

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – UNIFESP
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA / PÓS – GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS**

LUIZ HENRIQUE GAGLIANI

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS
NOS PACIENTES COM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV – 1) NO
MUNICÍPIO DE SANTOS / SP – BRASIL**

**SÃO PAULO
2009**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LUIZ HENRIQUE GAGLIANI

**ESTUDO DA RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS
NOS PACIENTES COM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV – 1) NO
MUNICÍPIO DE SANTOS / SP – BRASIL**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro

SÃO PAULO

2009

Gagliani, Luiz Henrique

Estudo da resistência genotípica primária aos antirretrovirais nos pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV – 1) no Município de Santos / SP – Brasil. Luiz Henrique Gagliani – Santos / SP – Brasil, 2009.

151f., XX.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação Ciências Básicas em Infectologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz
Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Montani Caseiro

Título em Inglês: Study of the Primary Antiretroviral Genotypic Resistance in Patients with Human Immunodeficiency Virus (HIV – 1) in Santos city / SP – Brazil.

1. Aids 2. Linfócitos TCD4+ 3. Carga viral HIV – 1 4. Subtipagem 5. Genotipagem 6. Antirretrovirais 7. Resistência Primária.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO - UNIFESP
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA / PÓS – GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Infectologia	Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz
Chefe da Disciplina de Infectologia	Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Sérvolo de Medeiros
Chefe do Departamento de Medicina	Prof. Angelo Amato Vincenzo de Paola

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP 0500/07) e no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Lusíada (UNILUS) – Fundação Lusíada.

Todo o estudo obteve suporte financeiro do projeto temático FAPESP sob o nº 2004/15856-9, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP 0189/05).

LUIZ HENRIQUE GAGLIANI

ESTUDO DA RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA AOS ANTIRRETROVIRAIS NOS PACIENTES COM VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV – 1) NO MUNICÍPIO DE SANTOS / SP – BRASIL

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz
Disciplina de Infectologia. Universidade Federal de São Paulo

BANCA EXAMINADORA

Membros Titulares:

Prof. Dr. Davi Salomão Lewi
Disciplina de Infectologia. Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Arnaldo Etzel
Fundação Lusíada. Centro Universitário Lusíada

Prof^a. Dr^a. Shirley Vasconcelos Komninakis
Fundação Lusíada. Centro Universitário Lusíada

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
Disciplina de Infectologia. Universidade Estadual de São Paulo

Membros Suplentes:

Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granado
Disciplina de Infectologia. Universidade Federal de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Araripe Sucupira
Laboratório de Retrovirologia. Universidade Federal de São Paulo



Serviço Público Federal
Universidade Federal de São Paulo
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa



ATA DA REUNIÃO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos vinte e três dias do mês de junho do ano dois mil e nove, reuniu-se no Anfiteatro Octávio Ribeiro Ratto às 8:30 horas, a Comissão Julgadora para a DEFESA DE TESE DE DOUTORADO, solicitada por LUIZ HENRIQUE GAGLIANI, aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS BÁSICAS EM INFECTOLOGIA, que apresentou tese sob o Título: ESTUDO DA RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA AOS ANTIRETROVIRAIS NOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS PELO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA (HIV-1) NO MUNICÍPIO DE SANTOS - SP.

A referida Comissão esteve constituída pelos Professores Doutores:


Prof. ARNALDO ETZEL - Professor Doutor - Centro Universitário Lusiada, - Fundação Lusiada;
Prof. Dr. DAVI SALOMÃO LEWI - Professor Adjunto da Disciplina de Doenças - Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Medicina - Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina;
Prof. JORGE SIMÃO DO ROSÁRIO CASSEB - Professor Adjunto - Departamento de Dermatologia e Imunologia - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo;
Prof. RICARDO SOBHIE DIAZ - Livre-Docente - Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Infectologia - Universidade Federal de São Paulo;
Profa. SHIRLEY VASCONCELOS KOMNINAKIS - Professora Adjunta - Disciplina de Biologia Molecular e Celular - Centro Universitário Lusiada - UNILUS;

O(a) Presidente Prof. RICARDO SOBHIE DIAZ, inicia a sessão dando a palavra ao(a) candidato(a), que dispõe de trinta minutos no máximo, para expor sua tese. A seguir dá a palavra aos Professores para a arguição. Cada examinador(a) dispõe de trinta minutos, no máximo, para arguição, bem como o(a) candidato(a) para as respostas. Tendo o(a) candidato(a) respondido todas as arguições em tempo hábil os membros da Banca Examinadora, emitiram seus Pareceres:


Prof. Drs. :

ARNALDO ETZEL, APROVADO
DAVI SALOMÃO LEWI, Aprovado
JORGE SIMÃO DO ROSÁRIO CASSEB, APROVADO
RICARDO SOBHIE DIAZ, APROVADO
SHIRLEY VASCONCELOS KOMNINAKIS, Aprovado

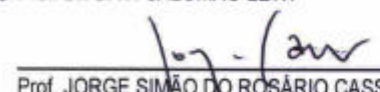
Em face dos referidos pareceres, a Comissão Julgadora considera o(a) Sr(a) LUIZ HENRIQUE GAGLIANI habilitado(a) a receber o título de DOUTOR EM CIÊNCIAS pela UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO. E por estarem de acordo, assinam a presente ata. São Paulo, terça-feira, 23 de junho de 2009.



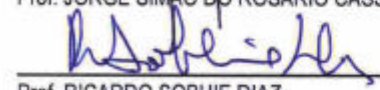
Prof. ARNALDO ETZEL



Prof. Dr. DAVI SALOMÃO LEWI



Prof. JORGE SIMÃO DO ROSÁRIO CASSEB



Prof. RICARDO SOBHIE DIAZ



Profa. SHIRLEY VASCONCELOS KOMNINAKIS

A minha esposa Sandra e meus filhos Arthur Henrique e Ricardo Henrique com muito carinho, cúmplices dessa conquista, pela inesgotável paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz pela paciência e confiança depositada.

Ao Reitor do Centro Universitário Lusíada Dr. Nelson Teixeira, pessoa singular na minha vida, no qual sou eternamente grato. Agradeço o apoio financeiro e principalmente a confiança oferecida.

Ao amigo Professor Dr. Charles Artur Santos de Oliveira por todo apoio e incentivo a pesquisa e acreditar no meu potencial.

Ao meu amigo Professor Dr. Marcos Montani Caseiro, por todo ensinamento e paciência durante as conquistas e progresso na Ciência.

AGRADECIMENTOS

Ao amigo Wagner Alkmim ao confiar e acreditar em mim no qual sou eternamente grato, por ter depositado todo empenho a essa pesquisa.

Ao Charlys Costa pela amizade e colaboração em todos os momentos.

Aos colegas do laboratório: Marta, Valéria, Carla Teixeira, Shirley, Daniela, Érika, Michel, Camila, Dercy Sá Filho, Cecília Sucupira, Mário Janini, pelas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao amigo Alcino Antonio Campos Golegã Diretor do CRAIDS, pelo apoio e confiança nesse projeto.

Ao Professor Frederico Kauffmann Barbosa e Fernando Kauffmann Babosa, pelo apoio e dedicação, os quais contribuíram de forma significativa no auxílio à formatação e na análise estatística, respectivamente.

À equipe médica, enfermeiros, assistentes sociais, psicólogos, auxiliares, funcionários e todo apoio do Centro de Referência em Aids de Santos, Prefeitura Municipal de Santos.

Aos pacientes e todos aqueles que de forma direta ou indireta estiveram envolvidos nessa pesquisa.

Ao Grande Arquiteto do Universo que com seu manto sagrado me deu força e energia para alcançar mais uma vitória.

LISTA DE PUBLICAÇÕES (RESULTADOS PARCIAIS)

1. The association between primary antiretroviral resistance and HAART virological failure in a developing set. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Cecília Sucupira, Ricardo Sobhie Diaz. XVIII International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles & Clinical Implications, 9– 13 June, Fort Myers, Florida, USA, 2009.
2. Primary antiretroviral resistance and HIV – 1 is the major determinant of HAART virologic failure in the city of Santos, Brazil. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Maria Cecília A. Sucupira, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. 7th European HIV Drug Resistance Workshop, 25 – 27 March, Stockholm, Sweden, 2009.
3. Primary drug antiretroviral resistance and HIV – 1 subtype among antiretroviral – naïve patients immediately before starting haart in Santos, Brazil. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. International Aids Conference, Mexico city, Mexico, 2008.
4. Estudo comparativo da avaliação imunológica e virológica dos pacientes recém diagnosticados pelo HIV – 1 Santos – São Paulo – Brasil. Rafael Gonçalves de Azevedo*, Marcos Montani Caseiro, Luiz Henrique Gagliani*. Revista “The Brazilian Journal of Infectious Diseases”, Volume 11, Supplement 2, October 2007. p. 21 - ISSN 1413-8670.
5. Primary drug antiretroviral resistance and HIV – 1 subtype among antiretroviral – naïve patients immediately before starting haart in Santos, Brazil. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. Brazilian Aids Research Conference. Itapema, Santa Catarina, Brazil, 2007.
6. Avaliação imunológica e virológica inicial dos pacientes diagnosticados pelo HIV – 1 no CRAIDS – Santos – São Paulo – Brasil. Luiz Henrique Gagliani*, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; II Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa e I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagem – Campos de Jordão – São Paulo – Brasil. 2007.
7. Prevalência das doenças diagnosticadas até 2005 nos pacientes que iniciaram o tratamento do HIV – 1 (2000 e 2001) matriculados no CRAIDS – Santos – São Paulo – Brasil. Luiz Henrique Gagliani*, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; II Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa e I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagem – Campos de Jordão – São Paulo – Brasil. 2007.

RESUMO

Uma das principais causas de falência terapêutica é o surgimento de cepas resistentes aos inibidores da transcriptase reversa (IRT) e da protease (IP). O processo de replicação do vírus HIV – 1 promove alta taxa de mutação devido aos erros inerentes à atividade da transcriptase reversa. Portanto, é comum em indivíduos sob tratamento e com carga viral detectável, o surgimento e seleção de cepas resistentes. O Estado de São Paulo é considerado como um dos epicentros da epidemia de Aids no Brasil, sendo que o município de Santos possui um dos maiores portos da América Latina e devido às rotas de comércio internacional atua como introdutor e difusor do HIV – 1 no sudeste brasileiro, com uma alta incidência de infecção, alta prevalência da resistência antirretroviral primária e de alta prevalência de vírus recombinante B/F. Tem sido também reconhecido que a falência virológica ao tratamento antirretroviral é alta nesta cidade, entretanto, não existem dados recentes e abrangentes a respeito da caracterização genotípica, da frequência dos subtipos e resistência primária do HIV – 1. O objetivo do estudo foi avaliar os perfis virológico e imunológico e a resistência primária em pacientes virgens de tratamento aos medicamentos antirretrovirais e os fatores relacionados à falência virológica após 48 semanas de *HAART* nesta população. Foram analisados os prontuários dos pacientes recém diagnosticados e cadastrados no ano de 2000 e 2001, num total de 594 pacientes. Destes pacientes estudados no período citado, apenas 315 realizaram os exames de quantificação da carga viral e a contagem da subpopulações dos linfócitos TCD4+/TCD8+ no momento do seu diagnóstico. Posteriormente dos 315 pacientes foram selecionados 80 virgens de tratamento aos antirretrovirais, para a realização do exame de genotipagem, no qual foram comparados os perfis demográficos do HIV – 1 entre os indivíduos com sucesso virológico versus falência virológica após 48 semanas de iniciação aos antirretrovirais. Os pacientes que realizaram a genotipagem (N=80), foram divididos em dois grupos: Grupo 1 (N=43) são os pacientes que após a introdução do tratamento aos antirretrovirais não conseguiram atingir os níveis de quantificação de carga viral abaixo de 50 cópias/mL, isto é a carga viral se manteve detectável após seis meses de tratamento. Grupo 2 (N=37) são os pacientes que conseguiram se manter com os níveis de quantificação da carga viral, indetectáveis após seis meses de tratamento. Todos os indivíduos estudados iniciaram *HAART*, sendo que foram considerados aderentes aos antirretrovirais, de acordo com a frequência que obtiveram as suas medicações prescritas pelo médico e a partir de uma farmácia centralizada. O HIV - 1 foi seqüenciado na região *pol* a partir do plasma em amostras armazenadas a – 80° C, coletadas imediatamente antes do início do tratamento. Ao avaliar os pacientes (N=315) a contagem média das células TCD4+ foi de 320 células/ μ L. Destes pacientes 98 (31%) tinham TCD4+ menor que 200 células/ μ L, 69 (22%) TCD4+ entre 200 e 350 células/ μ L; 57 (18%) TCD4+ entre 350 e 500 células/ μ L e 91 (29%) com TCD4+ acima de 500 células/ μ L, mostrando a importância do diagnóstico. Em relação a carga viral a média foi de 180.000 cópias/ml e o “log” médio foi de 4,28. Ainda referente a quantificação da carga viral avaliou-se que 40,2% estavam, acima de 30.000 cópias/mL e 22% maior que 100.000 cópias/mL, indicando uma imunossupressão e mostrando a importância do diagnóstico precoce do vírus HIV-1. A determinação da contagem das subpopulações dos linfócitos TCD4+ e a quantificação da Carga viral do HIV – 1, ambos exames representam a pedra angular no acompanhamento, estadiamento e

a avaliação da resposta terapêutica dos antirretrovirais. Deve-se considerar também que a determinação da contagem das subpopulações dos linfócitos TCD4+ é um indicador do estágio evolutivo da doença, bem como o determinante fundamental na terapêutica. Avaliar as condições imunológicas dos pacientes recém diagnosticados, que chegam ao serviço de referência em Aids de Santos, é de grande valia, no momento que inicia o tratamento médico, sendo justificado pelos resultados apresentados, no qual destacamos que 53% dos pacientes tinham contagem de TCD4+ menor que 350 células/ μ L do total estudado (N=315), indicando uma imunossupressão, mostrando nitidamente a importância do diagnóstico precoce pelo HIV-1, sabendo que, segundo os critérios do Consenso Nacional Brasileiro de tratamento para a infecção pelo vírus HIV -1, os mesmos já deveriam estar fazendo uso de medicações antirretrovirais. Quando analisamos a resistência primária dos pacientes do Grupo 1 (N=43) 21 (48,8%) comparada com o Grupo 2 (N=37) 6 (16,2%), ao longo de 48 semanas concluímos que os pacientes do grupo 1 por apresentarem maior prevalência de mutações relacionadas à resistência aos fármacos antirretrovirais prescritos ($p < 0,005$), eles não conseguiram atingir os níveis de quantificação de carga viral abaixo de 50 cópias/mL, isto é, a carga viral se manteve detectável após seis meses de tratamento até final do estudo. Em relação às classes dos medicamentos antirretrovirais, os pacientes do grupo 1 e 2 apresentaram resistência de 16,2% aos IRTNN; 20% aos IRTN e 2,5% aos IP. Quanto a resistência de pelo menos duas classes de ARVs (IRTNN e IRTN) foram 5% e não foi observado nenhum paciente resistente as três classes de ARVs. Na determinação da prevalência dos subtipos do HIV – 1 baseada nas seqüências do gene *pol*, a classificação filogenética das seqüências puras foi de 80% do subtipo B e 7,5% F. Quanto as seqüências recombinantes B/F foi de 12,5% mostrando uma preocupação epidemiológica na cadeia de transmissão porque essas cepas recombinantes estão infectando novos indivíduos e predominando nos pacientes recém diagnosticados. Não foram encontradas diferenças significativas basais observadas na carga viral e níveis de TCD4+ com relação aos antirretrovirais utilizados ou a demografia entre os 2 grupos, pacientes portadores de vírus resistentes e tipo selvagem. A prevalência de 33,7% de resistência primária aos antirretrovirais entre os pacientes foi considerada extremamente elevada nesta região, portanto, em regiões atípicas como a cidade de Santos, seria de grande valia apoiar o conceito de realizar exames de genotipagem antes de iniciar o tratamento antirretroviral, fato fundamental, efetivo e econômico para o serviço público, embora alguns indivíduos com resistência primária têm conseguido uma supressão viral empírica sob HAART, a estreita associação entre a resistência primária e falência virológica pode sugerir que essa resistência dificulte gradativamente a atividade dos antirretrovirais.

Palavras-chave: Aids. Linfócitos TCD4+. Carga viral HIV – 1. Subtipagem. Genotipagem. Antirretrovirais. Resistência Primária.

ABSTRACT**STUDY OF THE PRIMARY ANTIRETROVIRAL GENOTYPIC RESISTANCE IN PATIENTS WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS (HIV-1) IN SANTOS CITY / SP – BRASIL**

One of the main causes of therapeutic failure is the appearance of strains resistant to reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) and protease (PI). The process of replication of HIV - 1 promotes high rate of mutation due to errors inherent in the activity of reverse transcriptase. Therefore, it is common in individuals under treatment and with detectable viral load, the appearance and selection of resistant strains. The State of São Paulo is considered one of the epicenters of the AIDS epidemic in Brazil, and the city of Santos has one of the biggest ports of Latin America and because the routes of international trade acts as a diffuser and introducer of HIV-1 in the Southeast Brazil, with a high incidence of infection, high prevalence of primary antiretroviral resistance and high prevalence of recombinant viruses B/F. It has also been recognized that virological failure to antiretroviral treatment is high in this city, however, there are no recent and comprehensive data on the genetic characterization of the frequency of subtypes and primary resistance of HIV-1. The objective of the study was to evaluate the virological and immunological profiles and primary resistance in patients naïve to antiretroviral drugs treatment and the factors related to virological failure after 48 weeks of HAART in this population. We analyzed the charts of newly diagnosed patients registered in 2000 and 2001, as a total of 594 patients. From these patients studied during the period cited, only 315 were tested for quantification of viral load and counts of lymphocyte subpopulations of CD4+T cells/+ TCD8 at the time of diagnosis. Later among the 315 patients were selected 80 naïve to antiretroviral treatment, for the test for genotyping, in which were compared the demographic profiles of HIV-1 among individuals with virological success versus virological failure after 48 weeks of initiation of antiretroviral. Patients in which we performed genotyping (n = 80) were divided into two groups: Group 1 (N=43) are the patients that after the introduction of antiretroviral treatment failed to achieve the quantification levels of viral load below 50 copies/mL, in other words, the viral load remained detectable after six months of treatment. Group 2 (N=37) patients who were able to remain with the quantification of viral load on undetectable levels after six months of treatment. All studied subjects started HAART, which were considered adherent to antiretroviral according to how often they obtained their medications prescribed by a doctor and from a centralized drugstore. The HIV-1 was sequenced in the pol region from plasma samples stored at - 176°C, collected immediately before starting treatment. When evaluating the patients (N=315) the average cell count CD4+T cells was 320 cells/ μ L. 98 (31%) of these patients had CD4+T cells below 200 cells/ μ L, 69 (22%) CD4+T cells between 200 and 350 cells/ μ L, 57 (18%) CD4+T cells between 350 and 500 cells/ μ L and 91 (29%) with CD4+T cells above 500 cells/ μ L, showing the importance of diagnosis. In relation to the average viral load was 180,000 copies/mL and the "log" average was 4.28. Still concerning the quantification of viral load assessed that 40.2% were above 30,000 copies/mL and 22% higher than 100,000 copies/mL, indicating an immunosuppression and showing the importance of early diagnosis of HIV-1. The

determination of the counts of lymphocyte subpopulations of CD4+T cells and quantification of viral load of HIV-1, both tests represent a cornerstone in monitoring, staging and assessment of antiretroviral therapeutic response. One should also consider that the determination of the counts of lymphocyte subpopulations of CD4+T cells is an indicator of the stage of the disease, and the decisive role in therapy. To evaluate the immunological conditions of patients newly diagnosed who come to the referral service on AIDS of Santos, is of great value in the moment you start the treatment, being justified by the results presented, in which is highlighted that 53% of patients had counting CD4+T cells below 350 cells/ul from the total studied (N=315), indicating an immunosuppression, showing clearly the importance of early diagnosis of HIV-1, knowing that according to the criteria of the Brazilian Consensus for the treatment of HIV-1 infection, they should already be using antiretroviral medications. When we analyze the primary resistance of the patients in Group 1 (N = 43) 21 (48.8%) compared with Group 2 (N = 37) 6 (16.2%) during over 48 weeks we conclude that group 1 patients, due to higher prevalence of mutations associated with resistance to antiretroviral drugs prescribed ($p < 0.005$), failed to achieve the quantification of viral load below 50 copies/mL, in other words, viral load remained detectable after six months of treatment by the end of the study. Concerning the classes of antiretroviral drugs, patients in group 1 and 2 showed resistance of 16.2% to IRTNN; 20% to IRTN and 2.5% to PI. Regarding the resistance of at least two classes of ARVs (IRTNN and IRTN) were 5% and there was no studied patient resistant to at least two of the three classes of ARVs. In determining the prevalence of subtypes of HIV-1 based on the pol gene sequences, the phylogenetic classification of pure sequences was 80% of subtype B and 7.5% F. As the sequences recombinant B/F it was 12.5% showing a concern in the epidemiological chain of transmission because these recombinant strains are infecting new individuals and are predominant in newly diagnosed patients. No significant baseline differences were observed in viral load and levels of CD4 + T cells regarding the antiretroviral used or the demographics between the 2 groups, patients with resistant virus and patients with the wild type. The 33.7% prevalence of primary resistance to antiretroviral among patients was considered extremely high in this region, so as atypical regions in the city of Santos, would be of great value to support the concept of conducting examinations of genotyping before starting treatment antiretroviral, indeed essential, effective and economical for the public service, although some individuals with primary resistance have achieved an empirical viral suppression under HAART, the close association between primary resistance and virological failure may suggest that this resistance make the activity of antiretroviral gradually difficult.

Keywords: AIDS. Lymphocyte CD4+T cells. HIV-1 viral load. Subtyping. Genotyping. Antiretroviral. Primary resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV – 1.....	7
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO HIV.....	8
FIGURA 3 - CICLO DO DESENVOLVIMENTO DO VÍRUS HIV-1.....	9
FIGURA 4 - SOFTWARE PARA EDIÇÃO DO SISTEMA DE GENOTIPAGEM DE HIV – 1 VIROSEQ™ APPLIED BIOSYSTEMS.	41
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MOSAICO DE ESTRUTURAS DO GENOMA COMPLETO DAS DEZ SEQÜÊNCIAS RECOMBINANTES ANALISADAS, MOSTRANDO NA REGIÃO <i>POL</i> OS SEGMENTOS IDENTIFICADOS EM AZUL CORRESPONDEM O SUBTIPO B, OS SEGMENTOS EM VERDE CORRESPONDEM O SUBTIPO F.....	66
FIGURA 6 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA PARA O GENE <i>POL</i> DAS SEQÜÊNCIAS PURAS (N=70), INFERIDA POR NEIGHBOR-JOINING, DOS SUBTIPOS DO HIV – 1 B E F.	72
FIGURA 7 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA PARA O GENE <i>POL</i> DAS SEQÜÊNCIAS RECOMBINANTES (N=10), INFERIDA POR NEIGHBOR-JOINING, DOS SUBTIPOS DO HIV – 1 F/B E B/F.....	73
FIGURA 8 - FILOGENIA PARA O GENE <i>POL</i> DAS SEQÜÊNCIAS RECOMBINANTES (N=10), INFERIDA POR NEIGHBOR-JOINING, DOS SUBTIPOS DO HIV – 1 F/B E B/F.	73
FIGURA 9 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 1 (PACIENTE 17).	74
FIGURA 10 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B DO GRUPO 1 (PACIENTE 19).....	74
FIGURA 11 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 1 (PACIENTE 27).	74
FIGURA 12 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS B/F GRUPO 1 (PACIENTE 32).	75
FIGURA 13 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 1 (PACIENTE 43).	75
FIGURA 14 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 2 (PACIENTE 04).	75
FIGURA 15 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 2 (PACIENTE 07).	76

FIGURA 16 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 2 (PACIENTE 28).	76
FIGURA 17 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 2 (PACIENTE 33).	76
FIGURA 18 - IDENTIFICAÇÃO DE RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS F/B GRUPO 2 (PACIENTE 36).	77
GRÁFICO 1 - MÉDIA DA CONTAGEM DE TCD4+ / TCD8+ DOS PACIENTES RECÉM DIAGNOSTICADOS (N=315).....	55
GRÁFICO 2 - MÉDIA DE RESULTADO DA CARGA VIRAL (Nº DE CÓPIAS) DOS PACIENTES RECÉM DIAGNOSTICADOS (N=315).....	55
GRÁFICO 3 - TOTAL DE RESULTADOS DA CONTAGEM DE TCD4+/TCD8 DOS PACIENTES RECÉM DIAGNOSTICADOS PELO HIV – 1 (N=315).....	56
GRÁFICO 4 - RESULTADO DA CONTAGEM DOS LINFÓCITOS TCD4+ DOS PACIENTES (N=315), FRENTE A PADRONIZAÇÃO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE.....	56
GRÁFICO 5 - RESULTADO DA CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4+ DOS PACIENTES (N=315) FRENTE A PADRONIZAÇÃO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE QUE DEVERIAM ESTAR EM TRATAMENTO ANTIRETROVIRAL.	57
GRÁFICO 6 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DO EXAME DE CARGA VIRAL NOS PACIENTES DO GRUPO 1 E 2 NO PERÍODO DE 12 MESES.....	68
GRÁFICO 7 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA BIVARIADA (EXPONENCIAL) DO EXAME DE CARGA VIRAL NOS PACIENTES DO GRUPO 1 E 2 NO PERÍODO DE 12 MESES.....	68
GRÁFICO 8 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DO EXAME DE CARGA VIRAL NOS PACIENTES DO GRUPO 1 E 2 (WT E MUT) NO PERÍODO DE 12 MESES.....	69
GRÁFICO 9 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA BIVARIADA (EXPONENCIAL) DO EXAME DE CARGA VIRAL NOS PACIENTES DO GRUPO 1 E 2 (WT E MUT) NO PERÍODO DE 12 MESES.....	69
GRÁFICO 10 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DO EXAME DE CONTAGEM DE TCD4 NOS PACIENTES DO GRUPO 1 E 2 NO PERÍODO DE 12 MESES.....	70
GRÁFICO 11 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA BIVARIADA (EXPONENCIAL) DO EXAME DE CONTAGEM DE TCD4 NOS PACIENTES DO GRUPO 1 E 2 NO PERÍODO DE 12 MESES..	70
GRÁFICO 12 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DO EXAME DE CONTAGEM DE TCD4 NOS PACIENTES DO GRUPO 1 + GRUPO 2 (WT E MUT) NO PERÍODO DE 12 MESES.....	71

GRÁFICO 13 - AVALIAÇÃO PROSPECTIVA BIVARIADA (EXPONENCIAL) DO EXAME DE
CONTAGEM DE TCD4 NOS PACIENTES DO GRUPO 1 + GRUPO 2 (WT E MUT) NO
PERÍODO DE 12 MESES..... 71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS TAXAS DE CEPAS RESISTENTES EM DIFERENTES PAÍSES.....	22
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DA PORCENTAGEM DE RESISTÊNCIA ÀS DIFERENTES CLASSES DE DROGAS ANTIRRETROVIRAIS EM PAÍSES DESENVOLVIDOS.....	22
TABELA 3 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NA REAÇÃO DE <i>NESTED-PCR</i>	47
TABELA 4 - <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO DE UM FRAGMENTO DO GENE <i>POL</i> DO HIV-1.....	49
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO POR SEXO.....	53
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO POR IDADE (N=315).....	53
TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO POR FATOR DE RISCO (N=315).....	54
TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO POR ESCOLARIDADE (N=315).....	54
TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO POR ESTADO CIVIL (N=315).....	54
TABELA 10 - RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA: MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ARVs NOS PACIENTES DO GRUPO 1 (N=43) VIRGENS DE TRATAMENTO.....	58
TABELA 11 - MÉDIAS DA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL (CÓPIAS/ML) E DA CONTAGEM DA SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4/CD8 (CÉLULAS/ μ L) DOS GRUPOS 1 E 2 VIRGENS DE TRATAMENTO E APÓS A INTRODUÇÃO ARVs DURANTE 12 MESES.....	59
TABELA 12 - RESISTÊNCIA GENOTÍPICA PRIMÁRIA: MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ARVs NOS PACIENTES DO GRUPO 2 (N=37) VIRGENS DE TRATAMENTO.....	59
TABELA 13 - ANTI-RETROVIRAIS PREVIAMENTE ADMINISTRADOS NO INÍCIO DO TRATAMENTO DOS 43 PACIENTES DO GRUPO 1 MATRICULADOS NO CRAIDS ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2001.....	61
TABELA 14 - ANTI-RETROVIRAIS PREVIAMENTE ADMINISTRADOS NO INÍCIO DO TRATAMENTO DOS 37 PACIENTES DO GRUPO 2 MATRICULADOS NO CRAIDS ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2001.....	62
TABELA 15 - PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ARVs NOS 43 PACIENTES DO GRUPO 1 VIRGENS DE TRATAMENTO.....	63
TABELA 16 - PREVALÊNCIA DE MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ARVs NOS 37 PACIENTES DO GRUPO 2 VIRGENS DE TRATAMENTO.....	63
TABELA 17 - MUTAÇÕES DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT) PARA ITRNNs PARA OS SUBTIPOS B, F E RECOMBINANTES B/F,F/B NOS PACIENTES DO GRUPO 1.....	64

