689.

Barre-Sinoussi F 1996. HIV as the cause of AIDS. *Lancet* 348: 31-35.

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 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

Barreto CC, Nishyia A, Araújo LV, Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC 2006. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1-infected blood donors in São Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41: 338-341.

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

Berger EA, Murphy PM, Farber JM 1999. *Annu. Rev. Immunol* 17: 657-700.

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

¹ Referências Bibliográficas de acordo com as normas da revista *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB 1994. Virus-specific CD8C cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol* 68: 6103–6110.

Brasil 2006. Renagemo-Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS- Ministério da Saúde. <http://www.aids.gov.br>. Acesso Janeiro 2009.

Brasil 2008. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS- Ministério da Saúde.

Brasil 2009. Recomendações para Terapia Antirretroviral em Crianças e Adolescentes Infectados pelo HIV. Brasília: Programa Nacional de DST e AIDS- Ministério da Saúde.

Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12:1365-1371.

Brenner BG, Routy JP, Petrella M, Moisi D, Oliveira M, Detorio M, Spira B, Essabag V, Conway B, Lalonde R, Sekaly RP, Wainberg MA 2002. Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 76:1753–1761.

Brenner BG, Routy JP, Quan Y, Moisi D, Oliveira M, Turner D, Wainberg MA Co-Investigators of the Quebec Primary Infection Study 2004 Persistence of multidrug-resistant HIV-1 in primary infection leading to superinfection. *AIDS* 20:1653-1660.

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

Brindeiro 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 PA, Brindeiro RM, Mortensen C, Hertogs K, De Vroey V, Rubini NP, Sion FS, De Sá CA, Machado DM, Succi RC, Tanuri A 2002. 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* 40: 4512-4519.

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

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

Brito AM, Castilho EA, Szwachwald CL 2005. Regional patterns of the temporal evolution of the AIDS epidemic in Brazil following the introduction of antiretroviral therapy. *Braz J Infect Dis* 9: 9-19.

Briz V, Poveda E, Soriano V 2006. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *J Antimicrob Chemother* 57:619-627.

Broder CC, Jones-Trower A 1999. Coreceptor Use by Primate Lentiviruses in Human Retroviruses and AIDS, Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Mullins JI, Sodroski J, and Wolinsky S, Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, p. 517-541.

Brown AJ, Precious HM, Whitcomb JM, Wong JK, Quigg M, Huang W, Daar ES, D'Aquila RT, Keiser PH, Connick E, Hellmann NS, Petropoulos CJ, Richman DD, Little SJ 2000. Reduced susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) from patients with primary HIV infection to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors is associated with variation at novel amino acid sites. *J Virol.* 74:10269-10273.

Busch MP, Satten GA 1997. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am J Med* 102:117-126.

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

Cerqueira DM, Amorim RM, Silva RR, Camara GN, Brigido MM, Martins CR 2004a. 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.

Cerqueira DM, Ramalho ED, Oliveira CP, Silva RR, Franchini M, Felipe MSS, Martins CRF 2004b. HIV-1 subtypes and mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 35: 187-192.

Cervia JS, Smith MA 2003. Enfuvirtide (T-20): A Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion Inhibitor. *Reviews of anti-infective agents* 37:1102-1106.

Chan DC, Chutkowski CT, Kim PS 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:15613–15617.

Clavel F, Hance AJ 2004. HIV drug resistance. *N Engl J Med* 350:1023-1035.

Coffin JM 1992. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 176:143-164.

Cohen J 2007. Promising AIDS Vaccine's Failure Leaves Field Reeling. *Science* 318: 28-29.

Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RSG, Chequer-Fernandez SL, Oliveira SM, Arakaki-Sanchez D, Chequer PJN, 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.

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: 207-211.

de Ronde A, van Dooren M, van Der Hoek L, Bouwhuis D, de Rooij E, van Gemen B, de Boer R, Goudsmit J 2001. Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol* 75: 595-602.

Deeks SG, Wrin T, Liegler T, Hoh R, Hayden M, Barbour JD, Hellmann NS, Petropoulos CJ, McCune JM, Hellerstein MK, Grant RM 2001. Virologic and

immunologic consequences of discontinuing antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 344: 472-480.

Detels R, Muñoz A, McFarlane G, Kingsley LA, Margolick JB, Giorgi J, Schragger LK, Phair JP 1998. Effectiveness of potent antiretroviral therapy on time to AIDS and death in men with known HIV infection duration. Multicenter AIDS Cohort Study Investigators. *JAMA* 280:1497-503.

Domingo E, Baranowski E, Ruiz-Jarabo CM, Martin-Hernandez AM, Saiz JC, Escarmis C 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. *Emerg Infect Dis* 4: 521-527.

Doms RW, Peiper SC 1997. Unwelcomed guests with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235:179-190.

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-naive human immunodeficiency virus type 1-positive individuals in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3075-3079.

Eron JJ, Haubrich R, Lang W, Pagano G, Millard J, Wolfram J, Snowden W, Pedneault L, Tisdale M 2001. A phase II trial of dual protease inhibitor therapy: amprenavir in combination with indinavir, nelfinavir, or saquinavir. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26:458-461.

Eshleman SH, Hackett J Jr, Swanson P, Cunningham SP, Drews B, Brennan C, Devare SG, Zekeng L, Kaptué L, Marlowe N 2004. Performance of the Celera Diagnostics ViroSeq HIV-1 Genotyping System for sequence-based analysis of diverse human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Clin Microbiol* 42:2711-2717.

Esnouf RM, Stuart DI, De Clercq E, Schwartz E, Balzarini J 1997. Models which explain the inhibition of reverse transcriptase by HIV-1-specific (thio) carboxanilide derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* 234:458-464.

Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8:175-185.

Eyer-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Morgado MG 2008. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:143-149.

Frankel AD, Young JAT 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev Biochem* 67: 1-25.

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

Gadelha SR, Shindo N, Cruz JN, Morgado MG, Galvao-Castro B 2003. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 461-463.

Gallego O, Martin-Carbonero L, Agüero J, de Mendoza C, Corral A, Soriano V 2004. Correlation between rules-based interpretation and virtual phenotype interpretation of HIV-1 genotypes for predicting drug resistance in HIV-infected individuals. *J Virol Methods* 121:115-118.

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 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 865-867.

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

García-Bujalance S, Ladrón de Guevara C, González-García J, Arribas JR, Zamora F, Gutiérrez A 2007. Elevation of viral load by PCR and use of plasma preparation tubes for quantification of human immunodeficiency virus type 1. *J Microbiol Methods* 69:384-386.