TABELA 18 - MUTAÇÕES DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT) PARA ITRNNS PARA OS SUBTIPOS B, F E RECOMBINANTES B/F,F/B NOS PACIENTES DO GRUPO 2.	64
TABELA 19 - MUTAÇÕES DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT) PARA ITRNS PARA OS SUBTIPOS B, F E RECOMBINANTES B/F NOS PACIENTES DO GRUPO 1.....	64
TABELA 20 - MUTAÇÕES DE TRANSCRIPTASE REVERSA (RT) PARA ITRNS PARA OS SUBTIPOS B, F E RECOMBINANTES B/F NOS PACIENTES DO GRUPO 2.....	64
TABELA 21 - MUTAÇÕES NA PROTEASE PARA OS SUBTIPOS B, F E RECOMBINANTES B/F NOS PACIENTES DO GRUPO 1.....	65
TABELA 22 - MUTAÇÕES NA PROTEASE PARA OS SUBTIPOS B, F E RECOMBINANTES B/F NOS PACIENTES DO GRUPO 2.....	65
TABELA 23 - FREQUÊNCIA DE SUBTIPOS E RECOMBINANTES INTERSUBTIPOS DO HIV – 1 PELA ANÁLISE DO GENE POL.	65
TABELA 24 - FORMAS DE EXPOSIÇÃO AO HIV EM PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2 MATRICULADOS NO CRAIDS ENTRE AOS ANOS DE 2000 E 2001.....	67
TABELA 25 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E GRAU DE ESCOLARIDADE DOS PACIENTES DOS GRUPOS 1 E 2 MATRICULADOS NO CRAIDS ENTRE OS ANOS DE 2000 E 2001....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
<	Menor
µg	Microgramas
µg/mL	micrograma por mililitro.
µL	Microlitro
µM	Micromolar
0 C	Graus <i>Celsius</i>
3TC	Lamivudina
A	Adenina
ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana.
AMP/APV	Amprinavir
ART	Anti-retrovirais
ATV	Atazanavir
AZT/ZDV	Zidovudina
C	Citosina
CO ₂	Dióxido de carbono
CRFs	Formas recombinantes circulantes do HIV
CV	Carga Viral
d4T	Estavudina
ddC	Zalcitabina
ddI	Didanosina
ddNTPs	Didesoxirribonucleotídeos trifosfato
DLV	Delavirdina
DNA	Abreviação designando ácido desoxirribonucléico.
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EC	Concentração efetiva em testes de fenotipagem
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EFV	Efavirenz
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)

env	Envelope
et al	Colaboradores
FTC	Emtricitabina
G	Guanina
g	Gramas
HAART	Terapêutica anti-retroviral altamente efetiva (do inglês highly active antiretroviral therapy)
HIV	Abreviação do inglês Human Immunodeficiency Virus (vírus da Aids).
IDV	Indinavir
IG	Intermediária genotipagem
IP	Inibidor de Protease
ITRN	Inibidor da transcriptase reversa análogo aos nucleosídeos
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não-análogo aos nucleosídeos
ITT	Análise por intenção de tratamento
LIPA	Teste de hibridização com uso de sondas dispostas em linha
LPV	Lopinavir
LTRs	Repetições Terminais Longas (<i>Long Terminal Repeats</i>)
M	Molar
MDR	Resistência a múltiplas drogas
mg	Miligrama
mg/L	Miligrama por litro
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MRG	Médico referência em genotipagem
MS	Ministério da Saúde
<i>M-Tropic</i>	Tropismo por célula que expressa o co-receptor CCR5
NAN	Mutações associadas aos nucleosídeos
NFV	Nelfinavir
ng	Nanograma
ng/μL	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol

NVP	Nevirapina
PCR	Reação em Cadeia pela polimerase
PR	Protease
PRAM	Mutações associadas à protease
PTI	Interrupção parcial dos anti-retrovirais
RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
RF	Resistente fenotipicamente
RG	Resistente genotipicamente
RNA	Abreviação designando o ácido ribonucléico.
RNAm	Ácido ribonucléico – mensageiro
RPM	Rotações por minuto
RTV	Ritonavir
SQV	Saquinavir
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Timina
T20	Enfuvirtida
TAM	Mutações associadas aos timidínicos (AZT e d4T)
TBE	Tris borato EDTA
TDF	Tenofovir
TPV	Tipranavir
TR	Transcriptase reversa
<i>T-Tropic</i>	Tropismo por célula que expressa o co-receptor CXCR4
UDI	Usuários de Drogas Intravenosas.
UNAIDS	Comitê das Nações Unidas para a aids (<i>Joint United Nations Programme</i>).
<i>vif</i>	Fator de Infectividade Viral
Volts	unidade de corrente elétrica
<i>vpr</i>	Proteína viral R
<i>vpu</i>	Proteína viral U
X	Vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HIV	1
1.2 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV	5
1.3 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HIV	7
1.4 VARIABILIDADE GENÔMICA DO HIV	9
1.5 TERAPIA ANTI-RETROVIRAL	12
1.6 RESISTÊNCIA DO HIV AOS ANTI-RETROVIRAIS	15
1.7 RESISTÊNCIA PRIMÁRIA DO HIV – 1	16
1.8 TESTES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS	23
1.9 REDE NACIONAL DE GENOTIPAGEM DO HIV	24
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 CASUÍSTICA	28
3.1.1 <i>Pacientes matriculados no CRAIDS no período de 2000/2001</i>	30
3.1.2 <i>Critério de Inclusão Inicial</i>	30
3.1.3 <i>Critérios de inclusões posteriores</i>	30
3.1.4 <i>Critérios de exclusões</i>	31
3.1.5 <i>Coleta de Amostras</i>	31
3.1.5.1 <i>Separação do Plasma</i>	32
3.1.6 <i>Transporte das Amostras</i>	32
3.1.7 <i>Armazenamento das Amostras</i>	32
3.2 TÉCNICAS PADRONIZADAS.....	33
3.2.1 <i>Contagem de linfócitos TCD4+/TCD8+</i>	33
3.2.2 <i>Quantificação da Carga Viral do HIV – 1</i>	36
3.2.3 <i>Genotipagem do HIV – 1 (ViroSeq™)</i>	37
3.2.3.1 <i>Preparação de Amostras</i>	38
3.2.3.2 <i>Transcrição Reversa</i>	38
3.2.3.3 <i>Reação da Cadeia Polimerase</i>	39
3.2.3.4 <i>Reação de Seqüenciamento</i>	40

3.2.3.4.1 Purificação da PCR.....	41
3.2.3.4.2 Quantificação do DNA	42
3.2.3.4.3 Reação de Seqüenciamento	42
3.2.3.4.4 Purificação da Reação de Seqüenciamento	43
3.2.3.5 Detecção Automática de Seqüências	43
3.2.3.6 Análise do Software ViroSeq	44
3.2.4 Genotipagem do HIV – 1 in house (Reação de Cadeia Polimerase).....	45
3.2.4.1 Extração de RNA do plasma.....	45
3.2.4.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	46
3.2.4.3 Amplificação de ácidos nucleicos: NESTED – PCR para região pol Protase e Transcriptase Reversa do HIV – 1	47
3.2.4.4 Purificação de Produto da PCR	48
3.2.4.5 Sequenciamento da Região pol do HIV-1	49
3.2.4.6 Detecção dos Fragmentos Seqüenciados.....	50
3.2.4.7 Análise, Compilação e Alinhamento das Sequências	50
3.2.4.7.1 Inferência Filogenética	50
3.2.4.7.2 Identificação de recombinantes intersubtipos	51
3.2.4.8 Análises Estatísticas	52
4 RESULTADOS	53
4.1 EXPOSIÇÃO AO TRATAMENTO INICIAL AOS ARVs (GRUPO 1 E 2).....	60
4.2 PERFIL DE MUTAÇÕES E RESISTÊNCIA DOS GRUPO 1 E 2.....	62
4.3 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS	67
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
GLOSSÁRIO	113
ANEXO A - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS – PACIENTES DO GRUPO 1 (N=43).....	116
ANEXO B - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS – PACIENTES DO GRUPO 2 (N=37).....	133

ANEXO C - LISTA DE PUBLICAÇÕES (A PARTIR DE RESULTADOS PARCIAIS)
..... 148

ANEXO D - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)..... 149

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HIV

A aids nome derivado da denominação original em língua inglesa (acquired immunodeficiency syndrome = síndrome da imunodeficiência humana), é uma doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV = Human immunodeficiency vírus). A infecção pelo HIV/aids é um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo. Desde a descrição dos primeiros casos no início dos anos 80, na América do Norte e Europa, até os dias de hoje, a aids vem acometendo milhões de indivíduos de diferentes faixas etárias e raças. Além do enorme contingente de portadores oficialmente notificados ao redor do mundo, milhões de indivíduos convivem com HIV de forma assintomática, muitos destes sem conhecer seu estado de portador (UNAIDS, 2003; AINSWORTH; TEOKUL, 2000).

A infecção pelo HIV, logo após sua identificação no início dos anos 80, rapidamente assumiu caráter de pandemia. Aparentemente, ganhou traços epidêmicos primeiramente no Continente Africano, disseminando-se depois para as Américas, Europa e outros continentes. Um panorama da distribuição mundial da infecção pelo HIV/Aids foi apresentado, em dezembro de 2003, pela UNAIDS, Programa Conjunto das Nações Unidas contra HIV/Aids, e Organização Mundial da Saúde (UNAIDS/OMS, 2003). Estimaram haver, em 2003, 40 milhões (34 a 46 milhões) de pessoas vivas infectadas pelo HIV ou com aids (cerca de 37 milhões de adultos e 2,5 milhões de crianças com menos de 15 anos de idade), com cerca de três milhões (2,5 a 3,5 milhões) de óbitos (2,5 milhões em adultos e 500.000 em crianças com menos de 15 anos) naquele ano. Ainda de acordo com essa fonte, teriam ocorrido em 2003 cerca de cinco milhões (4,2 a 5,8 milhões) de casos novos de infecção pelo HIV (cerca de 4,2 milhões em adultos e 700.000 em crianças com menos de 15 anos). Na grande maioria dos casos a transmissão deu-se por intermédio de contato sexual. Cerca de 95% destes casos ocorreram em países

subdesenvolvidos, aproximadamente 14% foram crianças menores de 15 anos e 86% foram pessoas na faixa etária dos 15 aos 49 anos, dos quais quase 50% são mulheres. Até o final de 2001, mais de 21 milhões de mortes ocorreram no mundo em decorrência da Aids. Ainda em 2001, segundo a UNAIDS, 3 milhões de indivíduos morreram por Aids. Destes, 20% foram crianças com menos de 15 anos de idade (UNAIDS/OMS, 2003).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2008), estima-se que em 2007, havia 600.000 indivíduos de 15 a 49 anos vivendo com HIV/Aids, correspondendo a uma prevalência de 0,61%. Os dados revelam que, no Brasil, a epidemia de aids continua em expansão e encontra-se em patamares elevados, com incidência em 2005, de 18,4 casos por 100 mil habitantes. A tendência de crescimento da epidemia também foi observada em todas as regiões geográficas, com exceção da região Sudeste, que apresentou, em 2005, taxa de incidência de 24,6 por 100 mil habitantes, menor do que a observada em 1998 de 29,4 casos por 100 mil. De acordo ainda com esta publicação, até 30 de junho de 2006 haviam sido notificados 362.364 caso de aids. Até 2005, foram a óbito por aids 160.834 indivíduos, a maioria com idade acima de 13 anos (Ministério da Saúde, 2008).

Em nosso país, a epidemiologia da infecção pelo HIV tem assumido um caráter dinâmico desde o início da epidemia. A partir de meados dos anos 90, provavelmente em decorrência da política brasileira de acesso universal à terapia antirretroviral (TARV), tem se observado reduções na taxa de mortalidade por aids e no número de casos de aids notificados (Ministério da Saúde, 2006). A taxa de mortalidade relacionada a aids no Brasil caiu de 9,7 por 100 mil habitantes em 1995 para 6,4 por 100 mil habitantes em 2007 (Ministério da Saúde, 2008). Além disso, também nos últimos anos, houve diminuição da incidência de aids em determinadas populações ditas mais vulneráveis, como usuários de drogas injetáveis, profissionais do sexo e homossexuais masculinos. Por outro lado, a incidência de aids entre heterossexuais, principalmente do sexo feminino, tem aumentado (Ministério da Saúde, 2007). A sobrevivência dos pacientes com aids também aumentou. Em 1995 a sobrevivência era de 18 meses após o diagnóstico de Aids. A partir de 1996, com a introdução da terapia anti-retroviral e sua distribuição gratuita para toda a rede do SUS, a sobrevivência de pacientes com aids aumentou para 56 meses, em adulto, e para 67 meses em menores de 13 anos (Ministério da Saúde, 2008).

Outras características epidemiológicas da infecção pelo HIV/Aids no Brasil observadas nos últimos anos têm sido as tendências à interiorização e a pauperização da epidemia (Ministério da Saúde, 2008). A interiorização tem sido um fenômeno caracterizado pelo aumento do número de casos de aids em pequenos centros urbanos, padrão este que se distingue do observado no início da epidemia, quando a aids era uma doença de ocorrência quase que exclusiva de grandes centros urbanos. A pauperização, por sua vez, como o próprio nome sugere, tem sido fenômeno caracterizado pelo acometimento mais freqüente de indivíduos com menor poder aquisitivo e menos escolarizados (Ministério da Saúde, 2008).

O Estado de São Paulo é considerado como um dos epicentros da epidemia de aids no Brasil (Boletim Epidemiológico AIDS, 2008). O Município de Santos possuiu um dos maiores portos da América Latina e devido às rotas de comércio internacional atua como introdutor e difusor do HIV no sudeste brasileiro. Dados referentes à incidência de casos de aids em Santos têm estimado que ocorrem cerca de 100 novas infecções para 100.000 mil pessoas nesta localidade. As atividades das profissionais do sexo, que se estabelecem em torno da área portuária, e o elevado número de usuários de drogas (cerca de 2% da população local) têm aumentado o risco de infecção dupla pelo HIV e a conseqüente geração de vírus recombinante (CARVALHO et al., 1996).

A região do litoral paulista conhecida como Baixada Santista abrange um grande número de municípios, entre eles: Santos, São Vicente, Praia Grande e Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe e Cubatão. Programas de prevenção como o COAS, dos municípios da Baixada Santista atendem cerca de 2000 indivíduos por ano, apresentando histórico de diversas formas de exposição ao HIV-1. Tem-se estimado que 53% dos indivíduos com infecção recente possuem uma variante viral recombinante entre os subtipos B e F no Município de Santos (SUCUPIRA, 2002). Entretanto, não existem dados recentes e abrangentes a respeito da caracterização genotípica e da freqüência dos subtipos do HIV -1 em Santos.

No recente trabalho intitulado: Identification of Two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil (SA FILHO et al; 2006) foi possível identificar duas novas formas recombinantes circulantes do HIV -1 no Município de Santos, CRF28 e 29. Estas características epidemiológicas ressaltam a importância da constante caracterização das amostras de HIV – 1 obtidas no laboratório executor que realiza a quantificação da carga viral do HIV – 1.

A cidade de Santos apresenta segundo o boletim epidemiológico do município (BE Santos, N.34), no período entre 2000 e 2001, 4147 casos de Aids sendo 4031 casos em adultos e 116 casos em crianças. Durante muitos anos a cidade de Santos apresentou um dos maiores coeficientes de incidências de aids do Brasil, com um pico de casos no ano de 1992, com 448 notificações o que representa, 107 casos por 100.000 habitantes mais de um caso novo por dia. Estas cifras que permaneceram elevadas desde a organização de um serviço de referencia local em 1989 e um serviço de vigilância epidemiológica que procurou caracterizar a real situação de casos no município. Inicialmente a epidemia caracterizou-se a semelhança do Brasil como predominante entre homossexuais, sendo que a partir de 1987 já desponta a sub-categoria uso de drogas endovenosa como correspondendo a cerca de 50% dos casos na cidade, sendo que a partir de 1993 o número de casos de transmissão por esta via começa a declinar as custas de um aumento na transmissão heterossexual, que hoje corresponde à cerca de 50% dos casos. Um outro fator que chama atenção em nossa cidade e a relação homem / mulher, sendo que desde o começo da epidemia observa-se uma relação muito próxima, em torno de 3/1 até 1995, 2/1 até 1998 e a partir de 1999 1/1, fato este relevante devido à associação com a transmissão vertical que aumentou progressivamente ao longo dos anos, sendo que neste último boletim temos 134 casos de Aids entre crianças 84 casos assintomáticos. No que se refere à idade dos pacientes adultos 67,21% dos casos estão na faixa de idade entre 20 e 39 anos, e entre 20 e 49 anos encontra-se 86,74% dos casos no município. Em relação à escolaridade predomina grande parcela dos casos, cerca de 60% com grau de instrução entre 1a e 8a série. Fato certamente mais significativo correlaciona-se com a diminuição do número de casos de aids do município bem como na letalidade, em relação à primeira caiu de 448 casos em 1992, para 61 no ano de 2000 e em relação à letalidade caiu de cerca de 60% do final da década de 80 para cerca de 1,0% em 2000, ainda que estes dados sejam incompletos, refletem de forma importante à queda na mortalidade nos últimos anos que claramente esta relacionada com à introdução dos Inibidores da Protease a partir de fevereiro de 1996. Estes dados, contudo não caracterizam a real situação da epidemia no município, primeira por não considerar os dados de notificação compulsória os indivíduos HIV positivos assintomáticos que são a grande maioria, principalmente agora onde a disponibilidade de diversos marcadores de progressão de doença nos permite

interferir na história natural da doença, evitando a ocorrência de imunossupressão importante e, por conseguinte infecção oportunista. Contudo, a falta de um instrumento capaz de determinar a incidência de infecção pelo vírus HIV – 1, e monitorarmos melhor a transmissão do vírus na população em geral.

1.2 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV

O vírus da imunodeficiência humana, hoje denominado simplesmente HIV, é um dos mais importantes patógenos emergentes dos Séculos XX e XXI, Após ter sido descoberto em 1983 por grupos de pesquisadores independentes, dirigidos por Luc Montagnier (Instituto Pasteur, França) (BARRÉ-SINOUSI et al., 1983) e Robert Gallo (Instituto Nacional do Câncer, Estados Unidos da América) (GALLO et al., 1984; POPOVIC et al., 1984), o HIV passou a ser identificado como agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, doença hoje denominada no mundo todo como aids (COFFIN et al., 1986). Apesar da descoberta do HIV em 1983, estudos filogenéticos revelam ter o mesmo emergido na população humana por volta de 1931 (KORBER et al., 2000).

A descoberta do HIV permitiu grandes avanços nos campos da fisiopatologia, diagnóstico e tratamento da aids (GREENE, 1991; PALLELA et al., 1998; SCHWARTZ; NAIR, 1999). Além disso, a perspectiva de se desenvolver uma vacina eficaz contra a infecção pelo HIV/Aids se tornou meta a ser alcançada por pesquisadores em todo o mundo (FRANCIS et al., 1998; LETVIN, 1998; ESPARZA; BHAMARAPRAVATI, 2000). Todavia, a completa biologia do HIV associada à proeminente variabilidade genética e ao limitado entendimento sobre os mecanismos imunológicos envolvidos no controle desta infecção têm representado enorme desafio científico ainda longe de ser suplantado (COHEN, 2001; MOORE et al., 2001; UNAIDS/OMS, 2001; BOJAK et al., 2002; NABEL et al., 2002).

A infecção pelo HIV é uma doença infecto-contagiosa de curso crônico e progressivo caracterizada por apresentar, em seu estágio final, infecções oportunistas, neoplasias e outras manifestações clínicas decorrentes de um grave comprometimento do sistema imunológico. O curso da infecção pelo HIV pode variar amplamente de indivíduo para indivíduo. Após a infecção primária, alguns pacientes

podem permanecer assintomáticos e outros podem desenvolver, após 3 a 6 semanas, síndrome aguda semelhante a mononucleose infecciosa. Este estágio inicial da infecção pelo HIV, também denominado de síndrome retroviral aguda, é caracterizado por elevadas taxa de replicação viral e viremia plasmática e redução considerável da contagem de linfócitos TCD4+ no sangue periférico (MENDONÇA et al., 1989; GAINES et al., 1990; TINDALL, 1991).

Logo após a infecção primária, observa-se o aparecimento dos primeiros anticorpos específicos, caracterizando a fase de soroconversão do paciente (GAINES et al., 1990; ALBERT et al., 1990). Em seguida, em função da resposta imunológica do hospedeiro, a taxa de replicação viral diminui, a contagem de linfócitos TCD4+ no sangue periférico retorna ao normal ou próximo do normal e os pacientes iniciam um longo período de infecção assintomática que pode durar, em média, 8 a 12 anos (LEMP et al., 1990; GAINES et al., 1990; TINDALL, 1991). Durante este período de latência clínica, o HIV continua a se replicar, causando danos ao sistema imunológico, principalmente com redução lenta, porém progressiva, da contagem de linfócitos TCD4+ (LANE; FAUCI, 1985).

O período de latência clínica se encerra quando a imunidade do hospedeiro se encontra esgotada e debilitada, principalmente a imunidade do tipo celular. A eficácia do sistema imune em conter novas infecções e/ou a reativação de infecções latentes passa a ficar comprometida, e o indivíduo começa a manifestar doenças oportunistas. O estágio final da infecção pelo HIV se caracteriza por intensa depleção do sistema imunológico e ocorrência de infecções e neoplasias oportunistas que acabam levando o indivíduo ao óbito (LEMP et al., 1990).

A infecção pelo HIV induz uma série de respostas imunológicas do hospedeiro que incluem ativação policlonal de linfócitos B, produção de anticorpos neutralizantes, síntese e secreção de citocinas, ativação da resposta Th-1 e estimulação de respostas citotóxicas envolvendo células T NK e imunidade celular dependente de anticorpos, dentre outras (SCHWARTZ; NAIR, 1999). Apesar de todos estes mecanismos imunológicos desencadeados para tentar conter a infecção pelo HIV, sua eficácia é parcial devido a complexos mecanismos de escape do HIV. Como consequência, a infecção pelo HIV progride (MELTZER et al., 1990; CHENG-MAYER; LEVY, 1990; FOX; COTTLER-FOX, 1992; PANTALEO et al., 1993; SCHWARTZ; NAIR, 1999).

Dois parâmetros laboratoriais são importantes para o estadiamento e acompanhamento da infecção pelo HIV. São eles: a contagem de linfócitos TCD4+ no sangue periférico e a quantificação da viremia plasmática, também denominada de carga viral do HIV. O primeiro parâmetro é útil na determinação do grau de imunossupressão do portador e o segundo se correlaciona com a velocidade de progressão da doença (PIATAK et al., 1993; HUGHES et al., 1997) (Figura 1).

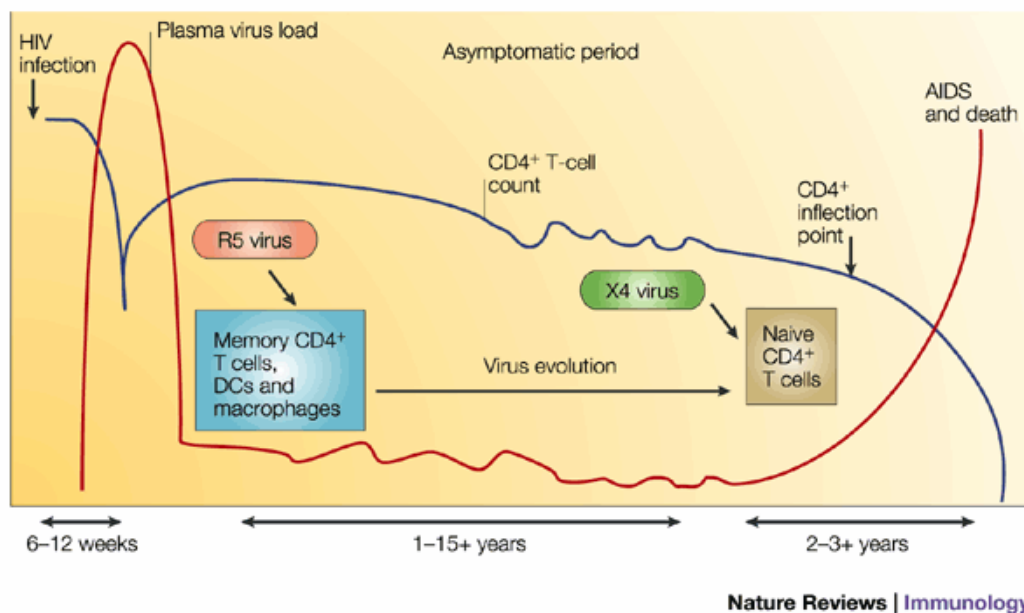


Figura ilustrativa mostrando o comportamento da contagem de linfócitos TCD4+ no sangue periférico e da quantificação da carga viral do HIV no Plasma em relação ao tempo.

Fonte: Nature Reviews Immunology, 2003.

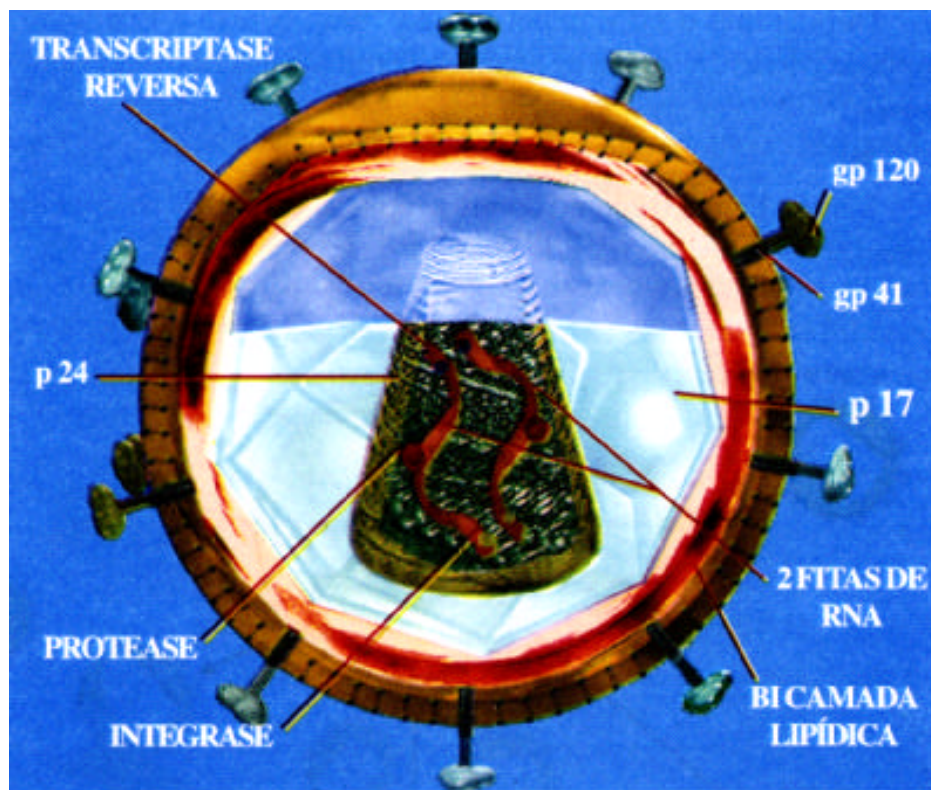
Figura 1 - História natural da infecção pelo HIV – 1.