Geretti AM 2007. Epidemiology of antiretroviral drug resistance in drug-naïve Persons. *Current Opinion in Infectious Diseases* 20:22–32.

Geskus RB, Prins M, Hubert JB, Miedema F, Berkhout B, Rouzioux C, Delfraissy F, Meyer L 2007. The HIV RNA setpoint theory revisited. *Retrovirology* 4:6574.

Ghosn J, Pellegrin I, Goujard C, Deveau C, Viard JP, Galimand J, Harzic M, Tamalet C, Meyer L, Rouzioux C, Chaix ML 2006. HIV-1 resistant strains acquired of primary infection massively fuel the cellular reservoir and persist for lengthy periods of time. *AIDS* 20: 159-170.

Gonzalez CR, Alcalde R, Nishiya A, Barreto CC, Silva FE, de Almeida A, Mendonça M, Ferreira F, Fernandes SS, Casseb J, Duarte AJ 2007. Drug resistance among chronic HIV-1-infected patients naïve for use of anti-retroviral therapy in Sao Paulo city. *Virus Res* 129:87-90.

Goodenow M, Huet T, Saurin W, Kwok S, Sninsky J, Wain-Hobson S 1989. HIV-1 isolates are rapidly evolving quasispecies: evidence for viral mixtures and preferred nucleotide substitutions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2:344-352.

Goodrich DW, Duesberg PH 1990. Evidence that retroviral transduction is mediated by DNA not by RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3604-3608.

Goudsmit J, De Ronde A, Ho DD, Perelson AS 1996. Human immunodeficiency virus fitness in vivo: calculations based on a single zidovudine resistance mutation at codon 215 of reverse transcriptase. *J Virol* 70:5662-5664.

Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO 2002. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA* 288:181-188.

Guimarães ML, Bastos FI, Telles PR, Galvao-Castro B, Diaz RS, Bongertz V, Morgado MG 2001. 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* 21: 143-151.

Guimarães ML, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvao-Castro B, Morgado MG 2002. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18: 1261-1269.

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

Günthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Havlir DV, Richman DD 1998. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14:869-876.

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.

Harrigan PR, Montaner JS, Wegner SA, Verbiest W, Miller V, Wood R, Larder BA 2001. World-wide variation in HIV-1 phenotypic susceptibility in untreated individuals: biologically relevant values for resistance testing. *AIDS* 15:1671- 1677.

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

Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S 2006. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 20:W13-23.

Heyndrickx L, Janssens W, Zekeng L, Musonda R, Anagonou S, Van der Auwera G 2000. Study Group on Heterogeneity of HIV Epidemics in African Cities. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group Misolates by *gag/env* heteroduplex mobility assay. *J Virol* 74:363-370.

Holden LG, Prochnow C, Chang YP, Bransteitter R, Chelico L, Sen U, Stevens RC, Goodman MF, Chen XS 2008. *Nature* 456:121-124.

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: 210-216.

Huang KH, Loutfy MR, Tsoukas CM, Bernard NF 2008. Immune correlates of CD4 decline in HIV-infected patients experiencing virologic failure before undergoing treatment interruption. *BMC Infect. Dis* 8: 59.

Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Günthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD 2007. Update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 15:119-125.

Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD 2008. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 16:138-145.

Kahn JO, Walker BD 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339:33–39.

Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT 2008. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nature Reviews Microbiology* 6:143-155.

Kenyon G 2001. Resistance study to re-evaluate HAART. *Nat Med* 7:515.

Kimura M 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16:111-120.

Korber B, Foley BT, Kuiken C, Pillai SK, Sodroski JG 1998. Numbering Positions in HIV Relative to HXB2CG apud *Human Retroviruses and AIDS 1998*, Korber B, Kuiken CL, Foley B, Hahn B, McCutchan F, Mellors JW, and Sodroski J. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. p. III-102-111.

Lake JA, Carr J, Feng F, Mundy L, Burrell C, Li P 2003. The role of Vif during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors. *J Clin Virol* 26:143-152.

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

Little SJ, Daar ES, D'Aquila RT, Keiser PH, Connick E, Whitcomb JM, Hellmann NS, Petropoulos CJ, Sutton L, Pitt JA, Rosenberg ES, Koup RA, Walker BD, Richman DD 1999. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA* 282:1142-1149.

Little SJ, BMJ 2001. Is transmitted drug resistance in HIV on the rise? It seems so. 322:1074-1075.

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 2002. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* 347:385-394.

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

Los Alamos - HIV Sequence database 2008. <http://www.hiv-web.lanl.gov>. Acesso Janeiro 2009.

Machado ES, Lambert JS, Afonso AO, Cunha SM, Oliveira RH, Tanuri A, Sill AM, Soares MA 2004a. Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 76:727-741.

Machado ES, Lambert JS, Watson DC, Afonso AO, da Cunha SM, Nogueira SA, Caride E, Oliveira RH, Sill AM, DeVico A, Tanuri A 2004b. Genotypic resistance and HIV-1 subtype in Brazilian children on dual and triple combination therapy. *J Clin Virol* 30:24-31.

Maia Teixeira SL, Bastos FI, Hacker MA, Guimarães ML, Morgado MG 2006. Trends in drug resistance mutations in antiretroviral-naïve intravenous drug users of Rio de Janeiro. *J Med Virol* 78:764-769.

Margolick JB, Donnenberg AD, Chu C, O'Gorman MR, Giorgi JV, Muñoz A 1998. Decline in total T cell count is associated with onset of AIDS, independent of CD4(+) lymphocyte count: implications for AIDS pathogenesis. *Clin Immunol Immunopathol* 88:256-263.

Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, Traore I, Hsieh CC, Dia MC, Gueye EH 1994. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science* 265: 1587-1590.

Martinez-Picado J, Savara AV, Sutton L, D'Aquila RT 1999. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 73:3744-3752.

Martinez-Picado J, Savara AV, Shi L, Sutton L, D'Aquila RT 2000. Fitness of human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor-selected single mutants. *Virology* 275: 318-322.

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

Medeiros MS, Arruda EA, Guerrant RL, Brown CC, Lima AA 2007. Impact of the number of failed therapeutic regimes on the development of resistance mutations to HIV-1 in northeast Brazil. *Braz J Infect Dis* 11:451-455.

Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV, Margolick JB, Tassoni CJ, Gupta P, Kingsley LA, Todd JA, Saah AJ, Detels R, Phair JP, Rinaldo CR Jr 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 126:946-954.