1.3 ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DO HIV

O agente etiológico da aids, o HIV é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*. Possui envelope e é uma partícula de aproximadamente 100 nm de diâmetro. Possui genoma constituído por duas cópias de RNA de fita simples não complementares, de senso positivo, medindo cada uma 9,4 Kb e localizadas em um core revestido por envelope de dupla camada fosfolipídica (GREENE, 1991; SCHWARTZ; NAIR, 1999). O envelope é formado por uma bicamada fosfolipídica onde estão inseridas duas glicoproteínas, a gp120

(trímero com localização externa à membrana) e a gp41 (monômero transmembrana). Internamente à bicamada fosfolipídica está a matriz que é constituída pela proteína p17. O capsídeo em padrão icosaédrico é composto pela proteína p24 (GREENE, 1991; SCHWARTZ; NAIR, 1999).

O genoma é constituído didaticamente por dois tipos de genes: os estruturais (*gag*, *pol*, *env*) e os não estruturais ou acessórios (*tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* e *vpr*). Os primeiros codificam proteínas essenciais como as do core e do envelope e as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase. Já os genes estruturais ou acessórios codificam proteínas essenciais para a regulação do ciclo replicativo, tais como as proteínas Tat, Rev e Nef (GREENE, 1991; (SCHWARTZ; NAIR, 1999) (Figura 2).

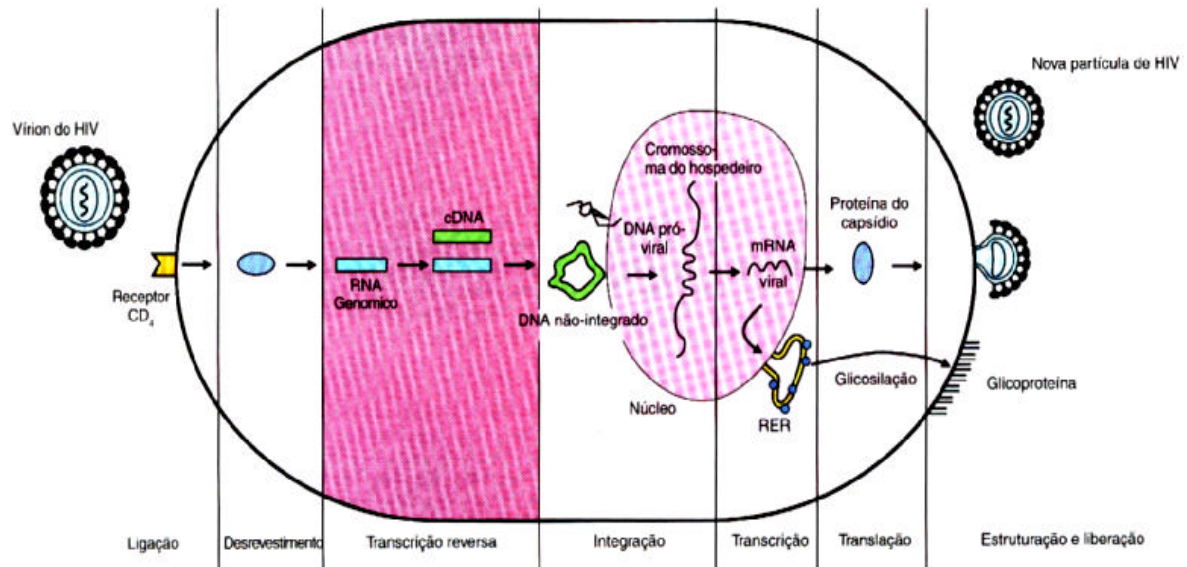


Fonte: Manual de Contagem de Linfócitos T CD4+ ,1998.

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do HIV.

O ciclo de replicação do HIV, de maneira sucinta, se caracteriza por uma etapa inicial de ligação e fusão à célula hospedeira, seguida de transcrição do RNA em DNA de fita dupla, integração ao DNA da célula hospedeira (DNA pró-viral), síntese e processamento de proteínas virais através da protease e, por fim montagem

e liberação de novas partículas virais (GREENE, 1991; SCHWARTZ; NAIR, 1999) (Figura 3).



Fonte: Atlas de Doenças Infecciosas, 1998.

Figura 3 - Ciclo do Desenvolvimento do Vírus HIV-1.

1.4 VARIABILIDADE GENÔMICA DO HIV

O HIV apresenta grande heterogeneidade no que se refere às suas características biológicas, sorológicas e moleculares. Essa heterogeneidade está diretamente relacionada ao fato de o HIV possuir genoma com elevado potencial de variabilidade (GREENE, 1991; SCHWARTZ; NAIR, 1999; McCUTCHAN, 2000). Do ponto de vista sorológico, o HIV é classificado em dois tipos: HIV – 1 e HIV – 2. Ambos estão envolvidos na epidemia da aids. Contudo, enquanto o HIV – 2 tem se mantido restrito basicamente ao continente Africano, o HIV – 1 está associado a pandemia que envolve todos os continentes (GREENE, 1991).

A variabilidade genômica do HIV decorre de vários fatores. A transcrição reversa do genoma do HIV é um evento naturalmente sujeito a erros e, durante este processo, a medida que o HIV se replica, ocorre aproximadamente um erro a cada 10.000 nucleotídeos incorporados (PRESTON et al., 1988; ROBERTS et al., 1988; TAKEUCHI et al., 1991). Como o genoma do HIV contém aproximadamente 10.000 nucleotídeos, estima-se que pelo menos uma nova mutação ocorra a cada novo

vírus produzido no organismo (PRESTON et al., 1988; PRESTON, 1997). Aliado a isto, a alta taxa de replicação viral favorece o desenvolvimento de populações virais resistentes aos anti-retrovirais. Como a carga viral nos pacientes antes do tratamento ou durante um tratamento com baixa adesão costuma ser elevada, um grande número de mutações ocorre continuamente. A maioria destas é letal ao vírus, mas outras não (MIEDEMA et al., 1990; NABEL et al., 2002).

O estudo da variabilidade genômica do HIV tem sido foco de atenção de pesquisadores no mundo todo e tem sido responsável por acúmulo de informações relevantes em vários campos da ciência. Um destes é o campo da epidemiologia molecular, com suas potenciais implicações para o desenvolvimento de vacinas, bem como para o conhecimento de aspectos relacionados a transmissão e patogênese da infecção pelo HIV (KWOK et al., 1987; MARTINS et al., 1991; LOUWAGIE et al., 1993; DIAZ et al., 1997; McCUTCHAN, 2000).

Análises filogenéticas com base na variabilidade genômica de amostras de HIV isoladas de diferentes regiões geográficas do mundo têm revelado que o HIV-1 pode ser dividido em três grupos: M (de *Major*), O (de *Outlier*) e N (de *new, non-M, non-O*).

Enquanto as amostras dos grupos O e N estão praticamente restritas ao continente Africano, com alguns casos isolados de grupo O na Europa e América do Norte, as variantes do grupo M são responsáveis pela pandemia da aids e foram subdivididas em subgrupos geneticamente relacionados, incluindo diferentes subtipos e sub-subtipos (A1,A2,B,C,D,F1,F2,G,H,J, e K) (MYERS et al., 1996; SIMON et al., 1998). Além disso, 40 formas recombinantes circulantes (CRF de *circulating recombinant forms*), outros vírus recombinantes atípicos e vários outros genomas de HIV-1 não-classificáveis têm sido identificados, bem como a ocorrência de infecções mistas (JANINI et al., 1996, RAMOS et al., 1999; FLORES et al., 1999).

Os subtipos de HIV-1 estão amplamente distribuídos no mundo, com múltiplos subtipos e vírus recombinantes co-circulando em várias áreas. A prevalência dos subtipos de HIV-1 varia em diferentes regiões do mundo e, em geral, um ou dois subtipos predominam. Na África, por exemplo, onde se concentram mais de 90% dos casos de aids, o subtipo do HIV-1 mais prevalente é o C. Já nas Américas e na Europa, a maioria dos isolados de HIV-1 pertence ao subtipo B. Além disso, a prevalência de subtipos do HIV-1 pode variar significativamente de país para país e dentro de grupos populacionais e pode sofrer

mudanças com o tempo independente do subtipo de HIV-1, todos são transmitidos de forma similar através de contato sexual, contaminação com sangue e verticalmente de mãe para filho (MYERS et al., 1996; COUTURIER et al., 2000).

No Brasil, o conhecimento da epidemiologia molecular do HIV cresceu significativamente com o surgimento da perspectiva de pesquisa envolvendo vacinas preventivas contra HIV/AIDS no início dos anos 90. Vários estudos demonstraram a predominância do subtipo B do HIV-1 no Brasil, com presença também dos subtipos F (MORGADO et al., 1994, 1996 e 1998a; GALVÃO-CASTRO et al., 1996; TANURI et al., 1999), C (WHO, 1994; LOUREIRO et al., 1998; ANTUNES, 1998), D (MORGADO et al., 1998a; TANURI et al., 1999) e mais recentemente, a presença de subtipo A (CARIDE et al., 2001). Vírus recombinantes B/F e B/C também têm sido descritos no Brasil (SABINO et al., 1994; GAO et al., 1996; CORNELISSEN et al., 1996; TANURI et al., 1999; VICENTE et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2001).

Em adição aos estudos comparativos da diversidade entre subtipos, diferenças genéticas também foram descritas entre cepas do subtipo B circulantes no Brasil. Uma variante do subtipo B foi descrita, denominada “B”, que difere dos vírus B clássicos pela presença do *motif*GWGR no topo da região hipervariável 3 (V3) da glicoproteína 120 (gp 120) do envelope ao invés do *motif* GPGR (POTTS et al., 1993; MORGADO et al., 1994; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, 2000). Estas duas variantes do subtipo B podem ser distinguidas tanto por abordagem genética (MORGADO et al., 1998a, COVAS et al., 1998) como antigênica (BONGERTZ et al., 1994; HENDRY et al., 1996; CASSEB et al., 1998). Tais observações ganharam maior relevância com a observação adicional de que “B” foi encontrada como muito prevalente em algumas áreas do Brasil, correspondendo a 57% de algumas amostras de subtipo B detectadas na cidade de Riberão Preto – SP (COVAS et al., 1998) e 37% de algumas amostras estudadas na cidade do Rio de Janeiro – RJ (MORGADO et al., 1998 a, b).

Diferenças no perfil de subtipos do HIV-1 também têm sido identificadas entre diferentes regiões do Brasil. Enquanto proporções similares de subtipos B e F foram observadas em um estudo conduzido em Manaus – AM (VICENTE et al., 2000), no Sudeste, vários estudos têm demonstrado a predominância do subtipo B (~85%) seguido pelo subtipo F (~10 a 15%) (MORGADO et al., 1994, 1998a; TANURI et al., 1999; Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization, 2000). Em relação a amostras das regiões Nordeste e Centro-Oeste, uma ampla

predominância do subtipo B (>90%) foi notada, com casos isolados de subtipos F e C (COUTO-FERNANDEZ et al., 1999; STEFANI et al., 2000). A presença do subtipo C no Sul do Brasil foi primeiramente detectada em 1 em 5 amostras de HIV-1 coletadas em Porto Alegre – RS em uma amostragem de um estudo internacional realizado pela OMS (WHO, 1994).

Esta diversidade genética do HIV-1 tem representado grande obstáculo para o desenvolvimento de uma vacina que possa ser eficaz e de aplicação universal. Embora a relevância imunológica de subtipos genéticos para a eficácia de uma vacina contra o HIV-1 ainda seja objeto de extensa investigação científica e discussão, os primeiros protocolos de vacina já testados contemplaram a inclusão de subtipos prevalentes e variantes virais locais (FRANCIS et al., 1998; LETVIN, 1998; MOORE et al., 2001; BOJAK et al., 2002; NABEL et al., 2002). A manutenção dos esforços visando o desenvolvimento de candidatos vacinais contra o HIV representa iniciativa de altíssima prioridade para saúde pública a fim de controlar os efeitos devastadores da disseminação do HIV pelo mundo (ESPARZA; BHAMARAPRAVATI, 2000; COHEN, 2001; UNAIDS/OMS, 2001; BOJAK et al., 2002).

1.5 TERAPIA ANTI-RETROVIRAL

O ano de 1986 marcou o início de uma nova fase na história da aids. Foi quando se tornou disponível para uso terapêutico a azidotimidina, ou zidovudina (AZT), um análogo de nucleosídeo inibidor da enzima transcriptase reversa do HIV, primeira droga eficaz para o tratamento da aids (FISCHL et al., 1987). Este foi o início da denominada terapia anti-retroviral (TARV), ainda em um período em que não se conhecia a fundo o detalhe sobre a fisiopatologia do HIV, nem tão pouco a importância de sua variabilidade genômica.

O AZT foi primeiro anti-retroviral de uma série que compõe a classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN). As drogas dessa classe, após fosforilação intracelular, atuam inibindo a transcrição reversa do RNA viral através de uma ação competitiva com os nucleosídeos naturais, promovendo o término precoce da síntese da cadeia de DNA pró-viral. Outros

exemplos de drogas da mesma classe dos ITRN são: estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e abacavir (ABC). O tenofovir (TDF) é outra droga inibidora da transcriptase reversa, porém, diferentemente dos outros análogos de nucleosídeos, já se encontra originalmente fosforilada sendo, portanto, um análogo de nucleotídeo (DE CLERQ, 2001).

O advento do AZT inaugurou a fase da monoterapia contra o HIV. Esta perdurou até o início dos anos 90, quando surgiram duas novas drogas da mesma classe, a didanosina (ddI) e a zalcitabina (ddC). Estudos subsequentes logo revelaram a superioridade da terapia com duas drogas ITRN em relação a monoterapia (KATLAMA et al., 1996; Delta Coordinating Committee, 1996). O entusiasmo que se seguiu à terapia anti-retroviral com duas drogas ITRN aumentou com o advento de mais duas classes de drogas: os inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeos (ITRNN) e os inibidores da protease (IP).

As drogas da classe dos ITRNN, representada por delavirdina (DLV), nevirapina (NVP) e efavirenz (EFV), também inibem a síntese do DNA pró-viral, porém, diferentemente dos ITRN, atuam através da interação direta em região hidrofóbica da transcriptase reversa localizada próxima ao sítio de ligação do substrato na enzima (DAVEY et al., 1996; DE CLERQ, 2001).

A atuação dos inibidores da protease, como o próprio nome sugere, se dá através de interação direta com o sítio catalítico da protease do HIV, impedindo sua ação (DE CLERQ, 2001). A expressão dos genes *gag* e *pol* do HIV acontece sob a forma de uma poliproteína de alto peso molecular e não funcional. O processamento desta poliproteína em proteínas individualizadas e funcionais é realizado pela aspartil protease do HIV a qual é codificada pelo gene *pol*. Esse processamento pela protease viral é essencial para a maturação e infectividade do vírus e acontece após o brotamento do vírus na célula hospedeira (TOMASSELLI; HEINRIKSON, 2000). A inibição deste processamento pelas drogas inibidoras da protease faz com que as partículas virais que brotam da célula hospedeira sejam incapazes de infectar novas células (DE CLERQ, 2001). As principais drogas inibidoras de proteases são: saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), indinavir (IDV), amprenavir (APV), nelfinavir (NFV), lopinavir (LPV) e atazanavir (ATV).

Mais recentemente, uma nova classe de antirretrovirais passou a ser disponibilizada para o uso clínico. Trata-se dos inibidores de fusão do HIV, sendo

sua primeira representante a droga denominada enfuvirtide (EFT) (KILBY et al., 1998; LAIEZARI et al., LAZZARIN et al., 2003).

O impacto da TARV foi significativo desde o advento da monoterapia com AZT (FISCHIL et al., 1987), porém, mais ainda com a terapia combinada. O desenvolvimento sucessivo de novos agentes farmacológicos de diferentes categorias e direcionados a diferentes alvos do ciclo de replicação do HIV culminou com o emprego, a partir de 1996, da estratégia de terapia combinada envolvendo drogas de classes diferentes, estágio máximo alcançado até o momento no combate à infecção do HIV. O grau de supressão da replicação viral obtido com esta estratégia passou a ser muito mais intenso e duradouro que o observado previamente com a monoterapia ou terapia com duas ou mais drogas de uma mesma classe. A repercussão deste avanço se deu sob a forma de redução no número de óbitos, diminuição do número de complicações e internamentos hospitalares, aumento da sobrevida e melhora da qualidade de vida dos pacientes (PALLELA, et al., 1998; BONFANTINI et al., 1999). Além disso, o uso de drogas anti-retrovirais durante a gravidez reduziu a quase zero a transmissão vertical do HIV (Ministério da Saúde, 1999; *The International Perinatal HIV Group*, 1999).

O Brasil tem sido reconhecido como referência mundial na definição e implementação bem sucedida de uma política pública para prevenção e tratamento da infecção pelo HIV/Aids (TEIXEIRA et al., 2004). Desde 1991, uma das características desta política tem sido a garantia do acesso universal à TARV para indivíduos portadores do HIV, segundo critérios definidos por comitês técnicos assessores (Ministério da Saúde, 2004b). Até o ano de 2004, a relação incluía 15 medicamentos anti-retrovirais, sendo cinco ITRN, um inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleotídeo, dois IRTNN, sete IP e, em 2005, foi incluído um inibidor de fusão, perfazendo 35 apresentações farmacêuticas dispensadas aos pacientes em combinações terapêuticas também chamadas popularmente de “coquetel” (Ministério da Saúde, 2004a). Segundo dados do PN DST/Aids, o número de pacientes em uso de TARV aumentou de 110.000 em 2001 para 180.000 atualmente (Ministério da Saúde, 2007; Ministério da saúde, 2008). A expectativa é de que este número aumente em decorrência da redução da mortalidade por aids observada nos últimos anos.

Outra característica da política brasileira de prevenção e tratamento da aids tem sido o acesso universal também a métodos laboratoriais de apoio

específicos para o acompanhamento e monitoramento dos doentes. Para tanto, foi criada uma rede que hoje é constituída por mais de 88 laboratórios públicos equipados para realização de exames de contagem de linfócitos TCD4+ em sangue periférico e quantificação da carga viral plasmática do HIV (Ministério da Saúde, 2007).

Apesar dos significativos avanços no combate a aids obtidos com o advento da TARV, limitações existem e novos problemas surgiram. A aplicação da TARV no mundo como um todo tem sido limitado devido aos elevados custos e a complexidade da abordagem médica em muitas áreas carentes (AINSWORTH; TEOKUL, 2000; TEIXEIRA et al, 2004). Além disso, a erradicação do HIV através da TARV mostrou-se meta impossível de ser alcançada, mesmo com a supressão prolongada da replicação viral. Esta limitação tem obrigado aos portadores o uso contínuo e indefinido das drogas ARV a fim de manter o controle sobre a replicação viral e, conseqüentemente, sobre a infecção. Com isso, os efeitos colaterais se tornaram um grave problema (MOORE, et al, 1996; LUCAS, et al, 1999; MOCROFT, et al, 2001). Por fim, a TARV trouxe poucos avanços na área de prevenção, exceto na redução do risco de transmissão vertical do HIV. O impacto da TARV na prevenção da transmissão do HIV pelas vias sexual e sanguínea parece ter sido pouco ou nenhum haja vista que milhares de pessoas por dia continuam contraindo a infecção no mundo.

1.6 RESISTÊNCIA DO HIV AOS ANTI-RETROVIRAIS

Além das limitações acima citadas relacionadas à TARV, um grave problema enfrentado em todo o mundo tem sido a emergência de cepas virais resistentes aos medicamentos (RICHMAN, 1993; JAPOUR et al., 1995; KATZENSTEIN et al., 1996; RUSCONI et al., 1996; YAHY et al., 1999; ZOLOPA et al., 1999; HANNA et al., 2000; CARIDE et al, 2001; HIRSCH, et al., 2003). As resistências virais aos antiretrovirais se subdividem em primária e secundária. A resistência primária é aquela que já está presente mesmo antes do uso da medicação pelo indivíduo infectado. Isto pode ocorrer pela transmissão de cepas resistentes ou mesmo pela geração de mutantes resistentes em um indivíduo

infectado, decorrente do alto índice de replicação do HIV (HIRSH, et al., 2003). A resistência secundária é aquela que emerge em decorrência da pressão de seleção exercida pela medicação antirretroviral. Depois de determinado tempo de exposição a TARV, um *pool* de vírus com várias mutações conferindo resistência às drogas ATV, passa a circular no organismo. Sob pressão seletiva das drogas, estes vírus mutantes sobrevivem e, em intervalo de tempo tão curto quanto 4 semanas, emergem e se tornam dominantes (COFFIN, 1995; DOMINGO, 1997; HIRSCH et al., 2003).

A resistência a uma droga antirretroviral pode advir de uma única mutação ou após o acúmulo de várias mutações nos genes da transcriptase reversa e/ou protease (DOMINGO, 1997; VENTURI, et al, 2000; DEEKS, 2001; LOVEDAY, 2001; MILLER, 2001; HIRSH, et al, 2003). As mutações presentes nos genes que codificam a transcriptase reversa e a protease do HIV, que conferem resistência aos anti-retrovirais, podem ser definidas como principais ou primárias e acessórias ou secundárias. De uma forma geral, as mutações principais são aquelas que determinam uma redução da susceptibilidade às drogas, exigindo um aumento na quantidade das drogas necessárias para inibir a enzima. As mutações acessórias podem aumentar o nível de resistência por melhorar a adaptabilidade (“*fitness*”) do vírus que apresenta a mutação principal. Normalmente, as mutações acessórias apresentam pouco ou nenhum efeito no nível de resistência na ausência das mutações principais (DEEKS, 2001; LOVEDAY, 2001; MILLER, 2001).

1.7 RESISTÊNCIA PRIMÁRIA DO HIV – 1

No HIV a maioria das mutações que ocorrem causam efeito deletério no vírus. Uma mutação deletéria possui, potencialmente, vários destinos diferentes sob uma população, entre eles a extinção, a persistência com alguma frequência e a reversão ao estado parental (tipo selvagem). Pode também ser compensada por uma ou mais mutações em outros códons (mutação compensatória), o que reduz seu efeito deletério (SUCUPIRA, 2007).

Segundo Wright (1982) e Kimura (1990) as mutações compensatórias mascaram o efeito deletério de outras mutações, ou quando ocorrem

independentemente são deletérias, porém quando combinadas são neutras. A resistência aos antirretrovirais é em problema econômico e clínico que está aumentando no decorrer do tempo. A resistência aos ARVs ocorre por mutações genômicas. Estas variações genéticas causam efeito deletério ao organismo quando afetam suas funções vitais ou conferem deficiências metabólicas. Isso resulta em diminuição do *fitness*, que em organismos patogênicos (no caso HIV) pode ser expresso em diminuição da replicação e virulência. Quando a pressão seletiva da droga é removida, os organismos com baixo *fitness* ficam em desvantagem comparados aos do tipo selvagem. Com isto, as mutações deletérias tendem a desaparecer da população. Alternativamente, pode ocorrer a reversão ao estado parenteral ou ser compensada por mutações adicionais. A compensação é de especial interesse ao organismo resistente, pois independentemente do custo desta adaptação genética, ele ainda pode manter a resistência, resultando na estabilização de organismos resistentes na população (SUCUPIRA, 2007).

O HIV apresenta acentuada variabilidade genética, que entre outros fatores, está associada à mutações. Como possui alta taxa de mutação e incorporação das mesmas, associada à alta taxa replicativa, pode-se dizer que no final de um dia haverão partículas virais com todas as mutações possíveis que serão selecionadas e fixadas dependendo da pressão seletiva que está ocorrendo.

Os principais antirretrovirais (ARVs) utilizados na terapia de pacientes HIV positivos estão divididos em três classes de drogas; inibidores de proteases (IP), inibidores de transcriptase reversa análogo nucleosídeo (ITRN) e inibidores de transcriptase reversa não análogo nucleosídeo (ITRNN). Essas drogas têm com alvo as enzimas protease (IPs) e transcriptase reversa (ITRN e ITRNN), que são codificadas pelo gene *pol* do HIV. As mutações do gene *pol* selecionadas por estas drogas podem conferir diminuição na susceptibilidade aos ARV, originando vírus resistentes. A resistência pode ser classificada como resistência primária (adquirida pela transmissão) e resistência secundária (selecionada por pressão seletiva do ARV).

Estudos sobre resistência primária aos ARVs são teoricamente mais adequados em amostras de indivíduos recém infectados pelo HIV – 1, pois se tem uma maior sensibilidade para detectar se houve infecção por variantes já resistentes. Amostras de indivíduos virgens de tratamento, porém com longo tempo de infecção, podem não apresentar as mutações de resistência, mesmo havendo transmissão de

variantes resistentes. A ausência da detecção das variantes virais com resistência aos ARVs ocorre em decorrência do menor *fitness* (espelhado pela capacidade replicativa) do vírus, que na ausência da pressão seletiva da droga ARV, tende a ser sobrepujado por vírus do tipo selvagem (MAMMANO et al., 1998; VERHOFSTEDÉ et al., 1999).

As mutações que conferem resistência aos antiretrovirais aparecem em etapas quando estas são selecionadas na vigência dos antiretrovirais. Assim, vírus com diversas intensidades de susceptibilidade e de capacidade replicativa durante a terapia, permanecerão arquivados ou replicando em baixo nível que poderão emergir na falha da mesma. Por outro lado, a resistência primária poderá ficar estabilizada num pequeno *pool* de vírus resistentes aos antirretrovirais.

A evolução para vírus susceptíveis aos antirretrovirais requer a seleção de variantes sensíveis às drogas que, *in vitro*, estão associadas a grande capacidade replicativa. O processo de reversão das mutações e seleção poderá requerer longo tempo, se a seleção imune imposta precocemente, durante a fase inicial da infecção, implicar em maior pressão seletiva à evolução do vírus. As mutações associadas à resistência podem decair rapidamente a níveis indetectáveis na população viral, porém algumas delas podem persistir mesmo na ausência da pressão da droga (MILLER et al., 1998; DEVEREUX et al., 1999; MILLER et al., 1999).

Com o passar dos anos após a infecção primária e sem tratamento ARV, a população majoritária circulante provavelmente não refletirá necessariamente o *pool* de vírus arquivados. Hipoteticamente, a presença de um vírus arquivado portador de mutação que confere resistência aos ARV, pode levar reemergência desta variante por ocasião da reexposição a esta droga (The Euro Guidelines Group for HIV resistance, 2001). A determinação da prevalência da resistência primária é de extrema importância no monitoramento da epidemiologia molecular do HIV – 1 e para dar mais suporte aos clínicos na escolha inicial da terapêutica numa dada região (DEEKS, 2001; LOVEDAY, 2001; MILLER, 2001; SORIANO et al., 2001).

Vários estudos descrevem a prevalência de HIV – 1 com resistência primária aos antirretrovirais em indivíduos recém infectados e virgens de tratamento. Na Suíça, foi observada uma variação entre cinco e 10% (YERLY et al., 1999; YERLY et al., 2001); na França a prevalência varia entre oito e 17%, (TAMALET et al., 2000; HARZIC et al., 2002); na Alemanha 13% (DUWE et al., 2001); na Inglaterra 14% (UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug

Resistance, 2001); na Espanha entre 23 a 26% (BRIONES et al., 2001) e nos EUA entre 15 e 29% (BODEN et al., 1999; BRENNER et al, 2000; MACHADO et al., 2002; GRANT et al., 2002) mostraram que nos que no estado da Califórnia (EUA) ocorreu um acréscimo na resintência aos inibidores de transcriptase resersa não nucleosídios em indivíduos recém infectados, e ainda é rara a presença de variantes resistentes às três classes de ARVs. Little et al., (2002) por sua vez, estudaram amostras de indivíduos recém infectados de várias cidades dos EUA e detectaram aumento de variantes resistentes aos ARVs ao longo do tempo, e recomendaram que o teste para deteccão de resistênci (genotípica ou fenotípica) aos ARVs antes do início do tratamento.