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

Mitsuyasu R, Gelman R, Cherng DW, Landay A, Fahey J, Reichman R, Erice A, Bucy RP, Kilby JM, Lederman MM, Hamilton CD, Lertora J, White BL, Tebas P, Duliege AM, Pollard RB, AIDS Clinical Trials Group 328 Study Team 2007. The virologic, immunologic, and clinical effects of interleukin 2 with potent antiretroviral therapy in patients with moderately advanced human immunodeficiency virus infection: a randomized controlled clinical trial - AIDS Clinical Trials Group 328. *Arch. Intern. Med* 167: 597-605.

Moore JP, Doms RW 2003. The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *PNAS* 100:10598-10602.

Moss AR, Bacchetti P 1989. Natural history of HIV infection. *AIDS* 3:55-61.

Nair V, Chi G 2007. HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS. *Rev Med Virol*. 17:277-295.

Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM 2002. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *AIDS* 16(suppl 4): S3-S16.

Nei M & Kumar S 2002. Molecular Phylogenetics and Evolution. *Oxford University* 3:567-568.

Nowak MA, Lloyd AL, Vasquez GM, Wiltrot TA, Wahl LM, Bischofberger N, Williams J, Kinter A, Fauci AS, Hirsch VM, Lifson JD 1997. Viral dynamics of primary viremia and antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 71:7518-7525.

Oette M, Kaiser R, Däumer M, Petch R, Fätkenheuer G, Carls H, Rockstroh JK, Schmalöer D, Stechel J, Feldt T, Pfister H, Häussinger D 2006. Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 15: 573-581.

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

Painel on Antiretroviral Guidelines for Adults and Adolescents. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-1-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services 2008 Nov; 1-139. Disponível em <http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>. Acesso Janeiro 2009.

Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362:355-358.

Pao D, Andradu U, Clarke J, Dean G, Drake S, Fisher M, Green T, Kumar S, Murphy M, Tang A, Taylor S, White D, Underhill G, Pillay D, Cane P 2004. Long-term persistence of primary genotypic resistance after HIV-1 seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37:1570-1573.

Pedroso C, Queiroz AT, Alcantara LC, Drexler JF, Diaz RS, Weyll N, Brites C 2007. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 251-253.

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

Pereira GA, Stefani MM, Araújo Filho JA, Souza LC, Stefani GP, Martelli CM 2004. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and *Mycobacterium leprae* co infection: HIV-1 subtypes and clinical, immunologic, and histopathologic profiles in a Brazilian cohort. *Am J Trop Med Hyg* 71:679-684.

Pereira GA, Stefani MM, Martelli CM, Turchi MD, Siqueira EM, Carneiro MA, Martins RM 2006. Human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus co-infection and viral subtypes at an HIV testing center in Brazil. *J Med Virol* 78:719-723.

Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, Lie YS, Wrinn T, Huang W, Tian H, Smith D, Winslow GA, Capon DJ, Whitcomb JM 2000. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob Agents Chemother* 44:920-928.

Pierson T, Hoffman TL, Blankson J, Finzi D, Chadwick K, Margolick JB, Buck C, Siliciano JD, Doms RW, Siliciano RF 2000. Characterization of chemokine receptor utilization of viruses in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 74:7824-7833.

Piguet V, Blauvelt A 2002. Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J. Invest. Dermatol.* 119: 365-369.

Pires IL, Soares MA, Speranza FA, Ishii SK, Vieira MC, Gouvêa MI, Guimarães 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* 42:426-430.

Pope M, Haase AT 2003. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med* 9:847-852.

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

Requejo HI 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev Saude Publica* 40:331-345.

Richman DD 2001. HIV chemotherapy. *Nature* 410:995-1001.

Richman DD, Morton SC, Wrin T, Hellmann N, Berry S, Shapiro MF, Bozzette SA 2004. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS* 18:1393-1401.

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

Roberts JD, Preston BD, Johnston LA, Soni A, Loeb L, Kunkel TA 1989. Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. *Molecular and cellular biology* 9: 469-476.

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

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

Rosen CA, Pavlakis GN 1990. Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression. *AIDS* 4: A51.

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

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

Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard-Mitchell K, Zhang ZQ, Krieger J, Pryor J, Havlir D, Wong JK, Richman D, Corey L, Haase AT 2000. Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoirs during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 181:354-357.

Salomon H, Wainberg MA, Brenner B, Quan Y, Rouleau D, Côté P, LeBlanc R, Lefebvre E, Spira B, Tsoukas C, Sekaly RP, Conway B, Mayers D, Routy JP 2000. Prevalence of HIV-1 resistant to antiretroviral drugs in 81 individuals newly infected by sexual contact or injecting drug use. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. *AIDS* 28:F17-23.

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

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS USA* 74: 5463-5467.

Santos AF, Schrago CG, Martinez AMB, Mendoza-Sassi R, Silveira J, Sousa TM, Lengruber RB, Soares EAJM, Sprinz E, Soares MA 2007. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31 BC-related strains in southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:328-333.

Santos AF, Lengruber RB, Soares EA, Jere A, Sprinz E, Martinez AM, Silveira J, Sion FS, Pathak VK, Soares MA 2008. Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients. *PLoS ONE* 12: 1781.

Sawyer SL, Emerman M, Malik HS 2004. Ancient adaptive evolution of the primate antiviral DNA editing enzyme APOBEC3G. *PLoS Biol* 2:E275.

Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, Sadownik SN, Freedberg KA 2005. Should resistance testing be performed for treatment-naive HIV infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis* 41:1316-1323.

Schacker T, Little S, Connick E, Gebhard-Mitchell K, Zhang ZQ, Krieger J, Pryor J, Havlir D, Wong JK, Richman D, Corey L, Haase AT 2000. Rapid accumulation of human immunodeficiency virus (HIV) in lymphatic tissue reservoirs during acute and early HIV infection: implications for timing of antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 181:354-357.

Shafer RW 2002. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 15:247-277.

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

Simon V, Ho DD, Karim QA 2006. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *The Lancet* 368:489-504.

Smith DE, Walker BD, Cooper DA, Rosenberg ES, Kaldor JM 2004. Is antiretroviral treatment of primary HIV infection clinically justified on the basis of current evidence? *AIDS* 18: 709-718.

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

Soares EA, Martinez AM, Souza TM, Santos AF, Da Hora V, Silveira J, Bastos FI, Tanuri A, Soares MA 2005. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 19: S81-86.

Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A 2004. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS* 18 Suppl 1: 9-13.

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

Stefani MM, Pereira GA, Lins JA, Alcantara KC, Silveira AA, Viegas AA, Maya NC, Mussi AH 2007. Molecular screening shows extensive HIV-1 genetic diversity in Central West Brazil. *J Clin Virol* 39: 205-209.

Stuhlmann H, Berg P 1992. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J Virol* 66:2378-2388.

Sucupira MC, Souza IE, Costa LJ, Scheinberg MA, Diaz RS 2001. Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil. *Antivir Ther* 6:263-264.

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

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

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S 2007. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Mega) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.

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* 20:60-66.

Tanuri A, Caridea 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.

Tavel JA, Sereti I, Walker RE, Hahn B, Kovacs JA, Jagannatha S, Davey RT Jr, Falloon J, Polis MA, Masur H, Metcalf JA, Stevens R, Rupert A, Baseler M, Lane HC

2003. A randomized, double-blinded, placebo-controlled trial of intermittent administration of interleukin-2 and prednisone in subjects infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 188:531-536.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-4680.

Thomson MM, Pérez-Álvarez L, Nájera R 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet* 2: 461-71.

Tural C, Ruiz L, Holtzer C, Schapiro J, Viciana P, González J, Domingo P, Boucher C, Rey-Joly C, Clotet B; Havana Study Group 2002. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS* 25:209-218.

Turner BJ, Hecht FM, Ismail RB 1994. CD4+ T-lymphocyte measures in the treatment of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. A review for clinical practitioners. *Arch Intern Med* 154:1561-1573.

Vercauteren J, Derdelinckx I, Sasse A, Bogaert M, Ceunen H, De Roo A, De Wit S, Deforche K, Echahidi F, Fransen K, Goffard JC, Goubau P, Goudeseune E, Yombi JC, Lacor P, Liesnard C, Moutschen M, Pierard D, Rens R, Schrooten Y, Vaira D, van den Heuvel A, van der Gucht B, van Ranst M, van Wijngaerden E, Vandercam B, Vekemans M, Verhofstede C, Clumeck N, Vandamme AM, van Laethem K 2008. Prevalence and epidemiology of HIV type 1 drug resistance among newly diagnosed therapy-naive patients in Belgium from 2003 to 2006. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:355-362.

Vicente ACP, 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: 327-331.

Vidal N, Mulanga C, Bazepeo SE, Lepira F, Delaporte E, Peeters M 2006. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in central Africa. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:182-187.

Walker BD, Burton DR 2008. Toward an AIDS Vaccine. *Science* 320: 760-764.

Wegner SA, Brodine SK, Mascola JR, Tasker SA, Shaffer RA, Starkey MJ, Barile A, Martin GJ, Aronson N, Emmons WW, Stephan K, Bloor S, Vingerhoets J, Hertogs K, Larder B 2000. Prevalence of genotypic and phenotypic resistance to anti-retroviral drugs in a cohort of therapy-naïve HIV-1 infected US military personnel. *AIDS* 26:1009-1015.

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

Wensing AM, Boucher CA 2003. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. *AIDS Rev* 5:140-155.

Westby M, van der Ryst E 2005. CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir Chem Chemother* 16:339-354.

www.imunopaedia.org Acesso Janeiro 2009.

www.salvagetherapies.org Acesso Janeiro 2009.

www.tibotec.com Acesso Janeiro 2009.

www.uhweb.hartford.edu Acesso Janeiro 2009.

Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393: 705-711.

Yerly S, Rakik A, De Loes SK, Hirschel B, Descamps D, Brun-Vézinet F, Perrin L 1998. Switch to unusual amino acids at codon 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene in seroconvertors infected with zidovudine-resistant variants. *J Virol* 72:3520-3523.

Yerly S, Kaiser L, Race E, Bru JP, Clavel F, Perrin L 1999. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet* 354:729-733.

Yerly S, Vora S, Rizzardì P, Chave JP, Vernazza PL, Flepp M, Telenti A, Battegay M, Veuthey AL, Bru JP, Rickenbach M, Hirschel B, Perrin L; Swiss HIV Cohort Study 2001. Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. *AIDS* 23:2287-2292.

Zhang L, He T, Huang Y, Chen Z, Guo Y, Wu S, Kunstman KJ, Brown RC, Phair JP, Neumann AU, Ho DD, Wolinsky SM 1998. Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72: 9301–9312.

9. ANEXO - Metodologia

9.1 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de sangue total colhido com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA): 500 µl de amostra de sangue-EDTA é tratada com solução de lise de hemácias [sucrose 1 M (Sigma), Tris HCl 1 M (Invitrogen), MgCl₂ 1 M (Invitrogen) e 1 ml de Triton-X 100 (Invitrogen), quantidade suficiente para (qsp) 100 ml de água ultrapura (Gibco)]. A mistura é homogeneizada em vórtex, centrifugada a 4000 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos (min) e o sobrenadante desprezado. É adicionado 1 ml de DNAzol (Sigma) e incubado por 15 min para promover a lise de células mononucleares periféricas. À essa solução é acrescentado etanol absoluto (Merck) para precipitação do DNA genômico, seguido de resfriamento à temperatura de -80°C por 1 hora (h) e centrifugado a 14000 rpm por 25 min em temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o precipitado de DNA genômico é lavado por duas vezes com 1 ml de etanol 80% por centrifugação (14000 rpm por 2 min e 14000 rpm por 5 min) e o sobrenadante desprezado. O DNA genômico é incubado por 30 min em estufa a 60°C ou por 12 h à temperatura ambiente e posteriormente solubilizado em 50 µl de água ultrapura. As amostras de DNA genômico contendo o DNA proviral foram armazenadas à temperatura de -80°C.

9.2 Extração do RNA Genômico

A extração do RNA foi realizada através do kit de extração QIAamp® Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme protocolos do fabricante: a partir

de 140 µl de amostra de plasma, 5,6 µl da enzima carrier-RNA e 560 µl do tampão de lise, seguido por 10 min de incubação a temperatura ambiente (15-25°C), as partículas virais circulantes sofrem lise e o RNA é precipitado com 560 µl de etanol absoluto (Merck). Durante uma rápida centrifugação (8000 rpm por 1 min), o RNA é adsorvido a uma membrana de sílica. Seguem-se duas etapas rápidas de centrifugações com um volume de 500 µl de tampão de lavagem em cada etapa, para que as proteínas e outros contaminantes sejam retirados garantindo a pureza do RNA. A eluição do RNA da coluna de sílica é realizada com uma rápida de centrifugação com 60 µL de tampão de eluição. As amostras de RNA foram armazenadas à temperatura de -80°C.