O Ministério da Saúde estabeleceu, em âmbito nacional, a rede de mapeamento da diversidade genética em indivíduos recém infectados virgens de tratamento, focalizando a tendência de subtipos viral e resistênci a drogas (Rede Brasileira de Vigilância de Resistênci às drogas). Num estudo inicial, foram realizadas análises genotípicas de todas as amostras obtidas em 2001 originadas de indivíduos com teste positivo em um dos 13 Centros de Testagem e Aconselhamento (CTAs). Das 535 amostras de plasma, identificadas como HIV – 1 positivas, a grande maioria veio de estados do sul e suldeste do país (Rio Grande do Sul, n= 139; Paraná, n= 147; São Paulo, n= 100). Oito amostras (2,2%) possuíam evidênci de resistênci primária aos inibidores de protease (IP), oito amostras (2,2%) aos inibidores de transcriptase reversa análogos nucleosídeo (ITRN) e sete amostras (2,1%) de resistênci aos inibidores de transcriptase reversa não análogos (ITRNN). Embora mutações primárias não sejam comuns, mutações acessórias associadas à resistênci às drogas foram comumente observadas, como por exemplo, no códon 10, a mutação L101 e/ ou F e/ou V foi observada em 24% das amostras da protease. Estas estimativas subestimaram a freqüência de transmissão recente visto que muitos poucos pacientes foram estudados durante os estágios precoces da infecção pelo HIV (apenas 20 das 350 amostras estavam no período de infecção recente, menos de seis meses, quando testados pelo algoritmo STARHS), (SUCUPIRA, 2007).

Um estudo concluído na Universidade Federal de São Paulo, com amostras de cinco CTAs de São Paulo, no período de junho de 2002 a março de 2003 foram identificadas 74 amostras com infecção recente pelo HIV através do algoritmo STARHS, 24 destas foram submetidas ao teste de resistênci genotípica

sendo que quatro (16,7%) amostras apresentaram vírus com resistência primária aos antirretrovirais (TESCAROLLO, 2004).

O grupo em questão caracterizou as regiões da protease e da transcriptase reversa do gene *pol* e a região V 3 do gene *env* de 100 amostras coletadas de indivíduos atendidos no Centro de Testagem e Aconselhamento de Santos. Foi encontrado uma prevalência extremamente alta de mutações primárias de resistência genotípicas (36%) incluindo vírus multi-resistentes às drogas. Acredita-se que esta alta prevalência em Santos está relacionada à alta prevalência de resistência as drogas na população cronicamente infectada. Notavelmente, outro estudo revelou que 50% dos indivíduos testados foram infectados com variantes de HIV – 1 recombinantes B/F, sugerindo que o HIV recombinante fixou-se com sucesso e está se expandindo nesta área (SUCUPIRA et al, 2007). Num estudo posterior, com estas amostras, foram detectadas duas novas formas recombinantes circulantes, CRF28 e CRF29, sendo as primeiras CRFs brasileiras descritas (SÁ-FILHO et al.,2006).

Mais recentemente alguns estudos têm mostrado a persistência das mutações primárias aos anti-retrovirais (BARBOUR et al., 2004; VIOLIN et al., 2004), porém a maioria destes com amostras do subtipo B. A persistência de resistência primária tem implicações significantes tanto no tratamento anti-retroviral como também na transmissão de variantes resistentes (LITTLE et al., 2004). Até o presente momento nenhum estudo foi publicado constatando a persistência da resistência primária em amostras brasileira, demonstrando uma epidemia diferenciada e regionalizada.

O subtipo do HIV – 1 predominante no Brasil é o B (~70%), mas diferente dos EUA, o Brasil possui um número considerável de infecções pelo subtipo F (~15%), subtipo C (~3%) além de formas recombinantes (~12%) (POOTS et al.,1993; LOUWAGIE et al., 1994; MORGADO et al., 1994; SABINO et al., 1996; BONGERTZ et al., 2000; SOARES et al., 2003), já em amostras de São Paulo, analisando-se o gene *pol*, foi detectada a prevalência de 87,9% do subtipo B, 3,7% do subtipo F e 8,4% de recombinantes B/F (SÁ-FILHO et al.,2005). Além disso, cerca de 50% das variantes do subtipo B circulante no Brasil, formam um agrupamento genético e antigênico distinto (HENDRY et al.,1996). Dados recentes indicam que a prevalência do subtipo C está aumentando na região sul do país,

podendo apresentar áreas onde a taxa de incidência pode chegar até 45% (BRINDEIRO et al., 1999; SOARES et al., 2003).

Respostas ao tratamento com terapias combinadas também podem variar conforme o subtipo. A eficiência catalítica da protease do HIV varia entre os subtipos e pode haver diferença na resposta aos inibidores de protease (VELAZQUEZ-CAMPOY et al., 2001). Há uma alta prevalência de mutações secundária (mutações acessórias) associadas a vírus de subtipos não B. Teoricamente, estes polimorfismos naturais dificultam a resposta, dos vírus do subtipo B, aos medicamentos (BRINDEIRO et al., 1999; PIENIAZEK et al., 2000; VERGNE et al., 2000). Pelo menos um estudo brasileiro baseado em corte transversal de indivíduos não tratados mostrou a presença de um polimorfismo natural em vírus do subtipo não B que pode impactar na resposta aos inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleosídeos (BRINDEIRO et al., 1999). Todavia, até hoje nenhuma investigação prospectiva a resposta de tratamento de indivíduos infectados por HIV – 1 do subtipo B *versus* subtipo não B foi realizada, na qual tenham sido estudados potenciais fatores confundidores, como estágio da doença e aderência às medicações.

Uma das preocupações na área de saúde pública é a transmissão de cepas de HIV resistentes que podem ameaçar a eficiência do primeiro tratamento. Nos países desenvolvidos, a prevalência do HIV que apresenta resistência a uma ou mais drogas antirretrovirais aumentaram nos últimos anos. Trabalhos recentes encontraram vírus resistentes em indivíduos recém infectados (Tabela 1)

Tabela 1 - Distribuição das taxas de cepas resistentes em diferentes países.

País	Porcentagem de cepas resistentes	Referência
Suíça	5 – 10	1,2
França	10 – 17	3,4
Alemanha	13	5
Inglaterra	14	6
Espanha	23 – 26	7
EUA	15 – 29	8,9

Contudo, quando estudamos pacientes ainda sem tratamento e infectados por longo período (>1 ano), uma menor taxa de cepas resistentes é encontrada. Esta taxa cai para 5% a 7% nos EUA (BRENNER et al 2000, WEINSCTOK et al 2000) e para 12% a 17% na Espanha (PUIG et al 2000, GOMES-CANO et al 1998), devido à reversão destas mutações ao longo do tempo.

As mutações associadas à resistência ao AZT e 3TC são mais encontradas nesses indivíduos. O padrão de resistência encontrada nos países desenvolvidos (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição da porcentagem de resistência às diferentes classes de drogas antirretrovirais em países desenvolvidos.

	Inibidores Nucleosídicos da TR	Inibidores não Nucleosídicos da TR	Inibidores de Protease
Taxa Encontrada	10 – 25%	15 – 20%	12 – 24%

Observação: TR - Transcriptase reversa.

Poucos estudos foram publicados relatando a prevalência de cepas de HIV resistentes aos ARV em pacientes que ainda não iniciaram tratamento nos países em desenvolvimento. Neste caso, ao contrário do que acontece nos EUA e Europa, a prevalência ainda é baixa (<5%, para as diferentes drogas) (BRINDEIRO et al 1999, TANURI, 1999a).

No sentido de avaliar a prevalência em Santos a circulação dos subtipos e cepas do HIV – 1 resistentes aos antirretrovirais, em indivíduos que ainda não iniciaram o tratamento, baseada na análise da seqüência genética do gene *pol*. O monitoramento destas cepas seguiu o exemplo da Rede de Vigilância de Resistência (REVIRE), no qual é constituída pelos laboratórios:

- a) Laboratório do Instituto de Biologia do Exército;
- b) Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz;
- c) Laboratório de Ácidos Nucléicos do Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ;
- d) Fundação Hemocentro de São Paulo;
- e) Laboratório de Retrovirologia da DIPA/EPM-UNIFESP;
- f) Laboratório de Retrovírus do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo;
- g) Laboratório de Virologia Molecular do Departamento de Genética da UFRJ;
- h) Laboratório LIM 56.

1.8 TESTES DE RESISTÊNCIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS

A resistência do HIV às drogas antirretrovirais representa, portanto, uma das mais preocupantes ameaças ao sucesso no controle da infecção pelo HIV obtido com a TARV. Esta ameaça tem forçado pesquisadores a desenvolverem diferentes estratégias. Uma destas é o desenvolvimento de métodos laboratoriais capazes de detectar a presença de resistência do HIV a uma determinada droga. Estes métodos são denominados de testes de resistência do HIV aos antirretrovirais (RICHMAN, 2000; HEILEK-SNYDER; BEAN, 2002; HIRSCH et al., 2003).

Existem duas classes de testes para avaliar a resistência aos anti-retrovirais: os testes para determinação de resistência genotípica e os testes para determinação de resistência fenotípica. A nomenclatura das classes de testes se incorporou à própria denominação de um padrão de resistência dito – resistência genotípica e resistência fenotípica. A resistência fenotípica representa o “comportamento” do vírus em meio de cultura na presença de anti-retrovirais, à semelhança do que ocorre com os testes de determinação de suscetibilidade para outros microrganismos. A resistência genotípica se refere às mutações no gene do HIV – através das quais poderíamos prever as mudanças no “comportamento” (fenótipo) do vírus frente aos antiretrovirais. O princípio óbvio subjacente é de que

toda alteração fenotípica é decorrente de uma alteração genotípica (RICHMAN, 2000; HIRSCH et al., 2003).

Os testes fenotípicos determinam a quantidade de droga necessária para inibir a replicação do HIV – 1 “in vitro”, sendo que as concentrações das drogas podem resultar em inibição de 50, 90 ou 95% (IC₅₀, IC₉₀ ou IC₉₅) (HEILEK-SNYDER; BEAN, 2002). Os testes genotípicos determinam a seqüência genotípica dos genes em questão. Dentre as abordagens hoje disponíveis para testes genotípicos temos a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) seletiva, PCR com hibridização com uso de sondas e o seqüenciamento genômico (RICHMAN, 2000).

De uma forma geral, as vantagens dos testes genotípicos, se comparados aos fenotípicos, consistem no fato de serem mais rápidos, menos trabalhosos e mais baratos. Contudo, o conhecimento limitado acerca das mutações que podem levar a uma diminuição da suscetibilidade às drogas e a pouca sensibilidade às cepas minoritárias representam evidentes desvantagens (RICHMAN, 2000; HEILEK-SNYDER; BEAN, 2002; HIRSCH et al., 2003). Por sua vez, a grande vantagem dos testes fenotípicos é a de fornecer o fenótipo do vírus de uma forma direta, ou seja, o que idealmente se espera é que obtenha o comportamento replicativo do vírus frente à droga que se está testando. Entretanto, estes testes são consideravelmente mais trabalhosos, lentos e caros do que os testes genotípicos (RICHMAN, 2000; HEILEK-SNYDER; BEAN, 2002; HIRSCH et al., 2003).

Um dos principais problemas a ser enfrentado atualmente pela CNDS/AIDS é a falta de resposta ao tratamento em alguns pacientes. Uma das principais causas de falência terapêutica é o surgimento de cepas resistentes aos Inibidores da transcriptase reversa (IRT) e da protease (IP). O processo de replicação do HIV – 1 promove alta taxa de mutação devido aos erros inerentes à atividade da transcriptase reversa. Portanto, é comum em indivíduos sob tratamento e com carga viral detectável, o surgimento e seleção de cepas resistentes.

1.9 REDE NACIONAL DE GENOTIPAGEM DO HIV

A emergência de variantes virais resistentes às drogas antirretrovirais representam uma das principais ameaças à manutenção da bem sucedida política

brasileira de prevenção e tratamento da infecção pelo HIV/Aids. No Brasil, entre os pacientes em uso de TARV, uma parcela significativa já apresentou falha ao primeiro tratamento e já faz uso de TARV de resgate. Além disso, o número de pessoas fazendo uso de TARV de resgate tem crescido. Um agravante deste cenário é que as drogas empregadas na TARV de resgate possuem, em geral regimes posológicos mais complexos e costumam ter custos mais elevados, principalmente as disponibilizadas mais recentemente para uso clínico, como tenofovir, efavirenz, lopinavir e enfuvirtida (Ministério da Saúde, 2006).

Em outubro de 2001, considerando o número cada vez maior de pacientes em TARV de resgate e visando a enfrentar o problema da resistência do HIV às drogas anti-retrovirais como fator relacionado à falha terapêutica, o Ministério da Saúde do Brasil criou a Rede Nacional de Genotipagem do HIV, também denominada RENAGENO. O princípio de acesso universal foi mantido, sendo que a indicação de realização do exame ficou condicionada a critérios técnicos bem definidos. Tal iniciativa foi pioneira no mundo. Nenhum país além do Brasil tem disponibilizado gratuitamente e de forma universal testes de resistência genotípica do HIV como método de auxílio ao acompanhamento de pacientes com aids apresentando falha à TARV. Este fato faz da experiência brasileira uma situação inédita.

A Rede Nacional de Genotipagem do HIV é constituída por uma rede de laboratórios de referência em genotipagem (LRG) e por médicos de referência em genotipagem (MRG). O MRG tem a função de avaliar as solicitações vindas das unidades assistenciais, deferindo ou não a solicitação de acordo com critérios técnicos estabelecidos pelo Comitê Assessor para Genotipagem do PN DST/Aids. Além disso, o MRG exerce papel de “expert”, interpretando o resultado do teste de genotipagem e emitindo laudo final com sugestões de tratamento de resgate. Os LRG, por sua vez, são laboratórios públicos equipados para realização de testes de resistência genotípica. O número inicial de MRG e LRG da Rede Nacional de Genotipagem do HIV em 2001 foi de 60 e 12, respectivamente. Atualmente, a Rede possui 14 LRG e mais de 100 MRG distribuídos por todas as regiões do país.

O Estado de São Paulo, que concentra cerca de 50% dos pacientes infectados pelo HIV em nosso país, foi um dos Estados pioneiros na implantação da Rede Nacional de Genotipagem do HIV. Na região nordeste do Estado, os primeiros

testes de resistência genotípica do HIV foram realizados a partir de dezembro de 2001.

Toda a estrutura criada para dar suporte à realização de testes de resistência genotípica do HIV na rede pública de atendimento de pacientes com aids no Brasil é complexa e tem representado um custo elevado. Como relatado acima, os estudos que demonstram algum benefício de testes de resistência genotípica do HIV foram ensaios clínicos controlados e envolveram pacientes de países desenvolvidos e vivendo em condições diferentes das existentes no Brasil e em outros países em desenvolvimento. Não existem estudos na literatura avaliando o uso de testes de resistência genotípica do HIV na rotina de serviços assistenciais e em condições reais de atendimento. A ausência de estudos neste cenário é óbvia pela não disponibilização de testes genotípicos na rotina em outros países, exeto no Brasil.

Questões como acessibilidade, utilidade, interpretação, eficácia em longo prazo e relação custo-benefício de testes de resistência genotípica do HIV no auxílio à terapia, por exemplo, de resgate em comparação com a estratégia convencional de resgate empírico necessitam de respostas. Questões ainda como a adesão dos profissionais aos critérios técnicos para realização de testes de resistência genotípica do HIV, o papel do MRG, além de outras, tudo isso em condições reais de atendimento, são pertinentes e necessitam de respostas baseadas em evidências científicas. Estudos avaliando estas e outras questões poderão oferecer importantes subsídios aos programas de prevenção e controle da infecção pelo HIV/Aids do Brasil e de outros países. Estes subsídios poderão contribuir para a tomada de decisões relacionadas a disponibilização de testes de resistência genotípica do HIV de forma rotineira no acompanhamento destes doentes.

2 OBJETIVOS

- a) Avaliar o perfil virológico e imunológico dos pacientes recém diagnosticados pelo HIV – 1 no período de 2000 e 2001, no CRAIDS em Santos;
- b) Determinar a resistência genotípica primária aos antiretrovirais nos pacientes diagnosticados pelo HIV – 1 no período de 2000 e 2001, no município de Santos;
- c) Determinar a prevalência de subtipos do HIV – 1 baseada nas análises das seqüências genéticas do gene *pol*;
- d) Avaliar posteriormente os fatores relacionados com a resposta ao tratamento aos ARVs, o perfil virológico e imunológico no período de 48 semanas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

O presente estudo foi realizado com os pacientes regularmente matriculados no Centro de Referência em Aids de Santos – CRAIDS, unidade de atendimento especializada (SAE) com nível de atenção secundária, pertencente à Secretaria Municipal de Saúde (SMS) da Prefeitura Municipal de Santos, com financiamento tri-partite (União / Estado / Município), inaugurado em 1989.

A Seção Centro de Referência em Aids de Santos – Secraids, destina-se a atender, pacientes soro-positivos encaminhados do Centro de Orientação e Treinamento Sorológicos – COAS (CTAs), hospitais, policlínicas, clínicas particulares de Santos e outros municípios da Baixada Santista. Funciona de segunda à sexta feira, das 7h às 17h.

O CRAIDS conta com equipe multiprofissional, composta de médicos, infectologista e ginecologista, psicólogos, odontólogos, enfermeiros, biólogos, farmacêutico e assistentes sociais. Possui atendimento ambulatorial, Programa de Internação Domiciliar – PID, Hospital Dia e Laboratório de Biologia Molecular.

A coleta de dados foi realizada com revisão dos prontuários de todos os pacientes do Centro de Referência em Aids de Santos – CRAIDS, observando os critérios de inclusão e exclusão. O laboratório que recebe as amostras pertencem à Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Santos, que possui convênio operacional com o Ministério da Saúde que fornece os “kits” para quantificação da subpopulação dos linfócitos TCD4+/TCD8+ e Carga Viral, que é monitorado pela Coordenação Nacional DST e AIDS da Rede de Laboratórios de Carga Viral e TCD4+ e TCD8+, onde também realiza o controle de qualidade dos exames realizados.

Foram analisados todos os prontuários dos pacientes recém diagnosticados e cadastrados no ano de 2000 e 2001 num total de 594 pacientes, sendo que neste período o serviço já possuía 4.147 pacientes cadastrados. Do total

dos pacientes estudados, apenas 315 realizaram o exame de carga viral e a contagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+ (Tabela página 30).

No momento de seu diagnóstico para o Vírus do HIV – 1, os pacientes foram submetidos a avaliação da viremia pelo exame de quantificação da carga viral, atreves da técnica NASBA (NUCLISENS) na amplificação baseada na seqüência de ácidos nucléicos desenvolvida pela Organon Teknika (USA). Quanto à avaliação do sistema imunológico pela contagem da subpopulação dos linfócitos TCD4+/TCD8+, utilizamos a citometria de fluxo utilizando aparelho Facs Count da empresa Becton Dickinson (USA). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Biologia molecular do CRAIDS, localizado em Santos, referencia do Programa Brasileiro da Rede Nacional de Laboratórios pela Coordenação Nacional DSTs e Aids, Ministério da Saúde.

Posteriormente do total de 315 pacientes foram selecionados 80 deles para a realização dos exames de genotipagem, os quais foram realizados parte no Laboratório de Biologia Molecular (Campus II) do Centro Universitário Lusíada (UNILUS), através do equipamento Seqüenciador modelo Abi Prism 3100 – Avant Genetic Analyser – System Profile, da Applied Biosystems (USA). O restante do trabalho, utilizando o mesmo modelo de equipamento, foi concluído no Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). De todos os pacientes foram obtidas amostras de plasma e mantidas congelados a – 80° C até serem submetidos as análises da genotipagem, subtipagem e os pacientes foram monitorados durante 48 semanas quanto a viremia e o perfil imunológico. Foram comparados os perfis demográficos do HIV entre os indivíduos com sucesso virológico *versus* falência virológica após 48 semanas de iniciação TARV.

Os pacientes estudados (N=80) eram virgens de tratamento aos ARVs e foram divididos em dois grupos. O Grupo 1 (N=43) representaram os pacientes que após a introdução do tratamento aos antiretrovirais não conseguiram atingir os níveis de quantificação de carga viral abaixo de 50 cópias/ml, isto é a carga viral se manteve detectável após seis meses de tratamento, e o Grupo 2 (N=37) representaram os pacientes que conseguiram se manter com os níveis de quantificação da carga viral, indetectáveis após seis meses de tratamento.

Todos os indivíduos que iniciaram HAART, entre 2000 e 2001, foram considerados aderentes aos antirretrovirais, de acordo com a frequência que

obtiveram as suas medicações prescritas pelo médico e a partir de uma farmácia centralizada.

O HIV - 1 foi seqüenciado na região *pol* a partir do plasma em amostras armazenadas a – 80° C, coletadas imediatamente antes do início do tratamento.

3.1.1 Pacientes matriculados no CRAIDS no período de 2000/2001

Pacientes matriculados em 2000 e 2001	594
Realizaram exames Carga Viral e CD4/CD8	315
Contagem de CD4 < 350 células/ μ l	167
Realizaram exame de Genotipagem	N=80 (<u>Grupo 1</u> N=43 e <u>Grupo 2</u> N=37)
Total de cadastrados até 2001	4.147
Em atendimento	3.200
Em uso de antiretroviral	2.028
Média mensal de início no uso de anti-retroviral	0.006
Pacientes novos matriculados por mês (média)	0.024
Total de pacientes que realizaram (CV e CD4)	315

3.1.2 Critério de Inclusão Inicial

No presente estudo foram analisados pacientes regularmente matriculados no Centro de Referência em Aids de Santos – Craids, e comprovadamente soropositivos com dois testes de Elisa reagentes e teste confirmatório de W. Blot reagente.

3.1.3 Critérios de inclusões posteriores

- a) Estar regularmente matriculado no CRAIDS e em atendimento ambulatorial;

- b) Ambos os sexos que foram diagnosticados pelo HIV – 1;
- c) Nunca ter feito uso de medicamentos antiretrovirais antes do diagnóstico pelo HIV – 1;
- d) Ter realizado exames de Carga Viral, no período de 48 semanas, para o acompanhamento da viremia;
- e) Ter realizado exames de contagem da subpopulações dos linfócitos TCD4+/CD8+, no período de 48 semanas, para o acompanhamento da evolução do sistema imunológico;
- f) Ter realizado no momento basal exames de CD4+/CD8+ em pacientes que obtiveram resultados < 350 células/ μ l, indicando tratamento antiretroviral.

3.1.4 Critérios de exclusões

- a) Ter feito uso de medicações antiretrovirais antes do diagnóstico pelo HIV – 1;
- b) Não ter realizado nenhum exame de quantificação da Carga Viral;
- c) Não ter realizado nenhum exame de contagem da subpopulação de linfócitos TCD4+/TCD8+.

3.1.5 Coleta de Amostras

Para as técnicas de genotipagem adotadas neste estudo, utilizamos o plasma separado a partir do sangue total. Foram coletados 5ml de sangue total em tubo esterilizado com anticoagulante EDTA (tubos Vacutainer™ PPT™ Brand, Becton-Dickinson #362788 ou equivalentes USA) e invertidos de 8 a 10 vezes imediatamente após a coleta entre 8 a 10 vezes, para homogeneizar.

3.1.5.1 Separação do Plasma

As amostras de sangue total foram centrifugadas durante 10 minutos, em temperatura ambiente em até 30 minutos após a coleta.

3.1.6 Transporte das Amostras

Todas as amostras obedeceram às legislações federais, estaduais e locais para transporte de materiais biológicos. Os plasmas foram transportados em caixas térmicas contendo gelo seco, mantendo uma temperatura de - 70° C. Quanto ao transporte do sangue total para realização dos exames de TCD4+/TCD8+ foram mantidos em temperatura ambiente.

3.1.7 Armazenamento das Amostras

Todos os plasmas do estudo para os exames de carga viral e genotipagem, foram armazenados em *Freezer* numa temperatura entre – 65 e – 80° C. Para não comprometer a qualidade da amostra, recomenda-se não descongelar o plasma por mais do que duas vezes. Quanto aos exames de contagem da subpopulação de linfócitos TCD4+/TCD8+, não houve armazenamento das amostras porque as análises foram realizadas no mesmo dia do recebimento.

3.2 TÉCNICAS PADRONIZADAS

3.2.1 Contagem de linfócitos TCD4+/TCD8+

O avanço das pesquisas tem levado ao desenvolvimento de tecnologias adequadas para avaliar laboratorialmente o curso da infecção. Principalmente portadores que ainda não apresentam sintomas da AIDS. Os linfócitos junto com outras células e moléculas, são essenciais na resposta imune do organismo humano (Manual de Treinamento do Ministério da Saúde, 1996).

A técnica de contagem das sub populações dos linfócitos TCD4+ e TCD8+, pelo método de Citometria de Fluxo, através do equipamento FACS COUNT da BECTON DICKINSON (USA).

Em condições fisiológicas, circundam no sangue periféricos três populações distintas de linfócitos:

- a) Linfócitos T: São responsáveis pela regulação da resposta imunológica pela destruição de células infectadas por vírus;
- b) Linfócitos B: Produzem os anticorpos;
- c) Células NK (natural Kiler): Atuam na destruição de células infectadas por vírus e de algumas células tumorais.

Diferenças celulares de superfície na população de linfócitos (Marcadores)

LinfócitoT	CD3
Linfócito T auxiliar	CD3 / CD4
Linfócito T citotóxico / supressor	CD3 / CD8
Linfócitos B	CD19 e / ou CD20
NK (natural killer)	CD16 e / ou CD56

O marcador CD3 é exclusivo da linhagem T. O CD4 está presente também nos monócitos e nos macrófagos e o CD8 nas células NK. Isso significa que a utilização isolada desses marcadores não permite a identificação dos linfócitos T.

Para identificar o auxiliar CD4 (helper), é preciso combinar a identificação do CD3 com o CD4 e, para identificar o T citotóxico, é preciso combinar a identificação do CD3 com o CD8.

Nomenclatura CD (cluster of differentiation)

A nomenclatura CD está baseada na relação desses marcadores com anticorpos monoclonais. Existe um anticorpo monoclonal especificamente produzido para cada um dos marcadores celulares de superfície; As investigações realizadas até o momento demonstram que os linfócitos T CD4 são as principais células-alvo do HIV (MANUAL DE TREINAMENTO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Fundamentos da Citometria de Fluxo

Atualmente, a técnica mais usada para a contagem de subpopulações de linfócitos celulares é a citometria de fluxo. A identificação e a classificação, por meio de citometria, são feitas com base nas seguintes características:

- a) Tamanho;
- b) Granularidade ou imunocomplexidade interna;
- c) Imunofenotipagem.

Variações no tamanho e na complexidade interna permitem a classificação dos linfócitos, ou células brancas do sangue, em linfócitos, monócitos e granulócitos. A imunofenotipagem consiste na identificação de populações de células pelos marcadores de superfície. São utilizados anticorpos monoclonais específicos ligados a compostos químicos fluorescentes.

Dependendo dos marcadores CD presentes na superfície da célula, a fluorescência será de cor diferente.

Fluorocromos excitados pelo laser

Fluoresceína (FITC);
Ficoeritrina (PE ou RD-1);
Tandem Cy5;
Texas Red PerCP;

As células marcadas com os anticorpos fluorescentes são introduzidas no citômetro de fluxo. Dentro do aparelho, as células são transportadas em um fluxo de líquido isotônico até uma câmara de fluxo (flow cell). Nesse compartimento, em feixe de laser incide sobre cada célula;

Ao incidir sobre a célula, ou seja, uma parte da luz é bloqueada frontalmente (FSC, forward scatter) e outra fração é dispersa lateralmente (SSC, side scatter). A fração FSC é proporcional ao tamanho da célula e a fração SSC é proporcional à granularidade celular.

A análise do tamanho e da granularidade (FCS x SSC) pode ser representada por um gráfico. Ao mesmo tempo, os feixes do laser estão incidindo sobre compostos fluorescentes ligados à superfície das células. Esses compostos, com a ação do laser, emitem sinais fluorescentes detectados por tubos fotomultiplicadores, que convertem a luz em sinais eletrônicos (MANUAL DE TREINAMENTO DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996).

Os sinais eletrônicos são usados para analisar as células de acordo com os marcadores de superfície indicando as que reagiram.

Citometria de Fluxo pelo FACSCOUNT

O sistema FACSCount fornece o número absoluto de linfócitos T auxiliares (CD3/ CD4) e de linfócitos T supressores/citotóxico (CD3/CD8) a partir da medida de quatro parâmetros:

- a) FSC (forward scatter);
- b) SSC (side scatter);
- c) FL1 (fluorescência 1);
- d) FL2 (fluorescência 2) ;

Nesta técnica foi possível contar o número absoluto de linfócitos porque, em cada tubo de amostra, existe um número conhecido de partículas de referência (reference beads) conjugadas com substâncias fluorescentes. Essas partículas atuam como um padrão para a quantificação das células. O aparelho lê a fluorescência tanto das partículas de referência quanto das células, conhecendo a quantidade, ele pode calcular o número de células (Manual de Treinamento do Ministério da Saúde, 1996).

3.2.2 Quantificação da Carga Viral do HIV – 1

Exame quantitativo de Carga Viral (CV) do HIV no plasma, foi realizado através da técnica NASBA (NUCLISENS) amplificação baseada na seqüência de ácidos nucléicos desenvolvida pela Organon Teknika, realizada em quatro etapas: liberação dos ácidos nucléicos, isolamento, amplificação e detecção do Rna do vírus HIV, utilizando primers, enzimas e sondas específicas.

A amplificação de ácidos nucléicos são baseados em seqüência e o ensaio mimetiza o ciclo de replicação do RNA viral através da intermediação de um cDNA, o alvo é o RNA viral. A reação começa com a adição de amostra a um tampão de lise que tem como função inativar as partículas virais, garantir a integridade da amostra, e estabilizar a amostra através da solubilização de proteínas, evitando a degradação do RNA viral. O tampão de lise permite a remessa segura de amostras. Três calibradores QA, QB e QC são adicionados em quantidades conhecidas ao tampão de lise, junto com a amostra, os calibradores QA, QB e QC, são moléculas de RNA sintéticas, com sítios de ligação de primer e de hibridação da sonda magnética idênticos aos da molécula de HIV alvo (selvagem ou WT de Wild Type) e uma seqüência de ligação de sondas específica, distinta para cada um dos calibradores. Eles são adicionados à amostra e ao tampão de lise numa quantidade conhecida para monitorar a eficiência da preparação e amplificação da amostra (MANUAL DE TREINAMENTO-NASBA, 1996).

A extração é feita pela técnica com sílica-guanidina, que é uma tecnologia de extração com fase sólida, onde a sílica funciona como o carreador dos ácidos

nucléicos. O resultado desta extração é um ácido nucléico altamente purificado livre de fatores inibitórios (MANUAL DE TREINAMENTO-NASBA, 1996, p.1).

A amplificação é realizada toda a 41°C (isotérmica). Três RNAs sintéticos são adicionados em quantidades conhecidas a cada amostra e servem como controles INTERNOS de cada amostra individualmente. Da reação de amplificação resulta um acúmulo de cDNA do RNA viral numa quantidade maior que 10⁹ cópias num tempo de 90 minutos. O produto amplificado é então hibridizado ao mesmo tempo com sondas marcadas com rutênio, específicas para o RNA viral e cada calibrador e uma sonda magnética genérica. Neste ponto o produto amplificado é dividido em quatro tubos diferentes e depois de cada um dos tubos ser lido no leitor de eletroquimioluminescência o computador gera uma curva padrão individual, a partir dos calibradores e um resultado de quantificação no caso de uma amostra ser invalidada por algum motivo, o outro resultado obtido no ensaio continuam válidos, (MANUAL DE TREINAMENTO NASBA, 1996, p. 1).

3.2.3 Genotipagem do HIV – 1 (ViroSeq™)

A metodologia do Sistema de Genotipagem de HIV – 1 ViroSeq™ (Abbott Diagnostics) é baseado em seis processos principais:

- a) Preparação de Amostras;
- b) Transcrição Reversa (RT);
- c) Reação de Cadeia Polimerase (PCR);
- d) Seqüenciamento por Ciclos;
- e) Detecção Automática de Seqüências;
- f) Análise do Software.

3.2.3.1 Preparação de Amostras

O sistema de preparação de amostras do ViroSeq™ HIV 1 é destinado a isolar o RNA viral do HIV – 1 de 0,5 mL de plasma humano com EDTA. A amostra de plasma é primeiro centrifugada a 4° C para concentrar as partículas virais do HIV – 1 em um pellet no fundo do tubo. Após remoção do sobrenadante, as partículas do vírus no pellet são rompidas em suas partes constituintes pelo Tampão de Lise Viral.

O RNA viral é precipitado com isopropanol, então pelitizado e depois purificado com uma lavagem com etanol a 70%. Finalmente, o RNA viral purificado é seco e ressuspenso em diluente de RNA. Através deste procedimento, o sistema ViroSeq é capaz de detectar e genotipar amostras de HIV – 1 com cargas virais que variam de 2.000 a 750.000 cópias por mL.

3.2.3.2 Transcrição Reversa

O ViroSeq™ amplifica uma região de 1,8 kb do gene *pol* do HIV – 1, que engloba o gene inteiro da protease e aproximadamente dois terços do gene da transcriptase reversa (RT). Após a preparação da amostra, 10 µL do RNA ressuspenso é transferido para tubos MicroAmp de 0,2 ml e aquecido a 65° C para relaxar a estrutura secundária do RNA. A seguir, 10 µL de uma mistura de reação contendo transcriptase reversa do Vírus da Leucemia Murina Moloney (MuLV), um primer simples, ditioneitol (DTT), inibidor de RNase e desoxinucleotídeo trifosfatos (dNTPs) é adicionadas aos tubos de amostras MicroAmp.

As reações acontecem então dentro de um termociclador da Applied Biosystems (sistema GeneAmp PCR 9600 ou 9700) e incubadas por 1 hora para gerar DNA complementar de fita simples (cDNA).

A primeira condição de temperatura (65° C por 30 segundos) rompe qualquer estrutura secundária de RNA. A segunda condição de temperatura na reação de RT é 42° C por 60 minutos, a qual permite a ligação de primer e a extensão da cepa cDNA nascente. As moléculas de RNA do HIV – 1 de fita simples presentes na amostras são convertidas em híbridos RNA-cDNA de fita dupla durante

o processo. As amostras são então aquecidas a 99° C por 5 minutos para inativar a enzima da transcriptase reversa.

Finalmente, as amostras são esfriadas a 4° por 10 minutos. Esta temperatura garante que não haverá degradação da amostra antes da próxima etapa.

3.2.3.3 Reação da Cadeia Polimerase

Em seguida à transcrição reversa do RNA viral alvo, 30 µL de uma mistura de reação contendo AmpliTaq Gold DNA polimerase, primers dianteiros e reversos, dNTPs e AmpErase UNG é adicionada aos tubos de amostra contendo o cDNA. As amostras são então transferidas para um termociclador (9600 ou 9700) na área de trabalho do DNA, amplificadas e analisadas sob um conjunto específico de variações de temperaturas e condições por 4,5 horas.

A primeira etapa na reação PCR é um ciclo simples a 50° C por 10 minutos. Nesta etapa, a enzima UNG controla a contaminação, destruindo quaisquer espécies de DNA contendo desoxiuridina. A Mistura PCR ViroSeq contém desoxiuridina trifosfato (dUTP), a qual é incorporada no DNA amplificado durante o processo de PCR. Qualquer arraste acidental do material anteriormente amplificado contendo desoxiuridina é destruído pela UNG, enquanto o cDNA amostra que não contém desoxiuridina permanece intacto.

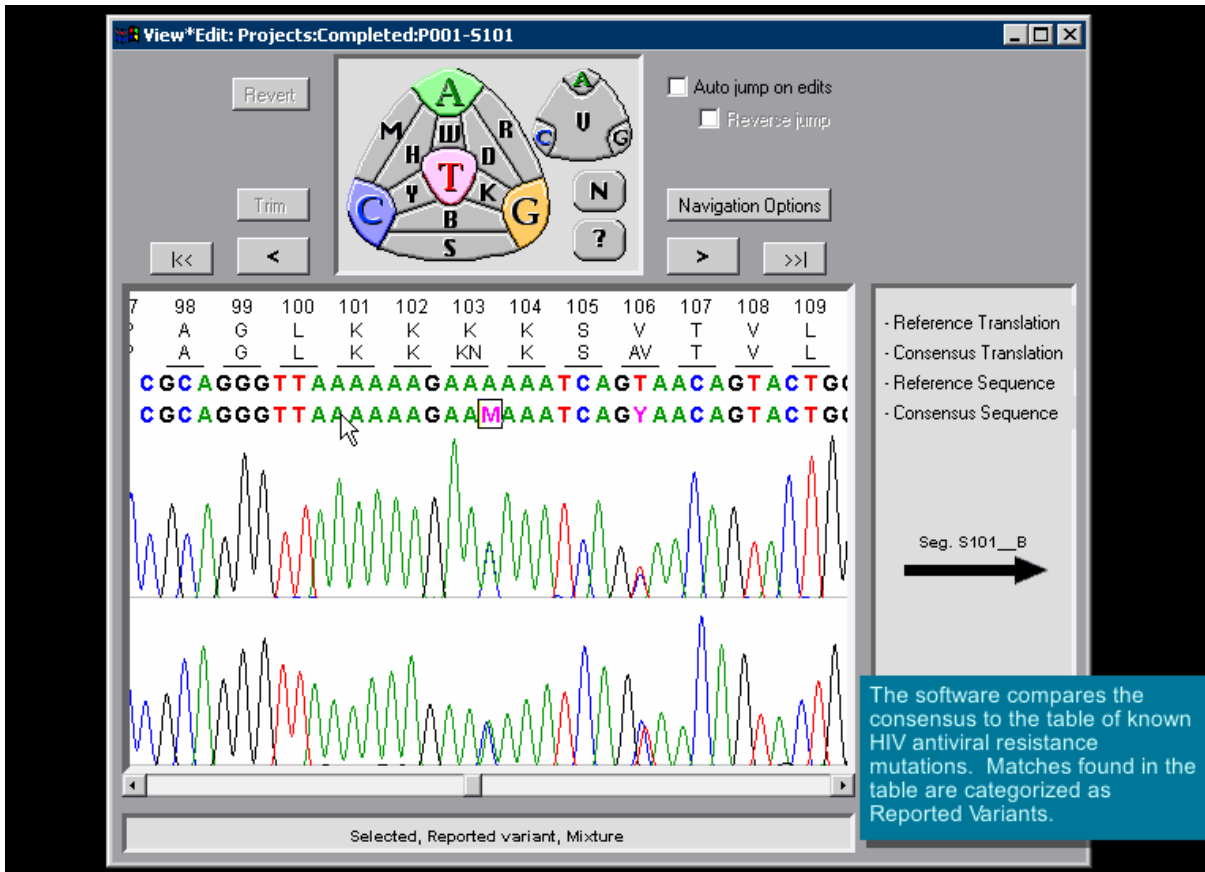
Após o controle da contaminação, a amostra é aquecida a 93° C por 12 minutos para avaliar a AmpErase UNG, ativar a AmpliTaq Gold DNA polimerase, e desnaturar os híbridos RNA-cDNA em fita simples. Em seguida, há três etapas repetidas por 40 ciclos para a etapa da PCR. Estas etapas são 93° C por 20 segundos para desnaturar o DNA em fitas simples, 64° C por 45 segundos para anelar o primer e 66° C por 3 minutos para estender o primer para criar DNA de fita dupla. Durante este processo, em fragmento de 1,8 Kb do gene *pol* do HIV – 1 é amplificado. As moléculas de DNA amplificadas, também chamadas de amplicon, são então aquecidas a 72° C por 10 minutos para permitir a extensão final, seguida pelo resfriamento a 4° C, onde ficam prontas para o próximo procedimento.

3.2.3.4 Reação de Seqüenciamento

As polimerases do DNA copiam moldes de DNA de fita simples através da adição de nucleotídeos a uma cadeia de crescimento, também conhecida como o produto de extensão. A extensão da cadeia acontece na ponta 3' de um primer que foi anelado ao seu molde complementar. O dNTP que é adicionado ao produto de extensão em crescimento é selecionado por pares de bases combinados com o molde. A cadeia é estendida para a formação de uma ponte fosfodiéster entre o grupo 3' – hidroxila na ponta de crescimento do primer e o grupo 5' – fosfato do desoxinucleotídeo de entrada. O crescimento é portanto na direção 5' para 3'.

As polimerases do DNA também podem incorporar análogos de bases de nucleotídeos. O método dideoxi de seqüenciamento de DNA desenvolvido por Sanger e cols. usa esta característica, utilizando 2', 3' – dideoxinucleotídeo (ddNTPs) com substratos. Porém os ddNTPs causam a determinação da cadeia quando são incorporados na ponta 3', porque são carentes de um grupo 3' – hidroxila. Portanto, a cadeia termina seletivamente nas posições A, C, G, ou T (Guia Químico de Seqüenciamento Automático de DNA, Applied Biosystems, PN 4305080).

Na estratégia da técnica em questão Applied Biosystems para seqüenciamento fluorescente automático, são incorporados marcadores fluorescente na extensão do DNA usando ddNTPs terminadores marcados com corante. Com a marcação do terminador, cada um dos quatro ddNTPs é tingido com um corante fluorescente diferente. A cadeia crescente é terminada e marcada simultaneamente quando um ddNTP é incorporado. Este processo cria uma marcação de seqüência de DNA tal que cada produto extensão é uma base maior do que a seguinte, conforme mostrado no diagrama abaixo. Os terminadores são marcados de modo que A = verde, C = Azul, G = Amarelo e T = vermelho.



Fonte: Manual de treinamento, (Guia Químico de Seqüenciamento Automático de DNA, Applied Biosystems, PN 4305080), 2004.

Figura 4 - Software para edição do Sistema de Genotipagem de HIV – 1 ViroSeq™ Applied Biosystems.

O processo de seqüenciamento por ciclos do ViroSeq™ HIV – 1 Genotyping System, tem quatro etapas:

- a) Purificação da PCR;
- b) Quantificação do DNA;
- c) Reação de Seqüenciamento;
- d) Purificação da Reação de Seqüenciamento.

3.2.3.4.1 Purificação da PCR

Após a PCR, as amostras são purificadas para remover dNTPs e primers não incorporados através da utilização de microconcentradores YM-100 com o kit

ViroSeq. As etapas de purificação, utilizam membrana de ultrafiltração, que permite a passagem dos dNTPs e primers menores pelo filtro enquanto os fragmentos maiores do DNA alvo permanecem na superfície do filtro.

3.2.3.4.2 Quantificação do DNA

Uma porção de 5µL do produto PCR purificado é misturada com quantidade igual de Tampão Carreador em Gel de Agarose, e carregada dentro de um gel de agarose a 1% contendo Brometo de etídio. Duas alíquotas do Marcador de Massa Molecular do DNA também são carregadas depois da amostra. O gel passa por eletroforese por aproximadamente 1 hora, então é removido e exposto à luz ultravioleta. Como o brometo de etídio causa a fluorescência do DNA, a amostra de DNA pode ser visualizada quando comparada contra concentrações conhecidas de fragmentos de diferentes tamanhos no Marcador de Massa Molecular do DNA.

Desta comparação, é atribuída uma concentração semi-quantitativa de DNA para cada amostra e o produto de PCR remanescente é diluído adequadamente a uma concentração atimizada para a reação de Seqüenciamento por Ciclos.

3.2.3.4.3 Reação de Seqüenciamento

O ViroSeq™ HIV – 1 Genotyping System de Genotipagem de HIV – 1 ViroSeq™ utiliza sete primers (quatro dianteiros e três reversos) para seqüenciar a região inteira do gene da protease do HIV – 1 (códon 1 a 99) e dois terços do gene da RT(códon 1 a 335). O terminador BigDye^R utilizado no sistema ViroSeq permite uma resolução de 600 bases no Analisador Genético 3100. Portanto, devem ser utilizados múltiplos primers para completar o seqüenciamento de um fragmento de DNA de 1,3 Kb.

Doze microlitos de cada uma das misturas de seqüenciamento dos sete primers ViroSeq são combinadas com 8 µL de amostra purificada e diluída em uma

placa com 96 poços ou tubos MicroAmp^R. As misturas de reação são incubadas em um termociclador por aproximadamente 2 horas e meia. Há três etapas repetidas para 25 ciclos: 96^oC por 10 segundos para desnaturar o DNA, 50^oC por 5 segundos para anelar os primers e 60^oC por 4 minutos para estender os primers. No final, as amostras são resfriadas a uma temperatura de 4^oC e são mantidas até a próxima etapa.

3.2.3.4.4 Purificação da Reação de Seqüenciamento

É necessário remover os terminadores BigDye^R não incorporados das amostras, de modo que os mesmos não interfiram com o seqüenciamento e análise das amostras. O sistema de Genotipagem de HIV – 1 ViroSeqTM oferece três opções para purificar reações de seqüenciamento:

- a) Precipitação com Isopropanol é uma solução simples e de baixo custo para a purificação;
- b) Precipitação com Etanol/acetato de sódio é recomendado como um método de purificação de baixo custo;
- c) CENTRI-SEP96 placas com colunas para centrífuga são recomendadas se os fatores tempo e facilidade de uso forem mais importantes do que o custo, sendo simples e rápido.

3.2.3.5 Detecção Automática de Seqüências

Os seqüenciadores automáticos de DNA ABI PRISM^R da Applied Biosystems detectam fluorescência de quatro terminadores marcados A,C,G e T. Cada corante emite luz a um diferente comprimento de onda, quando excitado por um laser de íon de argônio. Todas as quatro cores, e portanto todas as quatro bases, são detectadas e distintas em um capilar simples.

As reações de seqüenciamento purificadas do kit ViroSep são ressuspensas em formamida HiDi™, quando é utilizado um Analizador Genético 3100. Todas as amostras são desnaturadas por aquecimento em um termociclador a 95°C por 2 minutos, então resfriadas no gelo. As amostras são então injetadas por eletrocínética dentro dos capilares do 3100.

O seqüenciamento envolve a criação de um fluxo elétrico de íons do negativo para o positivo através de um meio polímero POP-6™. Os marcadores de DNA carregados negativamente, criados durante as reações de seqüenciamento migram através deste campo, com os fragmentos menores migrando mais rápido do que os maiores. À medida que cada fragmento passa pela região de leitura do laser, ele é excitado por um laser de íon de argônio. A fluorescência é detectada por uma câmara CCD e convertida a uma seqüência de registros de base (basecalls) pelo Software para Análise de Seqüenciamento de DNA ABI PRISM®.

Os arquivos resultantes contêm informações de seqüência para cada um dos sete primers em cada amostra. Após a conclusão do ensaio de seqüenciamento, os dados desses arquivos são automaticamente analisados pelo uso do Software para Análise de Seqüenciamento, em preparação para análise que será feita pelo ViroSeq^R HIV – 1 Genotyping System Software.

3.2.3.6 Análise do Software ViroSeq

O Software do Sistema de Genotipagem de HIV – 1 ViroSeq™ pega os dados de seqüência dos sete primers para cada amostra e combina as informações em um projeto único. Durante a montagem das seqüências dos primers, é criada uma seqüência consenso que se estende pelo gene da protease inteiro até o códon 335 do gene da RT. Esta seqüência consenso é comparada a uma cepa de referência conhecida, do gene HXB-2, para identificar pontos de variação. O usuário confirma manualmente ou modifica os pontos variantes, para assegurar basecalls corretos. Dependendo da qualidade dos dados da seqüência, a edição manual de um projeto de amostra leva de 5 a 15 minutos para ser completado.

O Software do Sistema de Genotipagem de HIV – 1 ViroSeq™ oferece três opções para relatar os resultados de um projeto:

- a) Uma seqüência FASTA de texto simples, contendo somente a seqüência consenso;
- b) Um relatório de mutação com texto simples, contendo uma lista de mutações encontradas e categorizadas como conhecidas (sobrepõe mutações de resistência reconhecidas), desconhecidas ou inserção;
- c) Um Relatório de Resistência á Drogas Anti-retrovirais, indicando se as mutações detectadas pelo ensaio constituem evidência genética de resistência viral. Esta interpretação é baseada num algoritmo patenteado que determina o impacto relativo das mutações nos quadros de leituras abertas de protease e RT no desenvolvimento de resistência a drogas anti-retrovirais.

3.2.4 Genotipagem do HIV – 1 *in house* (Reação de Cadeia Polimerase)

3.2.4.1 *Extração de RNA do plasma*

O genoma do HIV pode ser encontrado nos indivíduos infectados na sua forma de RNA, quando o virion está circulando no sangue, ou na forma de DNA quando o material genético viral está inserido no genoma da célula hospedeira, chamado de provírus.

Uma forma simples de extração de RNA viral pode ser feita coletando-se uma amostra de sangue do indivíduo infectado em um tubo com anticoagulante. Após a coleta podemos separar as fases do sangue total em plasma, onde estarão os virions; fase das células brancas, onde estarão às células T CD4+ com o provírus e a fase das hemácias.

Existem reagentes comercializados que garantem um maior grau de pureza do RNA extraído. Estes Kits contém uma coluna de purificação que retém o RNA extraído do plasma e permitem lavagens sucessivas deste material com uma

solução que contenha etanol. No final do procedimento o RNA é liberado do filtro da coluna, por diferença de concentração, sendo coletado em água pura. Este RNA com alto grau de pureza pode ser utilizado nas diferentes técnicas de biologia molecular.

A extração do RNA das amostras de plasma foi realizada por meio do QIamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany). De acordo com as instruções do fabricante, na extração do RNA dos pacientes utilizamos 200µL de plasma. Em seguida, 560µL de tampão de lise (AVL) foram adicionados à amostra. A solução foi incubada por 10 minutos a 25° C. Posteriormente, foram adicionados 560µL de etanol absoluto, homogeneizado, centrifugado e transferidos 630µL da mistura para uma coluna, no qual foram centrifugados por 1 minuto a 8.000 rpm. Repetimos esse processo final por mais uma vez. Adicionamos à coluna 500µL do tampão de lavagem AW1, e centrifugamos por 1 minuto a 8.000 rpm. Posteriormente, transferimos a coluna para um novo tubo coletor. Adicionamos 500µL do tampão de lavagem AW2 e centrifugados por 3 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, a coluna foi transferida para um novo tubo de microcentrifuga e adicionados 40µL de tampão AVE (Tampão de eluição) deixando em repouso em temperatura ambiente por 5 minutos. Finalizando a etapa de extração, após a centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm, descartamos a coluna e armazenamos o microtubo com RNA extraído em refrigeração numa temperatura de - 70° C.

3.2.4.2 Reação de Transcrição Reversa (RT-PCR)

O RNA total extraído foi retrotranscrito em DNA complementar (cDNA) utilizando-se os reagentes comercialmente disponíveis (*SuperScript III Reverse Transcriptase*, Invitrogen, USA) de acordo com as especificações do fabricante. Para isso, preparamos duas soluções. A primeira solução contendo 1µL de iniciador randômico a 150ng/µL (*Randon Primers*, Invitrogen, USA), 1 µL da solução de dNTPs a 10mM, 6µL de H₂O deionizada, 5µL de RNA foi distribuída em microtubos previamente identificados. Incubamos esses microtubos a 65°C por cinco minutos para denaturação do RNA. Preparamos a segunda solução com 4µL de tampão 5X

(*First Strand Buffer*), 1 μ L de DTT 0,1M, 1 μ L de inibidor de ribonuclease recombinante 40U/ μ L (*RNase Out*, Invitrogen, USA) e 1 μ L da enzima transcriptase reversa (*Super Script III Reverse Transcriptase*, Invitrogen, USA) 200U/ μ L. Adicionamos essa solução ao microtubo contendo a primeira solução e incubamos a 25°C por cinco minutos, 50°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

3.2.4.3 Amplificação de ácidos nucléicos: NESTED – PCR para região pol Protese e Transcriptase Reversa do HIV – 1

Após a etapa de transcrição reversa o cDNA gerado foi usado como molde numa reação de amplificação em duas etapas constituída por 0,5 U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, EUA), 4 mM de dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 1 x buffer 10 x (Invitrogen, EUA) 0,4 μ M de cada dos seguintes *primers* (Tabela 3).

Tabela 3 - *Primers* utilizados na reação de Nested-PCR.

<i>Primers</i>	Orientação	Posição (HXB2)	Seqüência
Pol-1	Foward externo	1839 – 1863	5'- ggg agt ggg ggg acc cgg cca taa - 3'
INBO-1R	Reverse externo	3534 – 3558	5'- catt tgg cctt tgc ccc tgc ttc tggt - 3'
Kozal – 1 (K1)	Foward interno	2147 – 2166	5'- cag agc caa cag ccc cac ca - 3'
Kozal – 2 (K2)	Reverse interno	3338 – 3309	5'- ttt ccc cac taa ctt ctg tat gtc ctt gac a - 3'

Na primeira etapa, 5 μ L do cDNA foram adicionados à solução acima completando um volume final de 50 μ L. A reação foi incubada em um termociclador 9700 (Perkin-Elmer, EUA) e aquecida por 7 minutos a 94°C. Após o aquecimento seguiram-se 35 ciclos consistindo de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Ao término dos 35 ciclos foi implementada uma etapa de extensão final de 72°C por 7 minutos. Na segunda etapa, mantendo-se as mesmas condições descritas acima, 5 μ L do produto amplificado na primeira reação foram transferidos para microtubos com uma

solução idêntica à primeira mas, adicionando-se desta vez 0,4 μM de cada um dos *primers* internos Kozal-1 e Kozal-2.

3.2.4.4 Purificação de Produto da PCR

Os produtos da PCR em duas etapas foram purificados por meio do *Charge Switch PCR Clean-Up kit* (Invitrogen, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Esse método purifica o produto de PCR removendo o excesso de sais, *primers*, dNTPs e outros reagentes por meio de partículas magnéticas de carga positiva que se ligam ao ácido nucléico negativamente carregado. Proteínas, reagentes e outros contaminantes são eliminados nas lavagens. A carga dessas partículas é neutralizada pelo tampão de eluição (pH 8,5) em que o ácido nucléico é eluído.

Resumidamente, a cada microtubo de amostra (contendo 50 μL do produto da PCR) foram acrescentados 50 μL de tampão de purificação (N5), 10 μL de *Charge Switch Magnetic Beads* (25 mg/mL). A solução foi incubada a temperatura ambiente por 1 minuto. Os tubos foram colocados em estante magnética (Magna Rack, Invitrogen, EUA) e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, os tubos foram retirados da estante magnética e foi acrescentado 150 μL do tampão de lavagem. As amostras foram incubadas novamente na estante magnética nas mesmas condições acima. O sobrenadante foi descartado e a lavagem foi repetida. Os tubos foram removidos da estante magnética e 50 μL de tampão de eluição foram acrescentados. Depois de homogeneizada, a solução foi incubada na estante magnética. O sobrenadante contendo o produto purificado foi depositado em novo microtubo de 1,5 mL previamente identificado e armazenado a -20°C .

O produto da PCR purificado foi observado em corrida eletroforética em gel de agarose a 1 %. As bandas do produto purificado foram comparadas ao padrão de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, EUA) para definir a massa molecular dos clones a serem seqüenciados.

3.2.4.5 Sequenciamento da Região *pol* do HIV-1

As amostras foram amplificadas e, posteriormente, seqüenciadas utilizando-se o *Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A reação consistiu no seqüenciamento das regiões codificadoras das proteínas protease e transcriptase reversa da região *pol* de HIV-1, alvos principais da ação das drogas anti-retrovirais. Como o fragmento a ser seqüenciado era muito extenso (aproximadamente 1070 pb) e o limiar ótimo de detecção da eletroforese capilar pelo analisador genético é de 500-650 pb, as seqüências foram obtidas utilizando-se um conjunto de cinco *primers* (Tabela 4) que geram seqüências que se sobrepõem.