9.3 Síntese do DNA Complementar Através da Retrotranscrição do RNA

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

9.4 Amplificação do Gene *env* e *gag* do HIV-1 Através da Reação em Cadeia da Polimerase em Duas Etapas (“nested”-PCR)

A amplificação dos genes *env*, fragmento de aproximadamente 560 pb (HXB2, 6816-7380) e *gag*, fragmento de aproximadamente 460 pb (HXB2, 1123-1589) foi realizada segundo Heyndrickx e colaboradores (2000) com algumas modificações. Na primeira etapa da “nested”-PCR foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ a 15 mM (Invitrogen), dNTP a 25 mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5 U/μl (Invitrogen), *primers* externos para a região *env* ED5 e ED12 (Gibco) ou para a região de *gag*, H1P202 e H1G777 (Gibco), 10 μl do DNA genômico e água ultra pura (Gibco) qsp 50 μl.

H ₂ O Ultra Pura.....	32,1 μl
Tampão de PCR 10x + MgCl ₂ 15 mM	5 μl
Mistura de dNTP 25 mM.....	0,4 μl
<i>Primer</i> 10 pmoles/μL.....	1 μl
<i>Primer</i> 10 pmoles/μL.....	1 μl
Taq 5 U/μL.....	0,5 μl
Amostra de DNA.....	10 μl
Volume total.....	50 μL

Na segunda etapa da “nested”-PCR foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ a 15 mM (Invitrogen), dNTP a 25 mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5 U/μl (Invitrogen), *primers* internos para a região *env* ED31 e ED33

(Gibco) ou para a região de *gag*, H1Gag1584 e g17 (Gibco), 10 µl do produto da primeira etapa da “nested-PCR” e água ultra pura (Gibco) qsp 100 µl.

H ₂ O Ultra Pura.....	63,5 µl
Tampão de PCR 10x + MgCl ₂ 15 mM	16,7 µl
Mistura de dNTP 25 mM.....	0,8 µl
<i>Primer</i> 10 pmoles/µL.....	4 µl
<i>Primer</i> 10 pmoles/µL.....	4 µl
Taq 5 U/µL.....	1 µl
Produto da 1ª etapa.....	10 µl
Volume total.....	100 µL

As duas etapas da “nested”-PCR foram realizadas em termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA). As duas etapas de amplificação da região do gene *env* foram realizadas utilizando o seguinte programa de ciclagem: 3 ciclos 97°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min, 32 ciclos a 94°C por 45 seg, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min, 1 ciclo 72°C por 10 min e 4°C por tempo indeterminado.

A primeira etapa de amplificação da região *gag* foi realizada utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo a 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 50°C por 30 seg e 72°C por 90 seg, 1 ciclo a 72°C por 7 min e 4°C por tempo indeterminado. Já, a segunda etapa de amplificação da região *gag* foi realizada com o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo a 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg,

50°C por 30 seg e 72°C por 60 seg, 1 ciclo a 72 °C por 7 min e 4°C por tempo indeterminado.

As informações sobre as sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados na “nested”-PCR encontram-se na tabela 2.

9.5 Amplificação das Cepas de Referência do Gene *env* e *gag* do HIV-1 Através de PCR

Regiões do gene *env* e *gag* de cepas de referência de subtipos conhecidos inseridas em plasmídeos de DNA foram obtidas mediante convênio com o *NIH/AIDS Research and Reference Reagent Program, USA*. As cepas de referência foram amplificadas com os *primers* empregados na segunda etapa da “nested”-PCR. Desta forma, a etapa de hibridização de DNA para realização da HMA (amostra-teste + cepa de referência) emprega fragmentos de comprimentos semelhantes.

Para a subtipagem do HIV-1 na região do gene *env* e *gag* pela HMA foram utilizadas cepas de referência representando os subtipos genéticos do HIV-1 prevalente no Brasil: B (B1, B2, B3), C (C1, C2), D (D1, D3) e F (F1, F2). Cada subtipo possui pelo menos duas cepas de referência provenientes de isolados diferentes pertencentes ao mesmo subtipo.

9.6 Amplificação do Gene *pol* e *gp41* do HIV-1 Através da Reação de “nested”-PCR

Duas regiões diferentes do gene *pol* foram alvos de amplificação por “nested”-PCR e a *gp41* do gene *env* do HIV-1: o gene completo da PR (HXB2, 2253-

2549), o fragmento de aproximadamente 750 pb do gene da TR (HXB2, 2550-3299) e o fragmento de 766 pb do gene da gp41 do HIV-1 (HXB2, 7641-8406).

Na primeira etapa da “nested”-PCR foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), dNTP a 25 mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5 U/μl (Invitrogen), *primers* externos para a região *pol*, Kozal-1 e Kozal-2 ou para o gene da gp41, HJ54 e HR Ext a 10 pmol/μL cada (Gibco), 5 μl do cDNA obtido por RT-PCR e água ultra pura (Gibco) qsp 50 μl.

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

Na segunda etapa da “nested-PCR” foram utilizados tampão de PCR 10x (Invitrogen), MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), dNTP a 25 mM (Invitrogen), Taq DNA polimerase a 5 U/μl (Invitrogen), *primers* internos para a região *pol*, DP10 e Frenkel-2 ou para a região da gp41, HJ53 e Ava 1 a 10 pmol/μl cada (Gibco), 5 μl do produto da primeira etapa da “nested-PCR” e água ultra pura (Gibco) qsp 100 μl.

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

As duas etapas da “nested”-PCR para a região *pol* do HIV-1 foram realizadas utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo de 94°C por 1 min, 35 ciclos de 94°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 2 min, extensão final de 72°C por 10 min e 4 °C por tempo indeterminado. E a primeira etapa da “nested”-PCR para a região da gp41 do HIV-1 foi realizada utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 40 seg e 72°C por 1 min e 15 seg e extensão final de 72°C por 10 min. Já, a segunda etapa da “nested”-PCR para a região da gp41 do HIV-1 foi realizada utilizando o seguinte programa de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 min, 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 40 seg e 72°C por 1 min, extensão final de 72°C por 10 min e 4°C por tempo indeterminado.

Tabela 2. Sequência dos *Primers* de 5' → 3' para o Gene *env*, *gag* e *pol* do HIV-1.