Tabela 4 - Primers utilizados no sequenciamento de um fragmento do gene *pol* do HIV-1.

Primers	Orientação	Posição (HXB2)	Seqüência
Kozal – 1 (K1)	Foward	2147 – 2166	5'- cag agc caa cag ccc cac ca - 3'
Frenkel-2 (F2)	Reverse	3321 - 3301	5'- gta tgt cat tga cag tcc agc - 3'
DP-11	Reverse	2598 – 2572	5' - cca ttc ctg gct tta att tta ctg gta -3'
Kozal – 2 (K2)	Reverse	3338 – 3309	5'- ttt ccc cac taa ctt ctg tat gtc ctt gac a – 3'
RTINT	Reverse	3018 – 3042	5'- cca gca ata ttc caa agt agc agt a - 3'

Cada reação de seqüenciamento foi composta 6 µL de produto de PCR purificado (diluído ou não em água DEPC) e 13 µL de uma mistura preparada para cada *primer*, contendo também tampão de seqüenciamento, dNTPs, ddNTPs, enzima polimerase (AmpliTaq DNA polimerase), MgCl₂. A placa preparada foi ciclada num termociclador 9700 (*Applied Biosystems, EUA*), em 25 ciclos de 10 segundos a 96° C, 5 segundos a 50° C e 4 minutos a 60° C.

Posteriormente, o produto da reação de seqüenciamento foi purificado, numa reação que consiste na precipitação com etanol 70 % e denaturação das fitas do DNA a 94° C, após aplicação de formamida Hidi (Invitrogen, EUA).

3.2.4.6 Detecção dos Fragmentos Seqüenciados

Após a reação de seqüenciamento, as amostras foram submetidas à separação eletroforética capilar em um seqüenciador automático de DNA modelo ABI 3100 (Applied Biosystems, EUA), em gel de poliacrilamida Rapid Gel XL 6 % cartridge (Amersham Pharmacia, EUA), em TBE 1 X durante 30 minutos, a 54° C e 1300 volts, com o laser na potência de 25 %.

3.2.4.7 Análise, Compilação e Alinhamento das Sequências

Os dados foram coletados com o *ABI PRISM DNA Sequencing Analysis Software* e a edição e análise prévia das seqüências foi realizada no *Sequencher Analysis Software, Version 4.5* (Gene Codes Corporation, EUA). Todos os resultados foram submetidos para análise de resistência, aos antiretrovirais e a determinação dos subtipos do HIV – 1 (<http://hiv-web.lanl.gov>).

As seqüências de nucleotídeos obtidas foram visualizadas por meio do alinhamento no programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1997; Chenna *et al.*, 2003; Larkin *et al.*, 2007). As seqüências contendo inserções, deleções (*indels*), códons indeterminados e/ou códons de terminação foram ajustadas manualmente no Se-AL (Sandelin, 2005). Nos anexos A e B essas seqüências podem ser visualizadas.

3.2.4.7.1 Inferência Filogenética

O método de construção das árvores filogenéticas foi realizado por máxima verossimilhança, que usa matrizes de probabilidade de mudança entre nucleotídeos que explicitam modelos evolutivos para a inferência dos estados ancestrais dos caracteres, a partir dos estados observados nos táxons apicais. As reconstruções ótimas maximizam a verossimilhança para todos os caracteres ao longo de uma topologia. As matrizes de probabilidade de substituições foram

escolhidas de acordo com o modelo evolutivo indicado pelo teste de razão de verossimilhança LRT (*Likelihood Ratio Test*).

As estimativas dos parâmetros e de verossimilhança para 56 modelos aninhados foram feitas com o programa PAUP (Swofford, 2002). O teste LRT foi executado pelo programa Modeltest versão 3.06b (Posada & Crandall, 1998; Posada, 2003; Posada, 2006). A heterogeneidade das taxas de substituição entre os sítios é incorporada através da distribuição gama. Da mesma forma, os valores das matrizes de transição e a frequência de bases também foram estimados de forma interativa durante o processo de reconstrução. A reconstrução filogenética foi feita em três etapas:

- a) Escolha do modelo de evolução de nucleotídeos e obtenção de uma árvore inicial pelo método de distâncias de agrupamento de vizinhos (*neighbor-joining*);
- b) A seguir, os parâmetros da matriz foram ajustados e usados para a obtenção de uma árvore por *Maximum Likelihood*;
- c) Por fim, foram feitos rearranjos (perturbações) na árvore através do método de busca heurística com o algoritmo *Stepwise Addition* e o método *Nearest Neighbor Interchange* (NNI) de rearranjo das árvores. As árvores com maior verossimilhança que a inicial foram escolhidas.

Esse método de reconstrução filogenética é bastante apropriado para ajuste de comprimentos de ramos, visto que em cada uma das três etapas é feito um refinamento dos parâmetros da matriz de transição (modelo escolhido pelo Modeltest).

3.2.4.7.2 Identificação de recombinantes intersubtipos

Dois programas foram usados para identificação de subtipos recombinantes intersubtipos: *RIP*; *Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e o *Simplot*. O *RIP* foi usado para computar a distância genética entre

segmentos de até 200 pares de base e os seguimentos alinhados de um painel de seqüências referenciam os subtipos conhecidos.

O Simplot foi usado para determinar a relação filogenética de cada seqüência dos pacientes com as seqüências referencias usando o *bootscanning*. Um *bootstrap* de 1000 replicatas, gerado pelo método de *Neighbor-joining* foi obtido usando uma janela de 200 – 400 pares de base.

A seqüências referências utilizada tanto para o *RIP* quanto para o *Simplot* foram obtidas do HIV *Sequence Database* do *Los Alamos National Laboratory* (<http://hiv-web.lanl.gov>). Tanto o *RIP* quanto o *Simplot* identificaram supostas posições de recombinação por plotagem ou de valores de similaridade genética (*RIP*) ou permutação (*Simplot*) ao longo de cada seqüência. As seqüências foram consideradas como tendo uma forte evidência de recombinação se tanto o *RIP* quanto o *Simplot* identificaram sítios de recombinação utilizando uma janela de 400 pares de base com um *bootstrap* de no mínimo de 90%. As seqüências foram consideradas como tendo fraca evidência de recombinação se tanto no *RIP* quanto *Simplot* foram identificados sítios de recombinação, utilizando uma janela de 200 pares de base e, valores de *bootstrap* entre 50% a 90%.

3.2.4.8 Análises Estatísticas

Os dados armazenados em planilhas nos programas Epi Info 6.04, Microsoft Excel XP e StaSoft, Inc. (2007) STATISTICA (*data analysis software system*), version 7.1 (www.statsoft.com).

Posteriormente, com auxílio do programa *StaSoft* realizamos uma análise prospectiva bivariada (exponencial) e a significância do valor do *p* pelo teste de de Qui-quadrado (χ^2), onde foram gerados as gráficos e tabelas.

4 RESULTADOS

Foram analisados todos os prontuários dos pacientes recém diagnosticados e cadastrados no ano de 2000 e 2001 num total de 594 pacientes, sendo que 315 realizaram o exame de Carga Viral e a Contagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+, antes do tratamento com antirretrovirais, para avaliarmos o perfil virológico, imunológico e posteriormente as características sócio demográfica (Tabelas 5 – 9 e Gráficos 1 – 5).

Tabela 5 - Distribuição por Sexo.

Sexo	Quantidade	Porcentagem
Masculino	180	57%
Feminino	135	43%
Geral	315	100%

Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Tabela 6 - Distribuição por Idade (N=315)

Faixa Etária	16-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55	56-70
Homem	5	25	73	30	28	7	12
Mulher	7	40	35	22	15	6	10
% Homem	2,77%	13,88%	40,55%	16,66%	15,55%	3,88%	6,66%
% Mulher	5,18%	29,62%	25,92%	16,29%	11,11%	4,44%	7,40%
% Geral	3,80%	20,63%	34,28%	16,50%	13,65%	4,12%	6,98%

Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Tabela 7 - Distribuição por Fator de Risco (N=315)

FATOR DE RISCO											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Soma
	Relação Sexual com Homens.	Trans-fusão Sanguínea	UDI	Múltiplos Parceiros	Parceiro Relação Sexual c/ Homens	Parceiro Relação Bi-Sexual	Parceiro com Múltiplos Parceiros	Parceiro UDI	Parceiro. HIV	Ignorado	
Homem	21	6	8	49	4	12	16	0	57	7	180
Mulher	9	0	3	12	0	3	24	6	72	6	135
% Homem	11,66%	3,33%	4,44%	27,22%	2,22%	6,66%	8,88%	0,00%	31,66%	3,88%	100%
% Mulher	6,66%	0,00%	2,22%	8,88%	0,00%	2,22%	17,77%	4,44%	53,33%	4,44%	100%
% Geral	9,52%	1,90%	3,49%	19,36%	1,26%	4,76%	12,69%	1,90%	40,95%	4,12%	100%

Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Tabela 8 - Distribuição por Escolaridade (N=315)

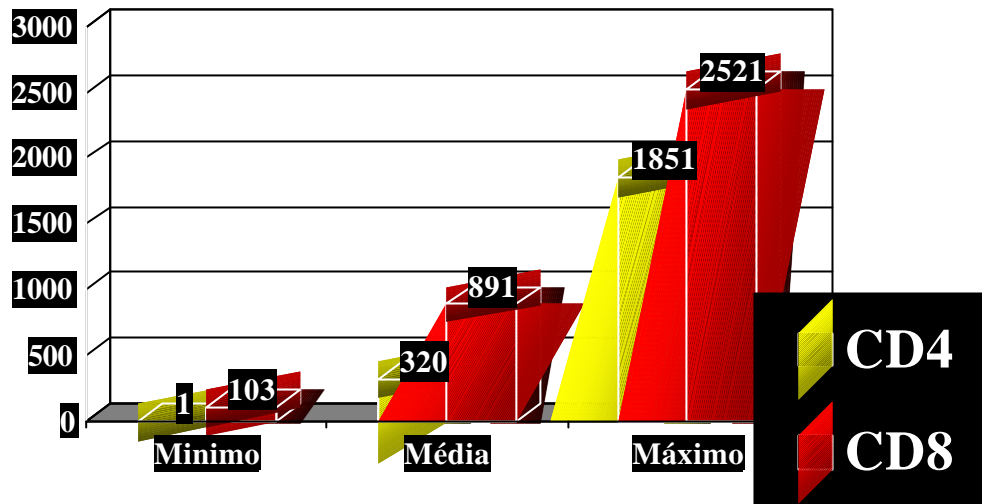
ESCOLARIDADE										
	Analfabeto	Alfabetizado	1 Grau até 4 série	1 Grau até 8 série	2Grau Incompleto	2 Grau Completo	Superior Incompleto	Superior Completo	NC	Soma
Homem	9	11	20	40	12	46	13	19	10	180
Mulher	3	3	24	27	15	30	9	21	3	135
% Homem	5,00%	6,11%	11,11%	22,22%	6,66%	25,55%	7,22%	10,55%	5,55%	100,00%
% Mulher	2,22%	2,22%	17,77%	20,0%	11,1%	22,22%	6,66%	15,55%	2,22%	100,00%
Geral	3,80%	4,44%	13,96%	21,26%	8,57%	24,12%	6,98%	12,69%	4,12%	100,00%

Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Tabela 9 - Distribuição por Estado Civil (N=315)

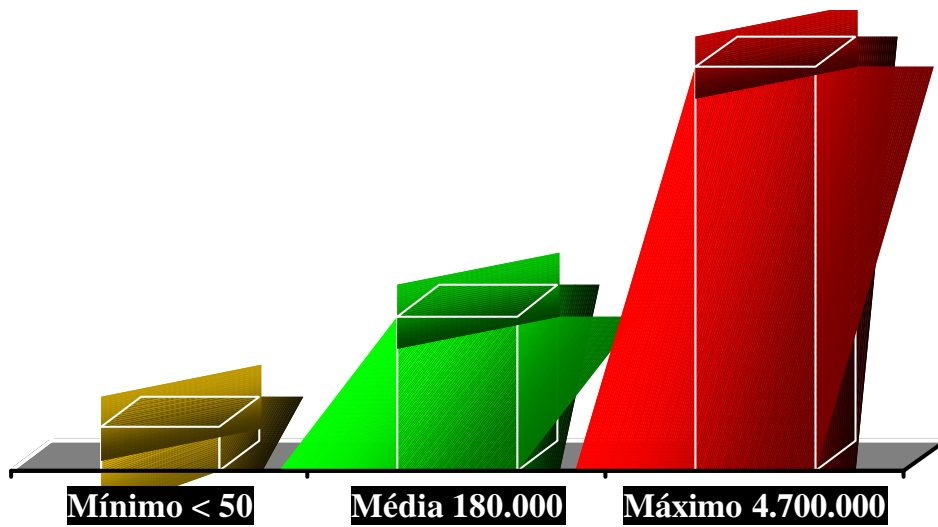
ESTADO CIVIL							
	Solteiro	Casado Amasiado	Separado Divorciado	Viúvo	Outros	Não Consta	Soma
Homem	76	59	25	4	8	8	180
Mulher	45	55	18	17	0	0	135
% Homem	42,22%	32,77%	13,88%	2,22%	4,44%	4,44%	100,00%
% Mulher	33,33%	40,74%	13,33%	12,59%	0,00%	0,00%	100,00%
Geral	38,41%	33,19%	13,65%	6,66%	2,53%	2,53%	100,00%

Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).



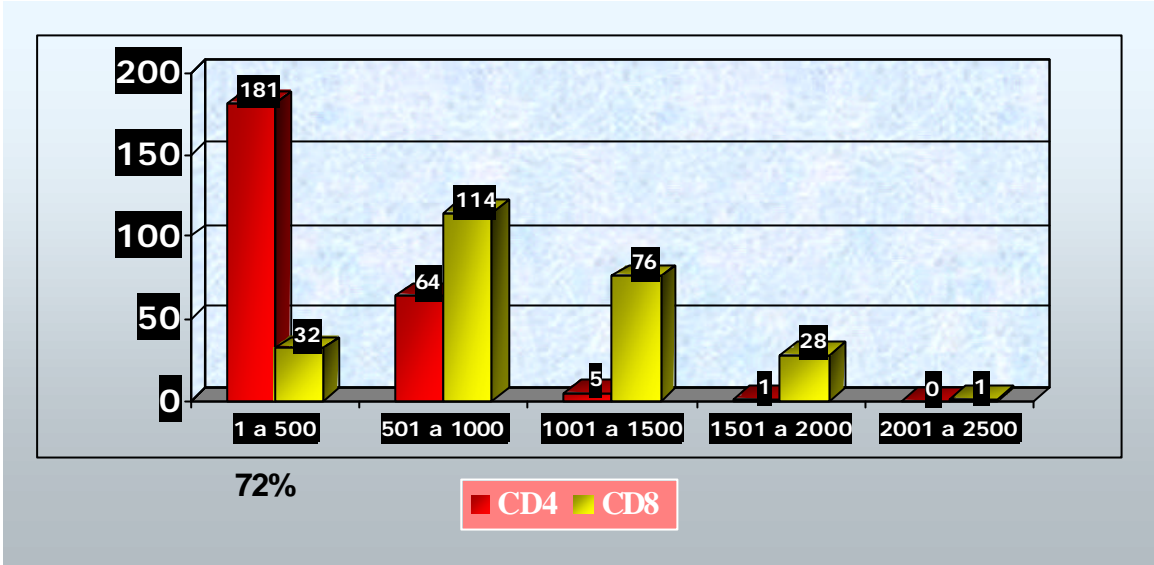
Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Gráfico 1 - Média da Contagem de TCD4+ / TCD8+ dos Pacientes Recém Diagnosticados (N=315).



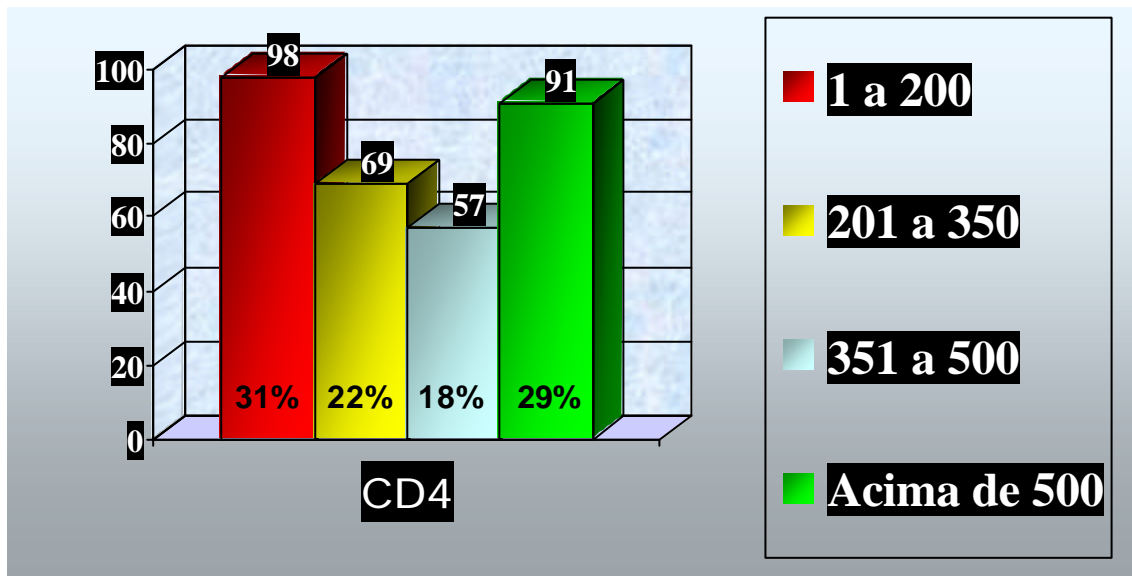
Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Gráfico 2 - Média de Resultado da Carga Viral (nº de cópias) dos Pacientes Recém Diagnosticados (N=315).



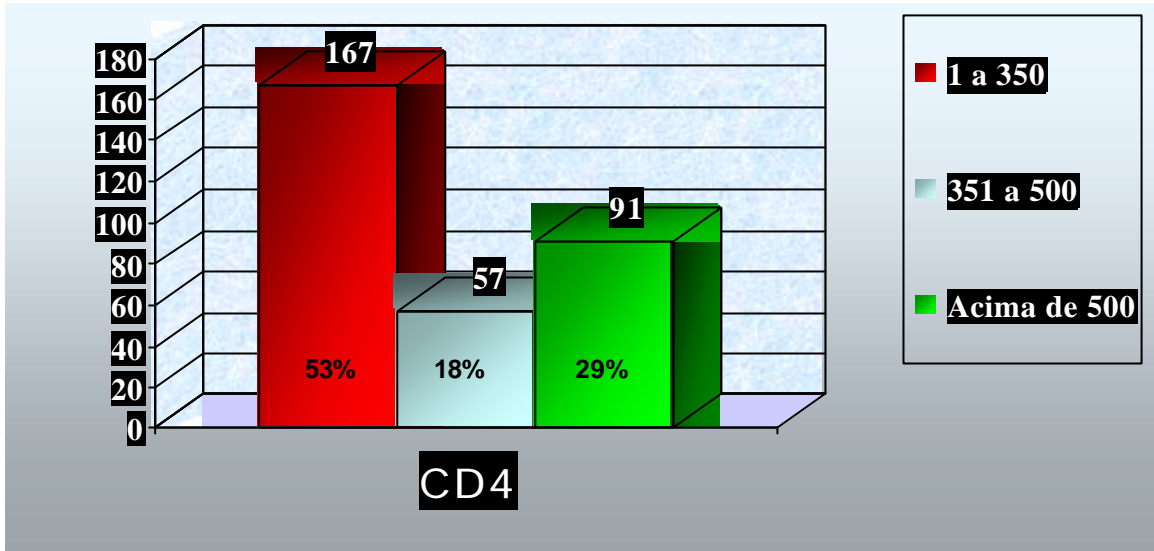
Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Gráfico 3 - Total de resultados da contagem de TCD4+/TCD8 dos pacientes recém diagnosticados pelo HIV – 1 (N=315).



Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Gráfico 4 - Resultado da contagem dos linfócitos TCD4+ dos pacientes (N=315), frente a padronização do Ministério da Saúde.



Fonte: Gagliani, 2004 (Dissertação de Mestrado - UNILUS).

Gráfico 5 - Resultado da contagem de linfócitos TCD4+ dos pacientes (N=315) frente a padronização do Ministério da Saúde que deveriam estar em tratamento antiretroviral.

Após avaliarmos o perfil virológico e imonológico dos pacientes, foram selecionados 80 indivíduos virgens de tratamento aos ARVs, para realização da genotipagem e subtipagem através do plasma congelado a $- 80^{\circ}$ C. Em seguida todos foram acompanhados durante 48 semanas a carga viral e a contagem de TCD4+/TCD8+.

Os pacientes foram divididos em dois grupos. O Grupo 1 (N=43) são os pacientes que após a introdução do tratamento aos antirretrovirais não conseguiram atingir os níveis de quantificação de Carga Viral abaixo de 50 cópias/ml, isto é a Carga Viral se manteve detectável após seis meses de tratamento, sendo 27 (62,7%) do sexo masculino e 16 (37,2%) do sexo feminino. Quanto à faixa etária foi entre 17 a 58 anos, com uma média de 35 anos.

Ao avaliarmos a genotipagem das amostras nesse grupo, no momento virgem de tratamento aos ARVs verificou-se que 21 pacientes (48,8%) apresentavam resistência primária. Sendo 10 (23,2%) aos IRTNN, 13 (30,2%) aos IRTN e 1 (2,3%) aos IP (Tabela 10).

Tabela 10 - Resistência genotípica primária: Mutações de resistência do HIV aos ARVs nos pacientes do Grupo 1 (N=43) virgens de tratamento.

Pacientes	Mutações ITRN	Mutações ITRNN	Mutações IP	Tratamento Inicial - ARVs
SANTOSBR 1	<i>T69N</i>	-	-	<i>AZT,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 2	<i>M184V</i>	-	-	<i>AZT,IDV,3TC</i>
SANTOSBR 5	<i>K70R,M184V</i>	<i>K103N,P225H</i>	-	<i>D4T,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 6	<i>T215DE</i>	-	-	<i>D4T,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 9	-	<i>K103N</i>	-	<i>D4T,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 12	<i>T69FIL,K70N, M184V</i>	-	-	<i>AZT,NFV,3TC</i>
SANTOSBR 13	-	<i>K103N</i>	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 17	-	<i>K103N</i>	-	<i>D4T,EFZ, 3TC</i>
SANTOSBR 21	<i>V75M</i>	-	-	<i>AZT,NFV,3TC</i>
SANTOSBR 24	<i>M184V</i>	<i>V108I</i>	-	<i>AZT,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 25	<i>M184V</i>	-	-	<i>AZT,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 26	-	<i>M230L</i>	-	<i>D4T,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 30	<i>M184VI</i>	-	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 32	-	<i>K103N,M230L</i>	-	<i>D4T,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 34	-	-	<i>M46L, L10V</i>	<i>D4T,NFV,3TC</i>
SANTOSBR 35	<i>M184V</i>	-	-	<i>NFV,D4T,3TC</i>
SANTOSBR 36	<i>T215S</i>	<i>Y181V</i>	-	<i>AZT,IDV,3TC</i>
SANTOSBR 40	<i>M184V</i>	-	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 41	<i>M184V</i>	-	-	<i>AZT,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 42	-	<i>K103N</i>	-	<i>D4T,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 43	-	<i>K103N,P225H</i>	-	<i>AZT,EFZ,3TC</i>

Observação: ITRN = Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; ITRNN = Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP = Inibidor de Protease.

Quanto a análise da subtipagem podemos observar que a predominância foi o subtipo B 34 (79%) sendo que alguns pacientes já apresentavam resistência primária em alguma das três classes de ARVs: IRTNN 8 (18,6%), IRTN 12 (27,9%) e IP 1 (2,3%); já os pacientes do subtipo F 4 (9,3%), IRTNN 1 (2,5%) e nos pacientes com subtipos recombinantes B/F,F/B 5 (11,6%) foram observados resistência em apenas em uma classe de ARVs sendo os IRTNN 3 (6,9%).

Nas análises referente aos aspectos virológicos e imunológicos dos pacientes no momento em que se realizaram os exames de quantificação da carga viral e a contagem das supopulações dos linfócitos TCD4+/TCD8+, sem a introdução dos ARVs, e posteriormente o tratamento, ao longo de um ano, a média dos

resultados dos exames foram respectivamente: **Inicial** 140.316 cópias/mL (log 5,14) 330/889 células/ μ L; **3 meses** 63.284 cópias/mL (log 4,80) 353/895 células/ μ L; **6 meses** 65.633 cópias/mL (log 4,81) 384/945 células/ μ L; **9 meses** 22.344 cópias/mL (log 4,34) 411/936 células/ μ L; **12 meses** 13.633 cópias/mL (log 4,13) 398/890 células/ μ L (Tabela 11).

Tabela 11 - Médias da quantificação da carga viral (cópias/mL) e da contagem da subpopulação de linfócitos CD4/CD8 (células/ μ L) dos grupos 1 e 2 virgens de tratamento e após a introdução ARVs durante 12 meses.

<i>Tempo</i>	<i>GRUPO 1</i>		<i>GRUPO 2</i>	
	<i>C.Viral (log)</i>	<i>CD4/CD8</i>	<i>C.Viral (log)</i>	<i>CD4/CD8</i>
Inicial (sem ARV)	140.316 (5,14)	330/889	375.267 (5,57)	359/969
3 meses	63.284 (4,80)	353/895	4.306 (3,63)	431/1029
6 meses	65.633 (4,81)	384/945	<50 (1,69)	477/1089
9 meses	22.344 (4,34)	411/936	62 (1,79)	487/996
12 meses	13.633 (4,13)	398/890	61 (1,78)	514/978

Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37.

Já o Grupo 2 (N=37) são os pacientes que conseguiram se manter com os níveis de quantificação da Carga Viral, indetectáveis após seis meses de tratamento, sendo 24 (64,8%) do sexo masculino e 13 (35,1%) do sexo feminino. Quanto à faixa etária foi entre 20 a 55 anos, com uma média de 36 anos.

Quanto as avaliações da genotipagem das amostras nesse grupo, no momento virgem de tratamento aos ARVs verificou-se que 6 pacientes (16,2%) apresentavam resistência primária. Sendo 3 (8,1%) aos IRTNN, 3 (8,1%) aos IRTN e 1 (2,7%) aos IP (Tabela 12).

Tabela 12 - Resistência genotípica primária: Mutações de resistência do HIV aos ARVs nos pacientes do Grupo 2 (N=37) virgens de tratamento.

Pacientes	Mutações ITRN	Mutações ITRNN	Mutações IP	Tratamento Inicial – ARVs
SANTOSBR 08	<i>M184V</i>	-	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 09	<i>M184V</i>	<i>Y188L</i>	-	<i>D4T,EFZ,3TC</i>
SANTOSBR 13	-	-	<i>M46L,A71V</i>	<i>AZT,IDV,RTV,3TC</i>
SANTOSBR 27	-	<i>K103N, Y181C</i>	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 28	<i>M41W, K219N</i>	-	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>
SANTOSBR 30	-	<i>V108I</i>	-	<i>AZT,NVP,3TC</i>

Observação: ITRN = Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; ITRNN = Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP = Inibidor de Protease.

Quanto às análises da subtipagem podemos observar que a predominância foi o subtipo B 30 (81%) sendo que alguns pacientes já apresentavam resistência primária aos ARVs: IRTNN 3 (8,1%), IRTN 1 (2,7%) e IP 2 (5,4%); já o subtipo F 2 (5,4%) não houve resistência aos ARVs. Para os pacientes que apresentavam subtipos recombinantes B/F,F/B 5 (13,5%), foram observados resistência apenas em uma classe de ARVs sendo, IRTN 1 (2,7%).