Nome Primers	Sequência 5' → 3'	Localização HXB2*	Comprimento (pb)
ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6556-6581	26 pb
ED12	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG	7822-7792	30 pb
ED31	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG	6816-6844	29 pb
ED33	TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC	7359-7380	22 pb
H1P202	CTAATACTGTATCATCTGCTCCTGT	1874-1898	25 pb
H1G777	TCACCTAGAACTTTGAATGCATGGG	777-801	25 pb
H1Gag1584	AAAGATGGATAATCCTGGG	1123-1141	19 pb
g17	TCCACATTTCCAACAGCCCTTTTT	1566-1589	24 pb
K1	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	2147-2166	20 pb
K2	TTTCCCCTACTAATTCTGTATGTCATTGAC	3309-3338	30 pb
DP10	CAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG	2198-2223	26 pb
DP16	CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC	2253-2274	22 pb
DP17	AAAATTTAAAGTGCAGCCAAT	2529-2549	21 pb
DP11	CCATTCCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	2572-2598	27 pb
RT9	GTACAGTATTAGTAGGACCTACACCTGTC	2469-2598	29 pb
RT1	CCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA	2604-2632	29 pb
F2	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	3301-3321	21 pb
F3	TATCAGGATGGAGTTCATAAC	3241-3261	21 pb
HJ54	GTRGAGGRGAATTTTTCTAYTG	7357-7378	22 pb
HR Ext	GGYGGTAGCTGAARAGGCACAG	8511-8532	22 pb
HJ53	GGARATATGAIGGACAATTGGAGAAGTG	7641-7668	28 pb
AVA 1	CKGGTYCCCTCGGGIYTGGG	8387-8406	20 pb
JH41	CAGCAGGWAGCACKATGGG	7798-7816	19 pb
EN27	CTGGYATAGTGCARCARCA	7861-7879	19 pb

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

9.7 Eletroforese em Gel de Agarose 1%

Os fragmentos de amplificação obtidos através da amplificação pela “nested”-PCR do gene *env* e *gag* foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% (Gibco) em presença de brometo de etídio 0,005% (50 µl de brometo de etídio/ 1 L de tampão Tris-Acetato-EDTA [TAE] 1x, Gibco). Uma mistura contendo 5 µl de material amplificado e 2 µL do corante marcador da corrida Xileno Cianol 0,2% (Sigma) foi aplicada no gel e paralelamente 7 µl da mistura de padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen).

Já, os fragmentos de amplificação obtidos através da amplificação pela “nested”-PCR do gene *pol* e da gp41 do HIV-1 foram analisados por meio de aplicação de uma mistura contendo 4 µl de produto de amplicon e 1 µl de azul de bromofenol puro (Gibco) ao gel e paralelamente 4 µl de uma mistura de padrão de peso molecular (100 bp Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e 1 µl de azul de bromofenol puro (Gibco). Este marcador de peso molecular consiste em uma mistura de fragmentos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pb contendo 200, 120, 80, 40, 20, e 10 ng de DNA, respectivamente.

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

9.8 Análise da Mobilidade de Heteroduplex (HMA) dos Subtipos do Gene *env* e *gag* do HIV-1

A técnica da HMA foi realizada segundo Heyndrickx e colaboradores (2000). Para geração dos híbridos é acrescida à 5 µl da amostra-teste, a solução contendo 5 µl das diferentes cepas de referência a 10 ng/mL em Tris HCl 10 mM (pH 7,4) e EDTA 0,1 mM (pH 8,0) e 1,2 µl de tampão de anelamento 10x (NaCl 1 M Art Lab, Tris HCl 100 mM Invitrogen, pH 7,8, EDTA 20 mM, Sigma). A mistura é aquecida a 94°C durante 2 min e imediatamente resfriada em banho de gelo por 10 min. É adicionado à mistura 2 µl do corante marcador de corrida (azul de bromofenol 0,1%) e posteriormente aplicada no gel de poliacrilamida a 5% este é preparado conforme o descrito a seguir:

Solução Estoque de Acrilamida /Bisacrilamida	8,3 ml
Tris-Borato-EDTA 10x - TBE 10x.....	5,0 ml
Persulfato de Amônia - APS.....	50 mg
N,N,N',N'-TetraMethylEthyleneDiamine - TEMED.....	33 µl
H ₂ O Ultra Pura qsp	50 ml

A solução estoque de Acrilamida/Bisacrilamida é preparada a 30% em Acrilamida e 0,8% em Bisacrilamida, em água Milli-Q. O TBE 10x concentrado é preparado a partir de ácido bórico 5,5%, Tris-base 10,8%, 40 ml de EDTA 0,5M pH 8,0 e água ultra pura qsp 1000 ml. Para a subtipagem genética na região *gag*, o gel de poliacrilamida é preparado com uréia 20% (Invitrogen). O gel é polimerizado durante

60 min em placas de vidro de 16 cm de altura x 19,5 cm de largura (placa anterior) e 19 cm de altura x 19,5 cm de largura (posterior), espaçadores de 1,5 mm de espessura e pentes com 20 canaletas.

A eletroforese é realizada em cuba vertical (V16-2 Vertical Gel Apparatus, Gibco) durante 2,5 h a 250 V em TBE 1x com uma pré-corrida de 15 min a 250 V antes da aplicação das amostras.

O gel foi corado através da imersão em TBE 1x com brometo de etídio 0,005% durante 20 min. A mobilidade dos híbridos foi analisada no transluminador sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda.

9.9 Purificação dos Produtos Amplificados dos Genes *pol* e *gp41* do HIV-1 Obtidos Através da “nested”-PCR

Os produtos amplificados da segunda etapa da “nested”-PCR dos genes *pol* e *gp41* foram purificados empregando-se o kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme protocolos do fabricante: 96 µl do produto amplificado da segunda etapa da “nested”-PCR são adicionados a 480 µl de tampão com alta concentração de sais caotrópicos que modifica a estrutura da água e permite um pH ótimo para ligação eficiente de produtos de PCR de dupla fita e, ainda é removedor de primers, sais, enzimas e nucleotídeos não incorporados. Mediante uma etapa rápida de centrifugação (13000 rpm por 1 min), o produto de PCR é adsorvido a uma membrana de sílica. Segue-se uma etapa rápida de centrifugação com um volume de 750 µl de tampão de lavagem, para que as proteínas e outros contaminantes sejam retirados garantindo a pureza do produto de PCR. Uma etapa

rápida de centrifugação adicional é requerida para eliminação total de resíduos dos tampões. A eluição do produto puro de PCR da membrana de sílica é realizada com 50 µl de tampão de eluição que provoca a redução do pH e da concentração de sais, seguida por uma incubação de 1 min a temperatura ambiente e uma etapa rápida de centrifugação. As amostras de produto de PCR purificadas foram armazenadas à temperatura de -20°C.