Nas análises referente aos aspectos virológicos e imunológicos dos pacientes no momento em que se realizaram os exames de quantificação da carga viral e a contagem das supopulações dos linfócitos TCD4+/TCD8+, sem a introdução dos ARVs, e posteriormente o tratamento, ao longo de um ano, a média dos exames foram respectivamente: **Inicial** 375.267 cópias/mL (log 5,57) 359/969 células/ μ L; **3 meses** 4.306 cópias/mL (log 3,63) 431/1029 células/ μ L; **6 meses** < 50 cópias/mL 477/1029 células/ μ L; **9 meses** 62 cópias/mL (log 1,79) 487/996 células/ μ L; **12 meses** 61 cópias/mL (log 1,78) 514/978 células/ μ L (Tabela 11).

Ao comparamos os dois grupos (N=80), 27 (33,7%) pacientes apresentaram resistência primária aos ARVs ($p=0,004$; IC95%), sendo, 13 (16,2%) aos IRTNN; 16 (20%) aos IRTN e 2 (2,5%) aos IP. Quanto aos pacientes que apresentavam resistência a pelo menos duas classes de ARVs (IRTNN e IRTN) foram 4 (5%). Não foi observado nenhum paciente resistente as três classes de ARVs. Outro dado curioso é que não foram encontrados diferenças significativas basais observadas na carga viral e níveis de TCD4+ com relação aos ant-retrovirais utilizados ou a demografia entre os 2 grupos, pacientes portadores de vírus resistentes e tipo selvagem.

4.1 EXPOSIÇÃO AO TRATAMENTO INICIAL AOS ARVS (GRUPO 1 E 2)

Todos os pacientes do grupo 1 e 2 incluídos no estudo, após realizarem os exames de de Carga Viral e contagem da subpopulação dos linfócitos TCD4+/TCD8+, no momento inicial do tratamento foram expostos ao esquema de tratamento da terapia antirretroviral (Tabela 13 e 14), conforme o consenso brasileiro padronizado pelo Ministério da Saúde.

As combinações de drogas antirretrovirais mais comuns em uso pelo grupo 1 administrado foram: AZT+3TC+NVP (9; 20,9%), AZT+3TC+EFV (11; 25,5%), d4T+3TC+EFV (6; 13,9%) d4T+3TC+NVP (1; 2,3%), AZT+3TC+NFV (6; 13,9%), AZT+3TC+IDV (2; 4,6%), d4T+3TC+NFV (1; 2,3%), AZT+3TC+ABC (1; 2,3%) e d4T+3TC+IDV ou SQV ou RTV (6; 13,9%).

Já o grupo 2 as combinações de drogas antirretrovirais mais usadas por esse grupo foram: AZT+3TC+NVP (8; 21,6%), AZT+3TC+EFV (10; 27%), d4T+3TC+EFV (3; 8,1%) d4T+3TC+NVP (3; 8,1%), AZT+3TC+NFV (1; 2,7%), AZT+3TC+IDV (1; 2,7%), d4T+3TC+NFV (2; 5,4%), AZT+3TC+ABC (1; 2,7%), d4T+3TC+IDV ou SQV ou RTV (7; 18,9%) e AZT+ddl+IDV ou SQV (1; 2,7%).

Tabela 13 - Anti-retrovirais previamente administrados no início do tratamento dos 43 pacientes do Grupo 1 matriculados no CRAIDS entre os anos de 2000 e 2001.

ARV	Número de Pacientes	%
Inibidores da TR Análogos (ITRN)		
Zidovudina (AZT)	26	60,4
Lamivudina (3TC)	38	88,3
Didanosina (ddl)	2	4,6
Estavudina (d4T)	15	34,8
Abacavir (ABC)	1	2,3
Inibidores da TR Não-análogos (ITRNN)		
Nevirapina (NVP)	10	23,2
Efavirenz (EFV)	13	30,2
Inibidores da Protease (IP)		
Saquinavir (SQV)	1	2,3
Ritonavir (RTV)	3	6,9
Indinavir (IDV)	4	9,3
Nelfinavir (NFV)	8	18,6

Observação: ITRN = Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; ITRNN = Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP = Inibidor de Protease .

Tabela 14 - Anti-retrovirais previamente administrados no início do tratamento dos 37 pacientes do Grupo 2 matriculados no CRAIDS entre os anos de 2000 e 2001.

ARV	Número de Pacientes	%
Inibidores da TR Análogos (ITRN)		
Zidovudina (AZT)	27	61,3
Lamivudina (3TC)	35	94,5
Didanosina (ddl)	3	8,1
Estavudina (d4T)	13	35,1
Abacavir (ABC)	1	2,7
Inibidores da TR Não-análogos (ITRNN)		
Nevirapina (NVP)	13	35,1
Efavirenz (EFV)	15	40,1
Inibidores da Protease (IP)		
Saquinavir (SQV)	-	-
Ritonavir (RTV)	7	18,9
Indinavir (IDV)	7	18,9
Nelfinavir (NFV)	3	8,1

Observação: ITRN = Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; ITRNN = Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP = Inibidor de Protease .

4.2 PERFIL DE MUTAÇÕES E RESISTÊNCIA DOS GRUPO 1 E 2

Nas análises das mutações de resistência do HIV – 1 observadas nos pacientes do Grupo 1 (N=43) e Grupo 2 (N=37) foram observados quanto aos ITRNNs 13 (30,2%); 4 (10,8%), ITRNs 16 (37,2); 4 (10,8%) e IP 2 (4,6%); 2 (5,4%), respectivamente. (Tabelas 15, 16).

Tabela 15 - Prevalência de Mutações de resistência do HIV aos ARVs nos 43 pacientes do Grupo 1 virgens de tratamento.

ITRN		ITRNN		IP	
Codon	No de Pacientes (%)	Codon	No de Pacientes (%)	Codon	No de Pacientes (%)
<i>M184V</i>	9 (20,9)	<i>K103N</i>	7 (16,2)	<i>L10V</i>	1 (2,3)
<i>T69N</i>	1 (2,3)	<i>M230L</i>	2 (4,6)	<i>M46L</i>	1 (2,3)
<i>K70R</i>	1 (2,3)	<i>P225H</i>	2 (4,6)	-	-
<i>T215DE</i>	1 (2,3)	<i>V108I</i>	1 (2,3)	-	-
<i>T69FIL</i>	1 (2,3)	<i>Y181V</i>	1 (2,5)	-	-
<i>K70N</i>	1 (2,3)	-	-	-	-
<i>V75M</i>	1 (2,3)	-	-	-	-
<i>T215S</i>	1 (2,3)	-	-	-	-
Total	16 (37,2)		13 (30,2)		2 (4,6)

Observação: ITRN = Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; ITRNN = Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP = Inibidor de Protease.

Tabela 16 - Prevalência de Mutações de resistência do HIV aos ARVs nos 37 pacientes do Grupo 2 virgens de tratamento.

ITRN		ITRNN		IP	
Codon	No de Pacientes (%)	Codon	No de Pacientes (%)	Codon	No de Pacientes (%)
<i>M184V</i>	2 (5,4)	<i>Y188L</i>	1 (2,7)	-	-
<i>M41W</i>	1 (2,7)	<i>K103N</i>	1 (2,7)	<i>M46L</i>	1 (2,7)
<i>K219N</i>	1 (2,7)	<i>Y181C</i>	1 (2,7)	<i>A71V</i>	1 (2,7)
-	-	<i>V108I</i>	1 (2,7)	-	-
Total	4 (10,8)		4 (10,8)		2 (5,4)

Observação: ITRN = Inibidor da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeo; ITRNN = Inibidor da Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP = Inibidor de Protease.

Quanto as mutações para ITRNNs, ITRNs e IP relacionados com os subtipos B, F e recombinantes B/F,F/B dos pacientes dos grupos 1 e 2, estão descritas nas tabelas (17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23).

Tabela 17 - Mutações de Transcriptase Reversa (RT) para ITRNNs para os subtipos B, F e recombinantes B/F,F/B nos pacientes do grupo 1.

<i>Mutações de Resistência dos ITRNNs (Grupo 1)</i>						
<i>Subtipo</i>	<i>K103N</i>	<i>V108I</i>	<i>P225H</i>	<i>Y181V</i>	<i>M230I</i>	<i>M230L</i>
B (n= 34)	4	1	1	1	1	–
F (n= 4)	–	–	–	–	–	1
B/F, F/B (n= 5)	3	–	1	–	–	1
Total (n=43)	7	1	2	1	–	2
Total (%)	16,2	2,3	4,6	2,3	5	4,6

Tabela 18 - Mutações de Transcriptase Reversa (RT) para ITRNNs para os subtipos B, F e recombinantes B/F,F/B nos pacientes do grupo 2.

<i>Mutações de Resistência dos ITRNNs (Grupo 2)</i>				
<i>Subtipo</i>	<i>K103N</i>	<i>V108I</i>	<i>Y188L</i>	<i>Y181C</i>
B (n= 30)	1	1	1	1
F (n= 2)	-	-	-	-
B/F, F/B (n= 5)	-	-	-	-
Total (n=37)	1	1	1	1
Total (%)	2,7	2,7	2,7	2,7

Tabela 19 - Mutações de Transcriptase Reversa (RT) para ITRNs para os subtipos B, F e recombinantes B/F nos pacientes do grupo 1.

<i>Mutações de Resistência dos ITRNs (Grupo 1)</i>							
<i>Subtipo</i>	<i>T69N</i>	<i>T69FIL</i>	<i>K70N</i>	<i>V75M</i>	<i>M184V</i>	<i>T215D</i>	<i>T215S</i>
B (n= 34)	1	1	2	1	9	1	2
F (n= 4)	-	-	-	-	-	-	-
B/F (n= 5)	-	-	-	-	-	-	-
Total (n=43)	1	1	2	1	9	1	2
Total (%)	2,3	2,3	4,6	2,5	20,9	2,3	4,6

Tabela 20 - Mutações de Transcriptase Reversa (RT) para ITRNs para os subtipos B, F e recombinantes B/F nos pacientes do grupo 2.

<i>Mutações de Resistência dos ITRNs (Grupo 2)</i>			
<i>Subtipo</i>	<i>M41W</i>	<i>K219N</i>	<i>M184V</i>
B (n= 30)	-	-	2
F (n= 2)	-	-	-
B/F (n= 5)	1	1	-
Total (n=37)	1	1	2
Total (%)	2,7	2,7	5,4

Tabela 21 - Mutações na Protease para os subtipos B, F e recombinantes B/F nos pacientes do grupo 1.

<i>Mutações de Resistência IPs (Grupo 1)</i>		
Subtipo	M46L	L10V
B (n= 34)	1	1
F (n= 4)	-	-
B/F (n= 5)	-	-
Total (n=43)	1	1
Total (%)	2,3	2,3

Tabela 22 - Mutações na Protease para os subtipos B, F e recombinantes B/F nos pacientes do grupo 2.

Subtipo	M46L	A71V
B (n= 30)	1	1
F (n= 2)	-	-
B/F (n= 5)	-	-
Total (n=37)	1	1
Total (%)	2,7	2,7

Tabela 23 - Frequência de subtipos e recombinantes intersubtipos do HIV – 1 pela análise do gene pol.

Subtipos	%
B (n = 64)	80
F (n = 06)	7,5
Recombinantes BF (n = 10)	12,5
Total (n = 80)	

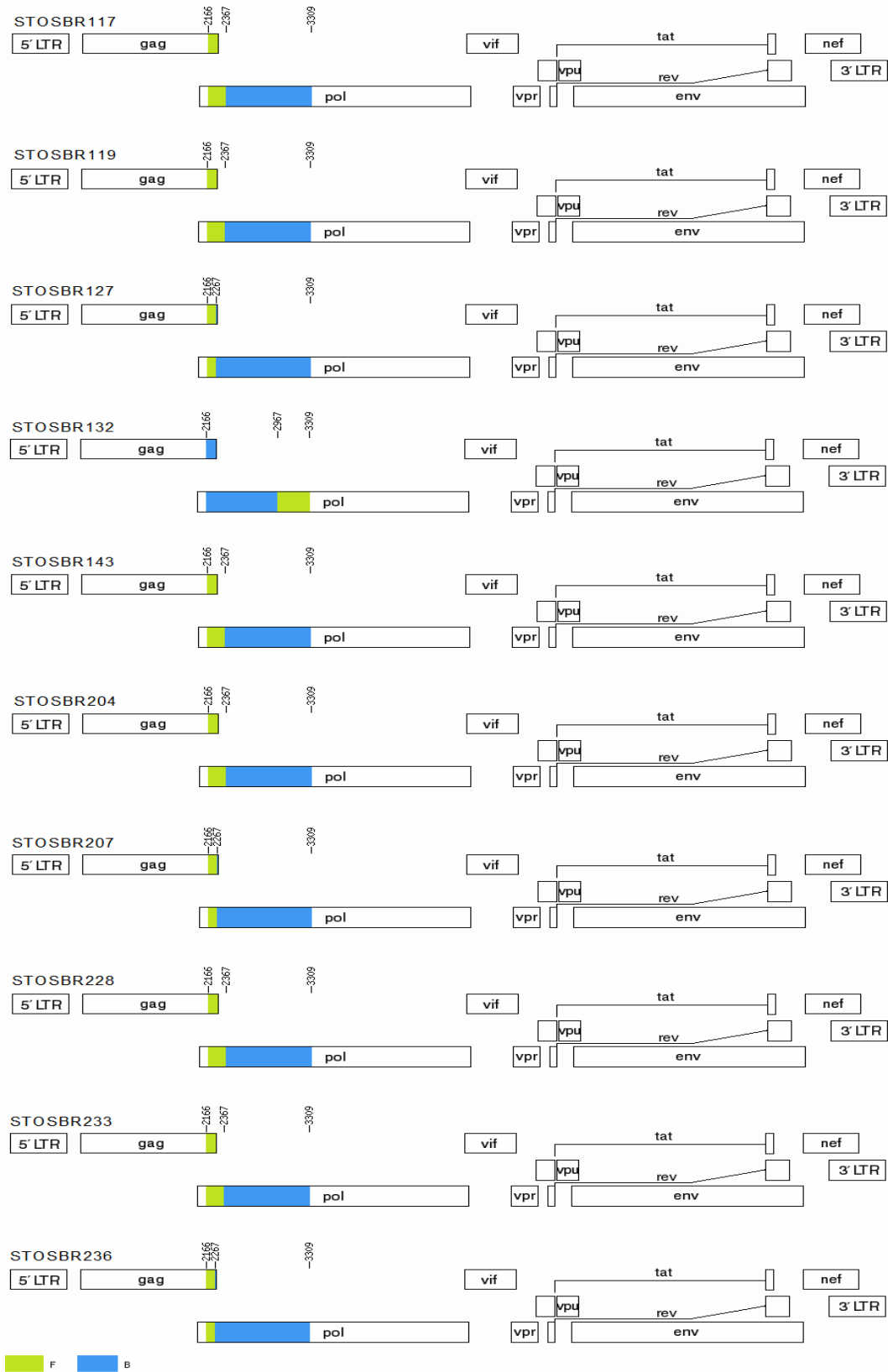


Figura 5 - Representação esquemática do mosaico de estruturas do genoma completo das dez seqüências recombinantes analisadas, mostrando na região *pol* os segmentos identificados em azul correspondem o subtipo B, os segmentos em verde correspondem o subtipo F.

4.3 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Tabela 24 - Formas de exposição ao HIV em pacientes dos Grupos 1 e 2 matriculados no CRAIDS entre aos anos de 2000 e 2001.

EXPOSIÇÃO	GRUPO 1 (%)	GRUPO 2 (%)
Hetero	22 (51,1%)	22 (59,4%)
Hetero/Homo	8 (18,6%)	5 (13,5%)
Hetero/Homo/Transfusão	3 (6,9%)	-
Hetero/UDI/Transfusão	-	2 (5,4%)
Hetero/Transfusão	-	2 (5,4%)
Hetero/UDI	4 (9,3%)	4 (10,8%)
Homo	6 (13,9%)	2 (7,4%)
TOTAL	43 (100%)	37 (100%)

Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37.

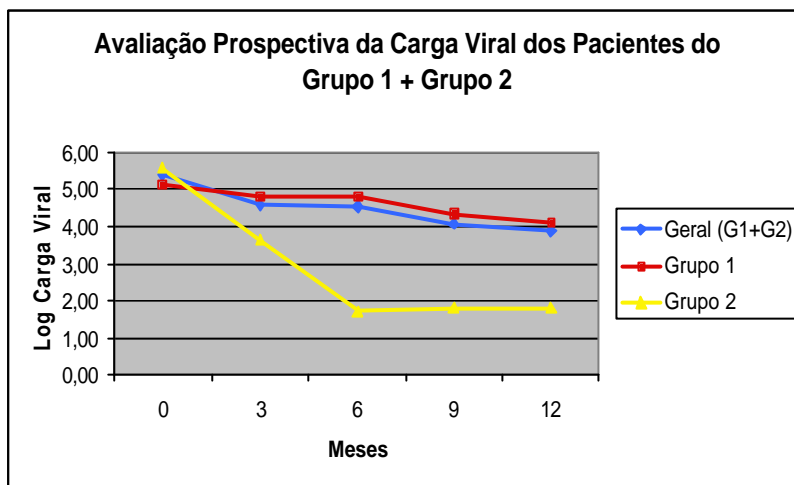
Tabela 25 - Características demográficas e grau de escolaridade dos pacientes dos grupos 1 e 2 matriculados no CRAIDS entre os anos de 2000 e 2001.

Variável	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)
Sexo		
Masculino	27 (62,7%)	24 (64,8%)
Feminino	16 (37,2%)	13 (35,1%)
Idade		
18 a 30 anos	12 (27,9%)	8 (21,6%)
31 a 50 anos	30 (69,7%)	28 (75,6%)
Mais de 50 anos	1 (2,3%)	1 (2,7%)
Estado Civil		
Amasiado	5 (11,6%)	5 (13,5%)
Casado	6 (13,9%)	6 (16,2%)
Divorciado	2 (4,6%)	2 (5,4%)
Solteiro	27 (62,7%)	16 (43,2%)
Separado	3 (6,9%)	4 (10,8%)
Viúvo	-	4 (10,8%)

Tabela 25 - Características demográficas e grau de escolaridade dos pacientes dos grupos 1 e 2 matriculados no CRAIDS entre os anos de 2000 e 2001.

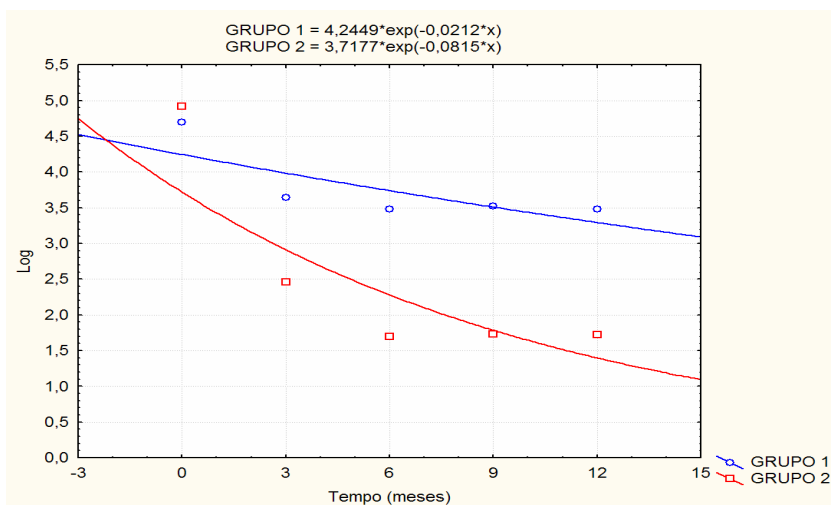
Variável	Grupo 1 (%)	Grupo 2 (%)
Escolaridade *		
Ensino Médio	29 (67,4%)	22 (59,4%)
Ensino Fundamental	6 (13,9%)	11 (29,7%)
Superior	5 (11,6%)	4 (10,8%)
Analfabeto	3 (6,9%)	-

Observação: * Estudos concluídos; Grupo1 - N=43; Grupo2 - N=37.



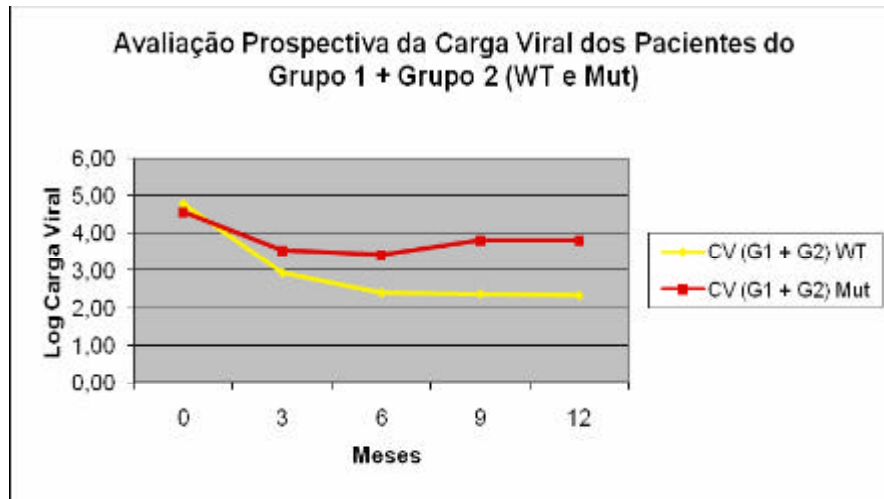
Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37, (p= <0,00001; IC 95%).

Gráfico 6 - Avaliação Prospectiva do Exame de Carga Viral nos Pacientes do Grupo 1 e 2 no Período de 12 meses.



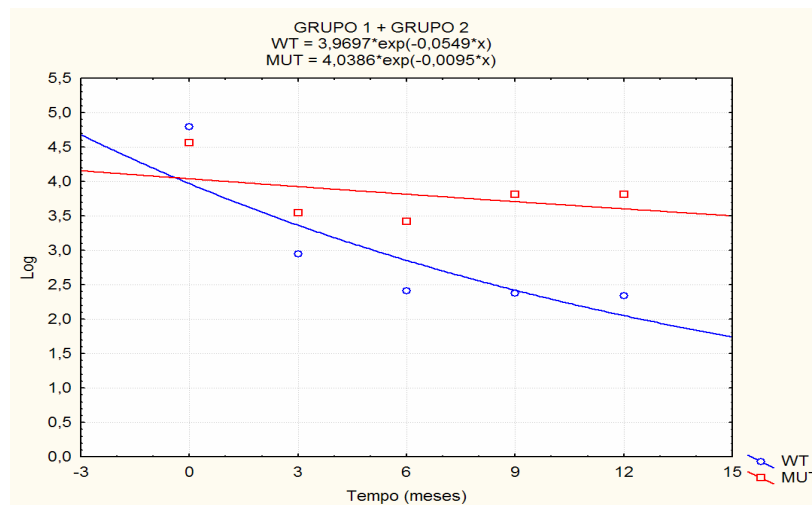
Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; (p= <0,00001; IC 95%).

Gráfico 7 - Avaliação Prospectiva Bivariada (exponencial) do Exame de Carga Viral nos Pacientes do Grupo 1 e 2 no Período de 12 meses.



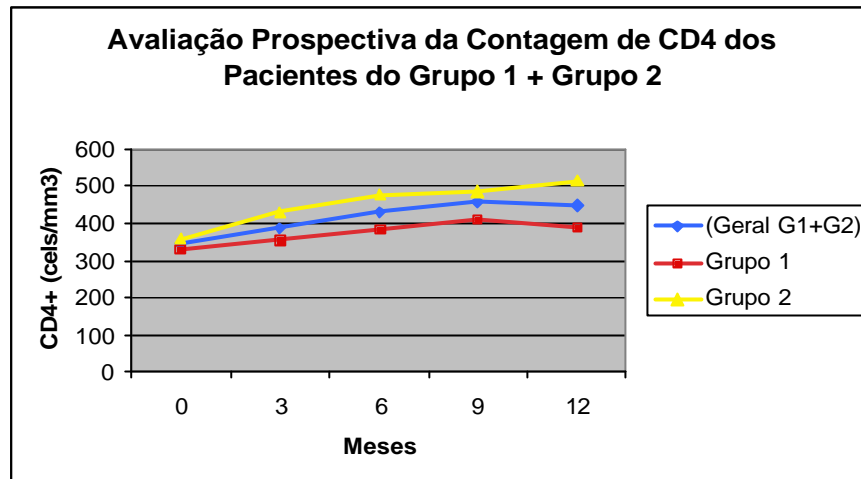
Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; ($p= 0,00003$; IC 95%).

Gráfico 8 - Avaliação Prospectiva do Exame de Carga Viral nos Pacientes do Grupo 1 e 2 (WT e Mut) no Período de 12 Meses.



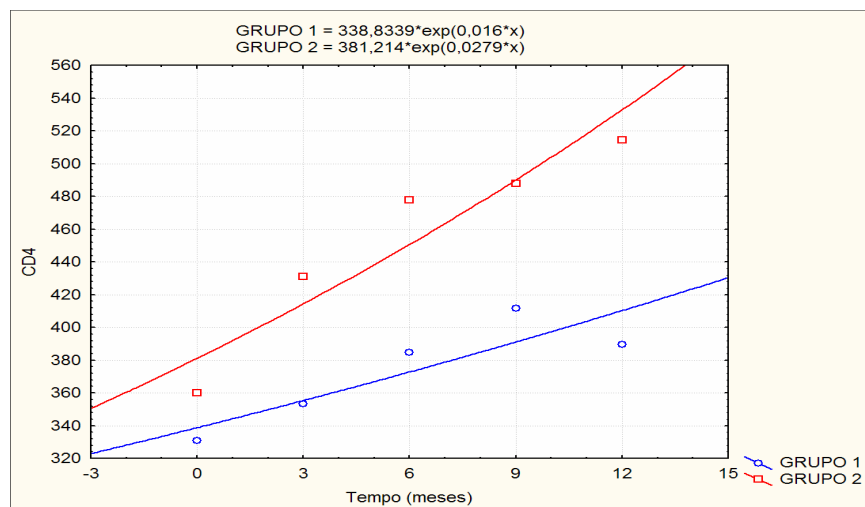
Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; ($p= 0,00003$; IC 95%).

Gráfico 9 - Avaliação Prospectiva Bivariada (exponencial) do Exame de Carga Viral nos Pacientes do Grupo 1 e 2 (WT e Mut) no Período de 12 Meses.



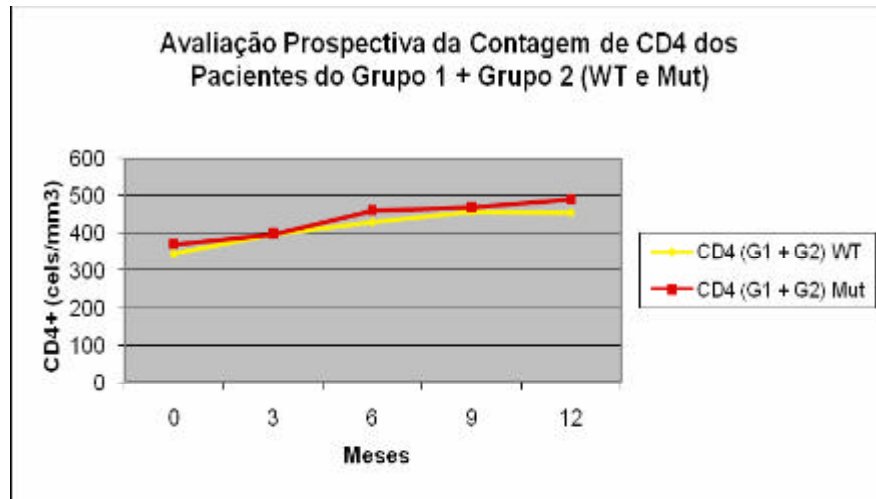
Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; (p= 0,30; IC 95%).

Gráfico 10 - Avaliação Prospectiva do Exame de contagem de TCD4 nos Pacientes do Grupo 1 e 2 no Período de 12 Meses.