9.10 Sequenciamento Automatizado dos Genes *pol* e *gp41* do HIV-1

Os produtos de PCR purificados do gene *pol* e da *gp41* do HIV-1 foram submetidos ao sequenciamento automatizado utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare). Em placas de 96 poços (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) foram adicionados 2 µl de produto de PCR purificado, 3 µl de tampão de sequenciamento 5x (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA), 4 µl de cada um dos 8 primers separadamente a 1,5 pmol/µl para o gene *pol* (Gibco) (DP10, DP11, DP16, RT9, RT1, RT4, F2 e F3) e 4 primers separadamente a 1,5 pmol/µl para o gene da *gp41* (Gibco) (HJ53, JH41, EN27 e AVA 1), 1 µl de DyeNamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) e 5 µl de água ultra pura (Gibco). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático com o seguinte programa de ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 seg, 50°C por 15 seg e 60 °C por 60 seg.

Os produtos sequenciados foram submetidos à precipitação com isopropanol e etanol para purificação do material. Foram adicionados à placa contendo amostra sequenciada, 60 µl de isopropanol 65% (Merck), homogeneizadas em vórtex por 30 seg, seguida de incubação por 20 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Seguiu-se uma centrifugação de 45 min a 2000 *g* (força centrífuga relativa a gravidade). Após esse período os sobrenadantes foram descartados por inversão das placas em papel absorvente por 2 min. Foram adicionados 250 µl de etanol 60% (Merck) seguida por centrifugação por 10 min a 2000 *g*. Novamente os sobrenadantes foram descartados e adicionados 100 µl de etanol 60% (Merck) seguido por centrifugação por 10 min a 2000 *g*. Os sobrenadantes foram descartados e a placa invertida foi centrifugada por 1 min a 500 rpm para sua completa secagem. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) para desnaturação da fita dupla de DNA, seguida por um período de incubação de 2 min a 95°C e choque térmico em gelo por 2 min. Finalmente, a leitura dos eletroferogramas foi realizada em sequenciador automático (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) do Laboratório de Genética e Genômica de Plantas, Instituto de Ciências Biológicas 1 (ICB-I/UFG) sob responsabilidade do Professor Doutor Alexandre Siqueira Guedes Coelho.

9.11 Análise dos Cromatogramas

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

edição (gap4) e análise de sequências de DNA e proteínas (spin) e foi obtido gratuitamente através do site <http://staden.sourceforge.net/>.

Todas as sequências geradas através da edição manual no programa *Staden Package* foram submetidas a análises de controle de qualidade para garantir ausência de possíveis contaminações entre as amostras (Learn et al. 1996). Esta análise foi realizada através do programa de bioinformática *HIV Quality Analysis Pipeline* (<http://www.sanbi.ac.za>), que testa as sequências para possíveis existências de contaminações usando BLAST (comparação) com um banco de dados público no GenBank de aproximadamente 200.000 sequências publicadas e um BLAST com o banco de dados interno do laboratório.

9.12 Análise Genética

A presença de mutações relacionadas à resistência aos ARVs foi avaliada com a ferramenta de bioinformática do programa da Universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database - <http://hivdb6.stanford.edu>) que, define as mutações a partir de diferenças da sequência consenso do subtipo B do HIV-1. Através da análise de similaridade genética, as mutações virais encontradas pela técnica de sequenciamento são interpretadas e fornecem informação do perfil de resistência as drogas ARVs (suscetível, potencial de baixo nível, baixo nível, intermediário e alto nível de resistência). Além disso, a análise de resistência aos ARVs também foi avaliada através da comparação com o banco de dados da Sociedade internacional de Aids dos Estados Unidos da América (IAS-USA). Nos meses de fevereiro e abril de 2009, todas as sequências foram submetidas a uma nova análise de resistência, a fim

de que os resultados fossem padronizados em um único período. A ferramenta de calibração da população com resistência (CPR), da Universidade de Stanford, também foi utilizada para estimar a prevalência de resistência primária dentro da população virgem de tratamento.

A definição dos subtipos genéticos dos isolados do HIV-1 estudados foi realizada empregando diversas ferramentas de subtipagem do HIV como: programa REGA HIV-1 versão 2.0 (Oliveira et al. 2005) através do site <http://www.bioafrica.net/subtypetool/html>, programa Jumping Profile Hidden Markov Model (jpHMM-HIV, Zhang et al. 2006) através do site <http://jphmm.gobics.de> e por fim, inferência filogenética.

A construção da árvore filogenética foi realizada através do alinhamento das sequências de estudo com sequências de referência mais representativas dos diversos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1 obtido através do banco de dados Los Alamos HIV Database (http://hiv_web.lanl.gov). O alinhamento foi obtido através do programa Clustal X versão 2.0 (Thompson et al. 1994) obtido através do site <http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>. O alinhamento foi editado manualmente através do programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall 1999) obtido através do site <http://mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>. Por fim, a árvore filogenética foi construída através do método neighbor-joining (Nei & Kumar 2002) e modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura 1980) com valor de suporte (*bootstrap*) de 1000 replicatas, usando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al. 2007), obtido através do site http://www.megasoftware.net/fixe_d_bugs.html. A sequência do vírus da imunodeficiência símian do chimpanzé (SIVcpz) foi utilizada como grupo externo.

Os isolados virais que apresentaram subtipos discordantes em mais de uma região genômica do HIV-1 foram analisados para confirmação da recombinação através do programa SIMPLOT versão 3.5.1 (Lole et al. 1999), sob os seguintes parâmetros: método neighbor-joining, modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com valor de bootstrap de 1000 replicatas, janela de 200 pb com passos de 20 pb, *gap-stripped* e taxa de transversão/transição no valor de 2,0.

Todas as sequências dos isolados do HIV-1 obtidas nesse estudo foram depositadas no banco de dados do GenBank com os seguintes números de acesso: FJ548786 - FJ548823; FJ594127 - FJ594185; FJ618909 - FJ618910; FJ638422 - FJ638467; FJ687040 - FJ687053 e FJ784162 - FJ784238.

10. ANEXO - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

n° _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA
Rua 235 s/n Setor Universitário CEP 74605050
Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase - Laboratórios n° 326, 327 e 335.
Telefones: (62) 32096111 32096106



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar como voluntário em uma investigação sobre infecção pelo HIV/AIDS. Você será informado sobre todas as etapas da investigação. Caso você aceite participar da investigação, assine ao final deste documento. Caso não queira participar, você não sofrerá nenhum tipo de prejuízo no seu tratamento, assistência, cuidado ou acompanhamento.

Informações sobre a Pesquisa

Título do Projeto: ESTUDO DE RESISTÊNCIA GENÉTICA A ANTIRETROVIRAIS E MAPEAMENTO GENÉTICO MOLECULAR DO HIV-1 NO CENTRO-OESTE E NORTE DO BRASIL

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

Descrição da Pesquisa

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

Procedimento da Pesquisa

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

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

Os resultados sobre o tipo de HIV-1 que causou sua infecção e se este vírus sofreu alteração e pode não responder ao tratamento serão repassados ao laboratório onde você faz seus exames de carga viral e contagem de CD4 ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento. Se você tem alguma dúvida relacionada ao estudo neste momento ou durante a investigação, você poderá contactar o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Laboratório de Imunologia da AIDS, Prof Dra Mariane Martins de Araújo telefone 0XX62 3209 6111 que estará disponível para esclarecer suas dúvidas.

Participação

A sua participação é voluntária, você pode recusar e retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem nenhum prejuízo na realização dos exames de rotina de acompanhamento ou no tratamento da infecção pelo HIV.

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

Confidencialidade

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

Consentimento

Eu, _____,
RG/CPF nº. _____ concordo em participar deste estudo. Certifico que fui informado sobre o estudo, estou ciente que minha participação é voluntária, que responderei a um questionário e serei submetido a uma única coleta de sangue. Sei que posso desistir de participar

deste estudo em qualquer momento sem ter nenhum tipo de prejuízo no meu tratamento/assistência ou acompanhamento. Concordo, inclusive, com a possível publicação dos resultados dessa pesquisa em forma de resumos e/ou artigos científicos em revistas, pois sei que os pacientes serão identificados por códigos. Informo que aceito participar/ou que o menor de 18 anos sob minha responsabilidade participe da investigação.

Assinatura do participante ou responsável pelo menor

Assinatura do entrevistador

Assinatura do Pesquisador

Data: ____/____/____

Testemunhas não vinculadas à equipe de pesquisadores:

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

Nome _____ Assinatura _____

Nome _____ Assinatura _____

11. ANEXO - Questionário

n° _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA
Rua 235 s/n Setor Universitário CEP 74605050
Laboratório de Imunologia da Aids e da Hanseníase - Laboratórios n° 326, 327 e 335.
Telefones: (62) 32096111



QUESTIONÁRIO SOBRE FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HIV

DADOS GERAIS

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

Nome do (a) Médico (a):.....

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

N° do Prontuário:.....

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

Endereço:.....

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

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

Telefones para Contatos:.....

Escolaridade:.....**Profissão:**.....

Tipo de Exposição:

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

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

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

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

Em Esquema Anti-retroviral?

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

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

NNRT:.....

NRT:.....

IP:.....

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

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

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

Observações:.....

.....
.....
.....

_____ Data/...../.....

Assinatura do responsável pelo Questionário

12. ANEXOS - Pareceres dos Comitês de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO ESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 073/05

Goiânia, 18/10/2005

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Prof.^a Mariane Martins de Araújo Stefani

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

Área Temática: Grupo III

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

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

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

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

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



SES
SECRETARIA
DA SAÚDE



Estado de Goiás

Hospital de Doenças Tropicais Dr. Anuar Auad - HDT

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que a Dr^a. Ludimila Paula Vaz Cardoso está autorizada a realizar pesquisa nesta Unidade referente ao projeto: “Estudo de residência genética a antiretrovirais e mapeamento genético molecular do HIV-1 no centro oeste e norte do Brasil”, aprovado pelo Comitê de Ética do HC/UFG.

Goiânia, 11 de dezembro de 2006.


Dr. Boaventura Braz de Queiroz
Diretor Geral / HDT

Missão: Oferecer Assistência especializada na área de doenças infecciosas, dentro do contexto público visando a reintegração do paciente e promover o conhecimento científico.

Visão: Ser um serviço de excelência em infectologia, uma das referências mencionadas no tratamento de saúde de doenças infecciosas, pautando-se pela alta resolutividade diagnóstica e terapêutica.

Hospital Dr. Anuar Auad
Av. Contorno n.º 3556 Jardim Bela Vista – Goiânia-GO – Fone/Fax: (62) 3249-3122

13. ANEXO – Financiamento do Projeto de Pesquisa



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
PROGRAMA NACIONAL DE DST e AIDS

SEPN 511, Bloco C, Térreo
70.750-543 Brasília - DF
Tel. (61) 3448-8142

Ofício Circular 760 UPDT/PN-DST-AIDS/SVS/MS

Brasília, 06 de fevereiro de 2006.

A Sua Senhoria o (a) Senhor (a)
Mariane Martins de Araújo Stefani
Rua 55 nº 462 - Jardim Goiás
Goiânia / GO
74810230

Assunto: **Resultado da seleção de pesquisas em resposta à Chamada para Seleção de Pesquisas Epidemiológicas, Clínicas e Clínico-epidemiológicas, Comportamentais, Sociais e em Direitos Humanos em DST/HIV/AIDS na Região Norte e na região Centro-Oeste – Convocatória N° 03/2005.**

Prezado (a) Senhor (a),

1. A seleção das pesquisas encaminhadas em resposta à Chamada para Seleção de Pesquisas Epidemiológicas, Clínicas e Clínico-epidemiológicas, Comportamentais, Sociais e em Direitos Humanos em DST/HIV/AIDS na Região Norte e na região Centro-Oeste – Convocatória nº03/2005 foi recentemente concluída e informamos que a proposta: *Estudo de Resistência Genética a Antiretrovirais e Mapeamento Genético Molecular do HIV-1 no Centro-Oeste e Norte do Brasil*, sob a sua coordenação, foi **aprovada**.
2. Será encaminhado um e-mail a V.Sa. solicitando o envio da documentação legal complementar necessária à formalização do contrato.
3. Lembramos entretanto que, ao longo da revisão do projeto para fins de preparação do contrato, poderão ser solicitadas adequações às condições e exigências dos órgãos financiadores.

Atenciosamente,

Márcio Antonio de Sá
Assessor Responsável Adjunto
Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

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](#)