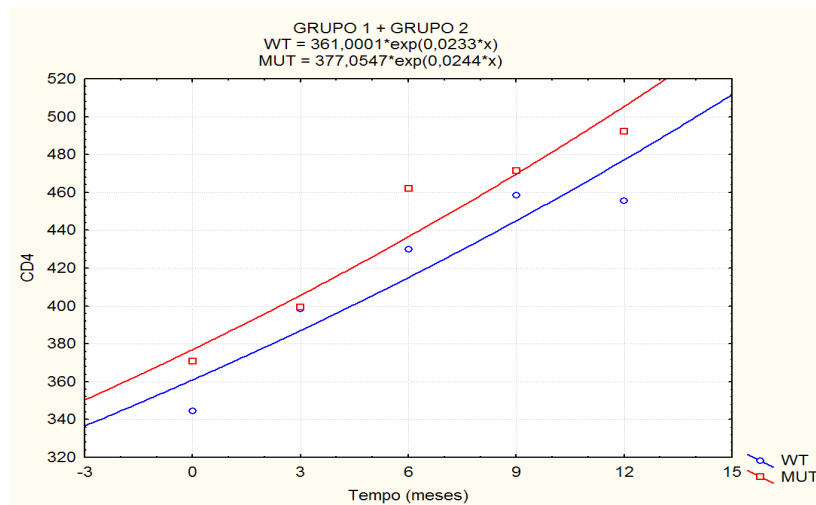
Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; (p= 0,30; IC 95%).

Gráfico 11 - Avaliação Prospectiva Bivariada (exponencial) do Exame de contagem de TCD4 nos Pacientes do Grupo 1 e 2 no Período de 12 Meses.



Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; (p= 0,96; IC 95%).

Gráfico 12 - Avaliação Prospectiva do Exame de contagem de TCD4 nos Pacientes do Grupo 1 + Grupo 2 (WT e Mut) no Período de 12 Meses.



Observação: Grupo 1 - N=43; Grupo 2 - N=37; (p= 0,96; IC 95%).

Gráfico 13 - Avaliação Prospectiva Bivariada (exponencial) do Exame de contagem de TCD4 nos Pacientes do Grupo 1 + Grupo 2 (WT e Mut) no Período de 12 Meses.

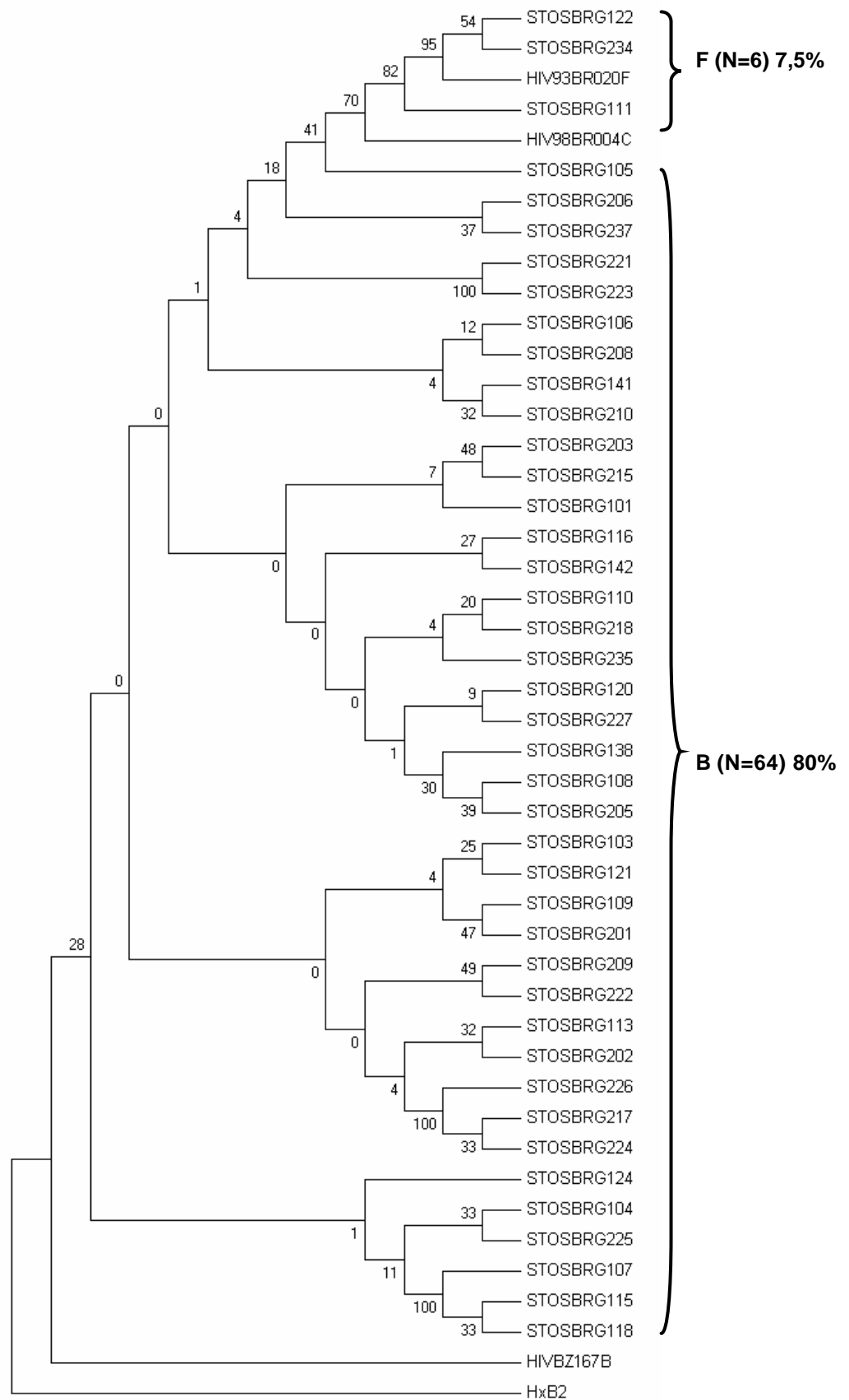


Figura 6 - Classificação Filogenética para o gene *pol* das seqüências puras (N=70), inferida por Neighbor-Joining, dos subtipos do HIV – 1 B e F.

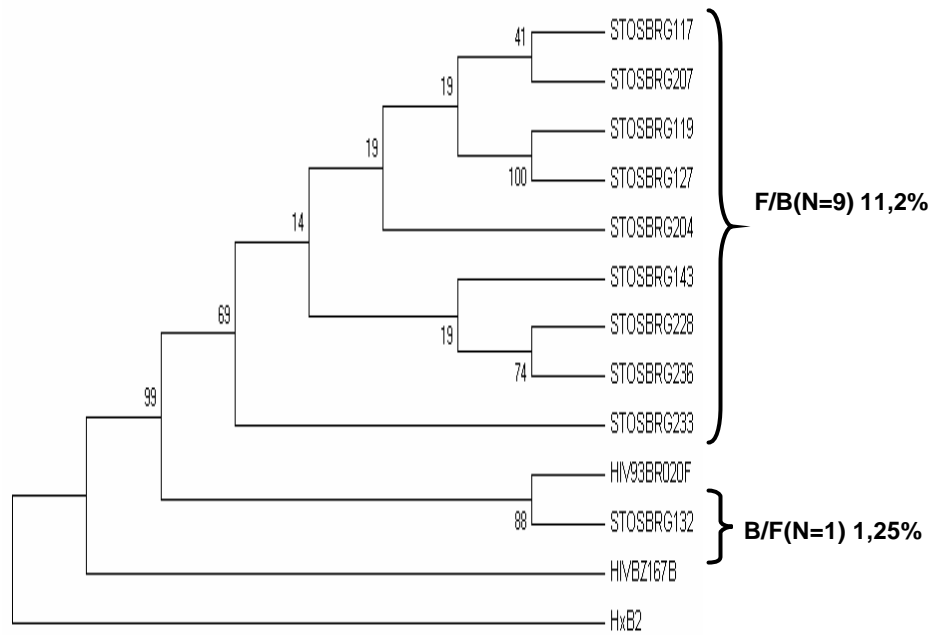


Figura 7 - Classificação Filogenética para o gene *pol* das seqüências recombinantes (N=10), inferida por Neighbor-Joining, dos subtipos do HIV – 1 F/B e B/F.

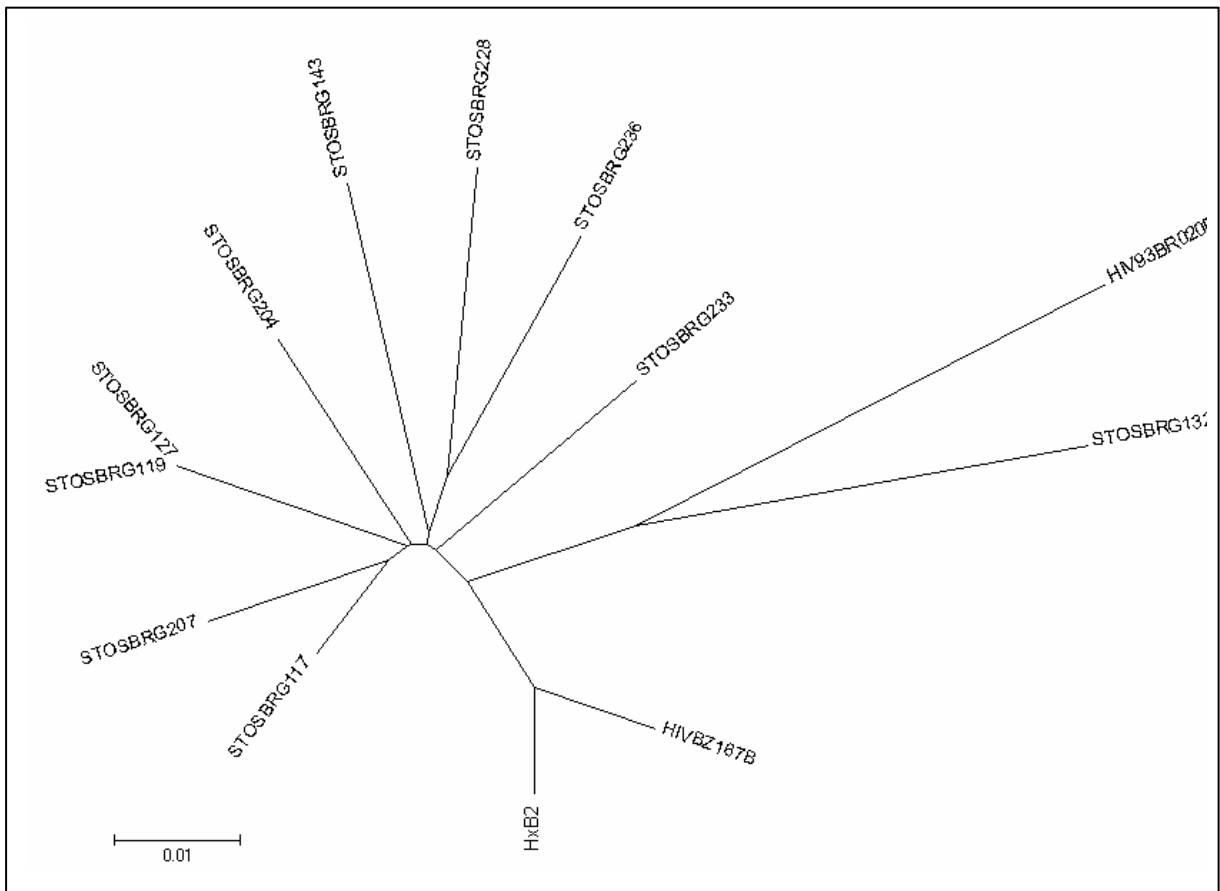
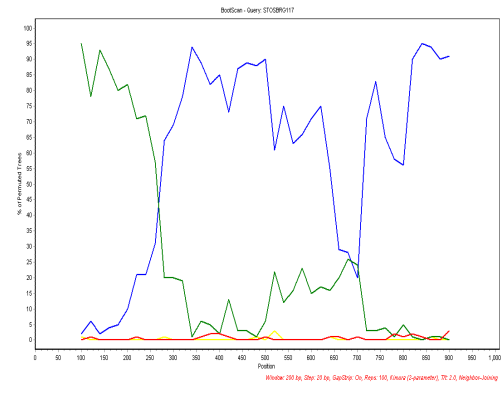
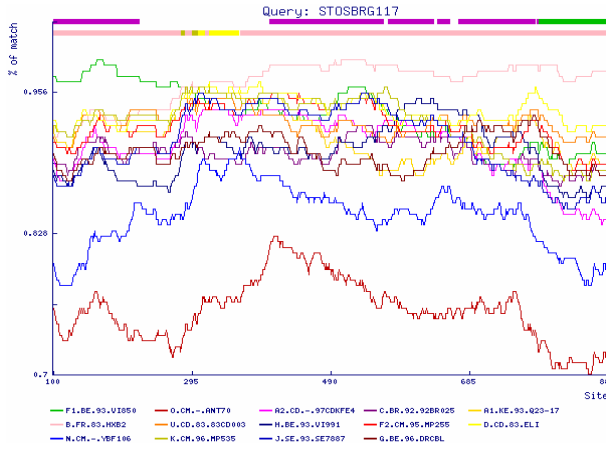
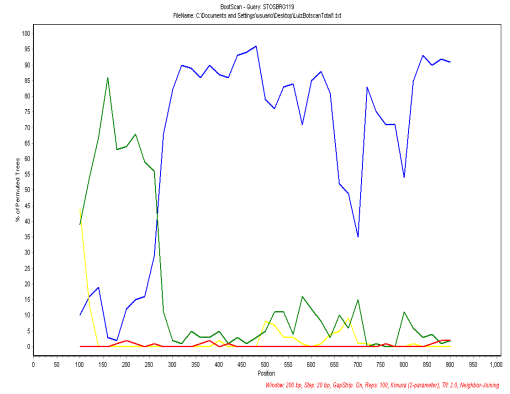
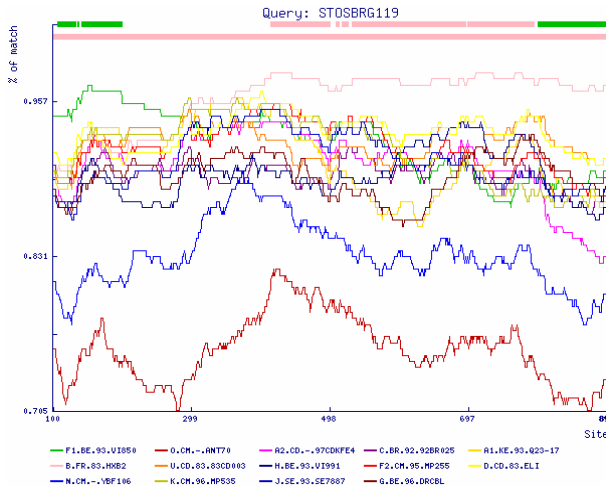


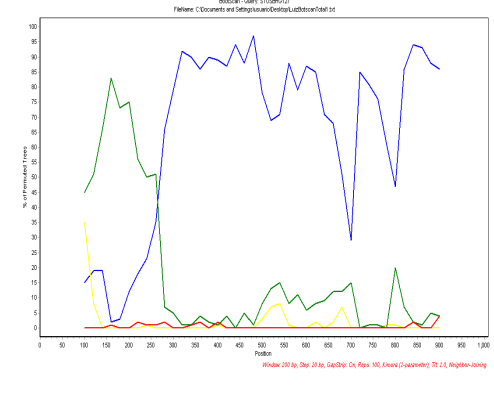
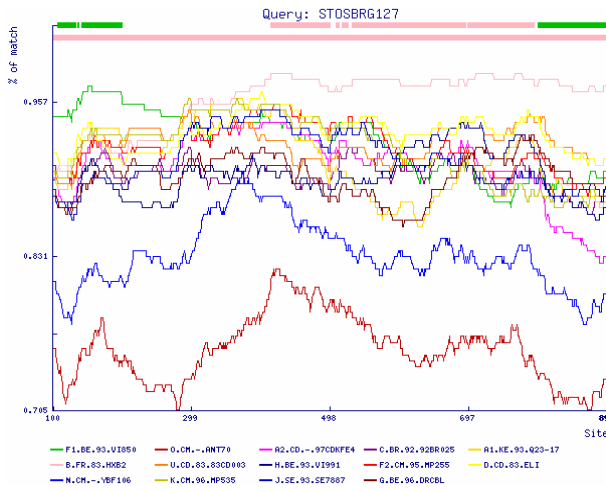
Figura 8 - Filogenia para o gene *pol* das seqüências recombinantes (N=10), inferida por Neighbor-Joining, dos subtipos do HIV – 1 F/B e B/F.



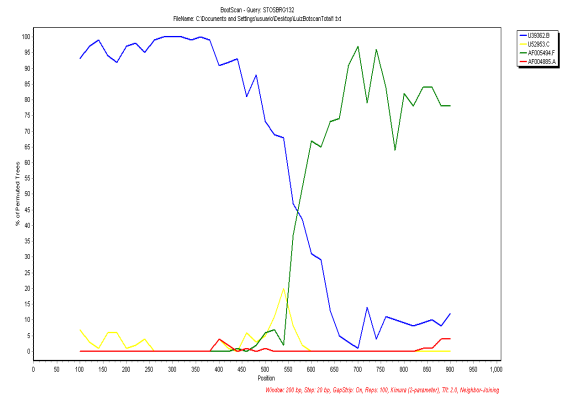
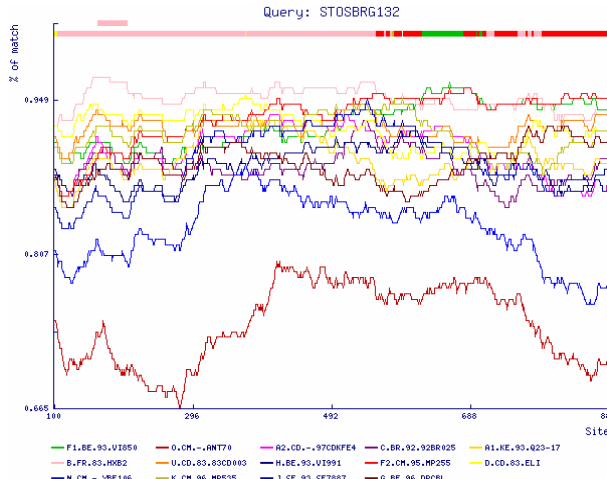
Fonte: **Simplot, RIP - Recombinant Identification program (<http://hiv-web.lanl.gov>) e BootsCan.**
Figura 9 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 1 (Paciente 17).



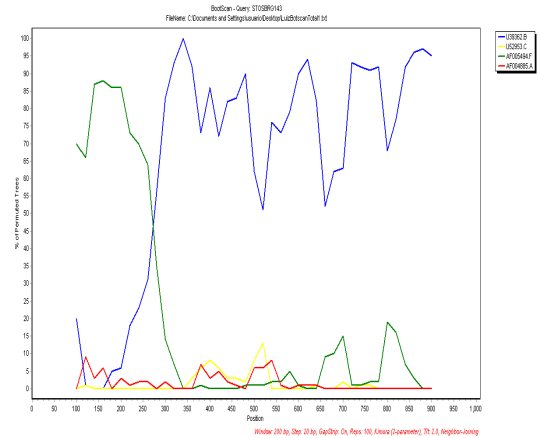
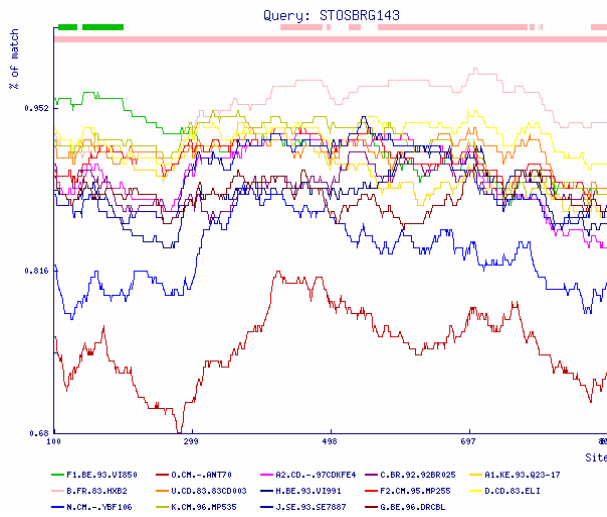
Fonte: **Simplot, RIP - Recombinant Identification program (<http://hiv-web.lanl.gov>) e BootsCan.**
Figura 10 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B do Grupo 1 (Paciente 19).



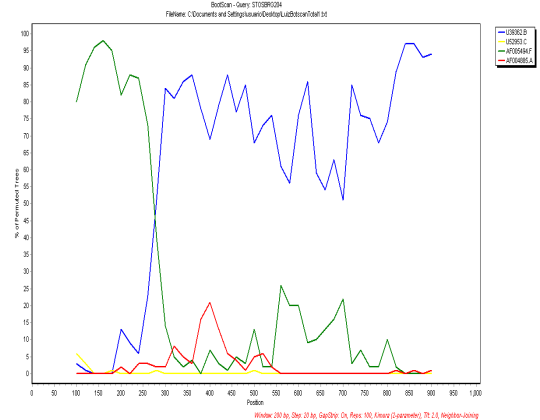
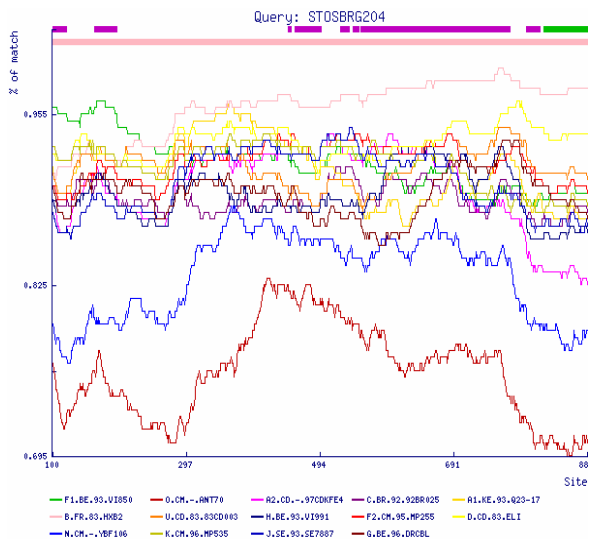
Fonte: **Simplot, RIP - Recombinant Identification program (<http://hiv-web.lanl.gov>) e BootsCan.**
Figura 11 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 1 (Paciente 27).



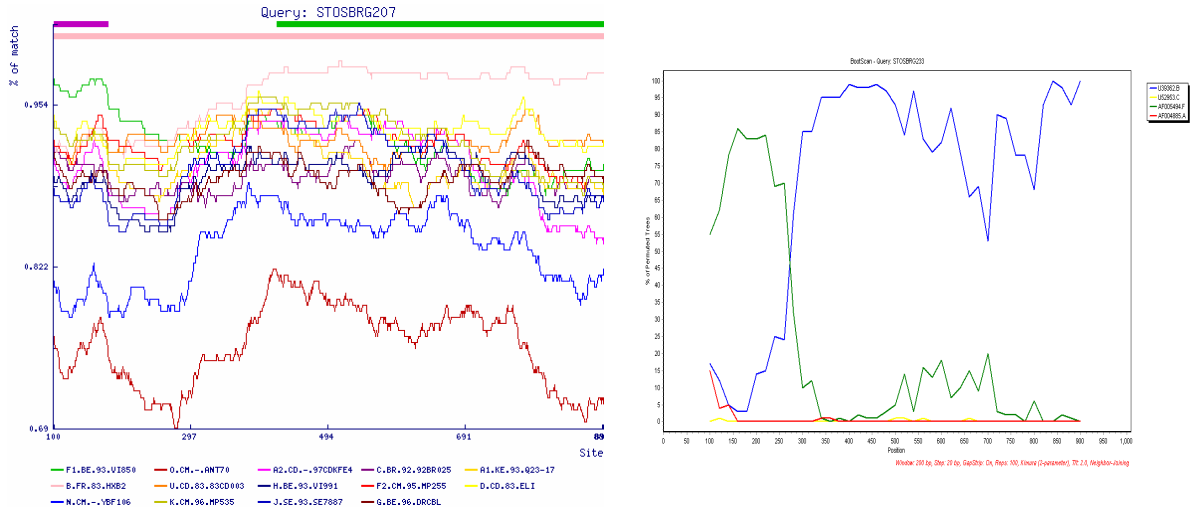
Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 12 - Identificação de recombinantes intersubtipos B/F Grupo 1 (Paciente 32).



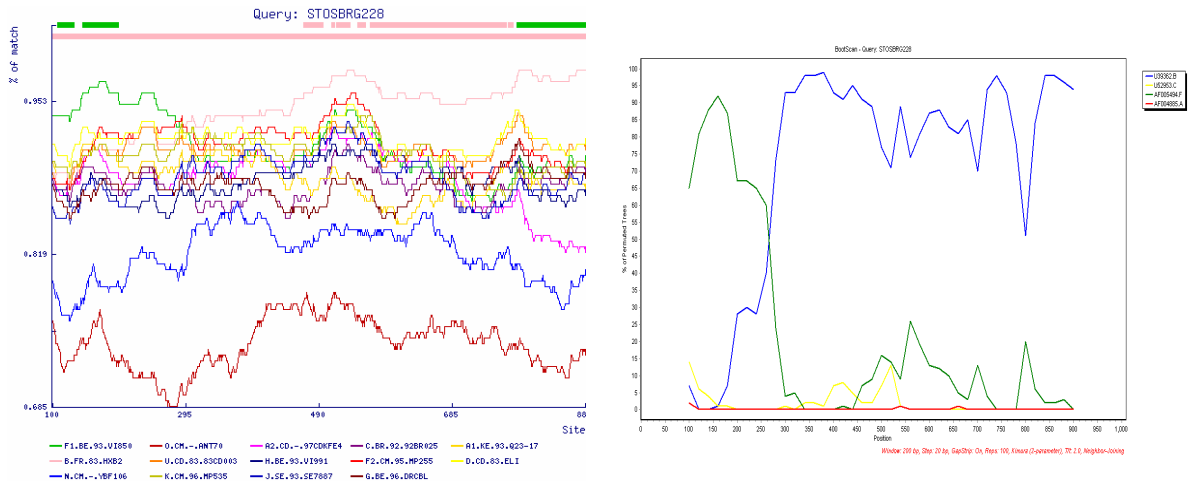
Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 13 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 1 (Paciente 43).



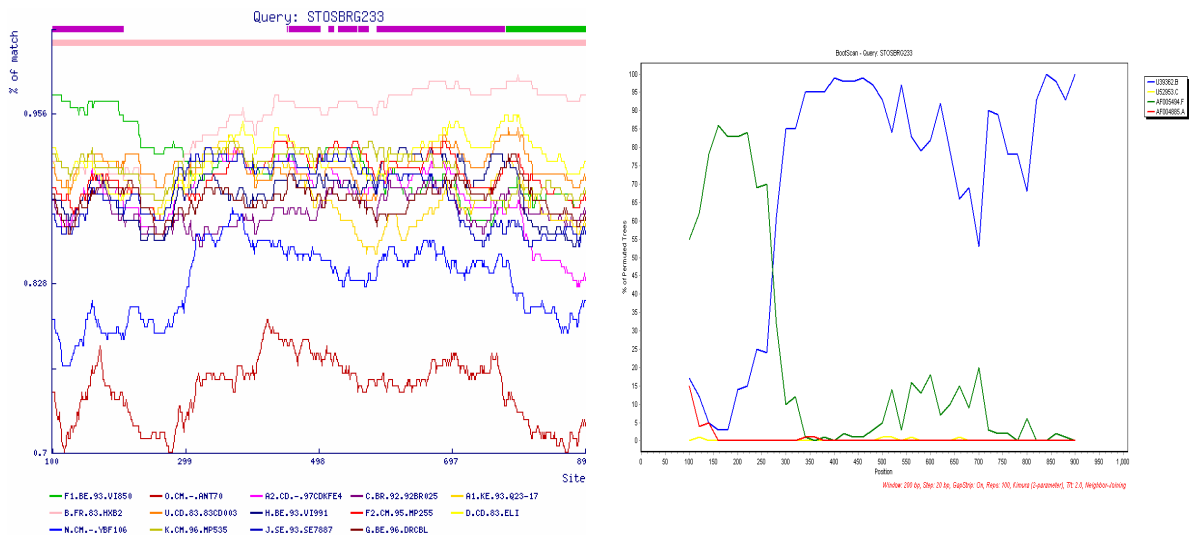
Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 14 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 2 (Paciente 04).



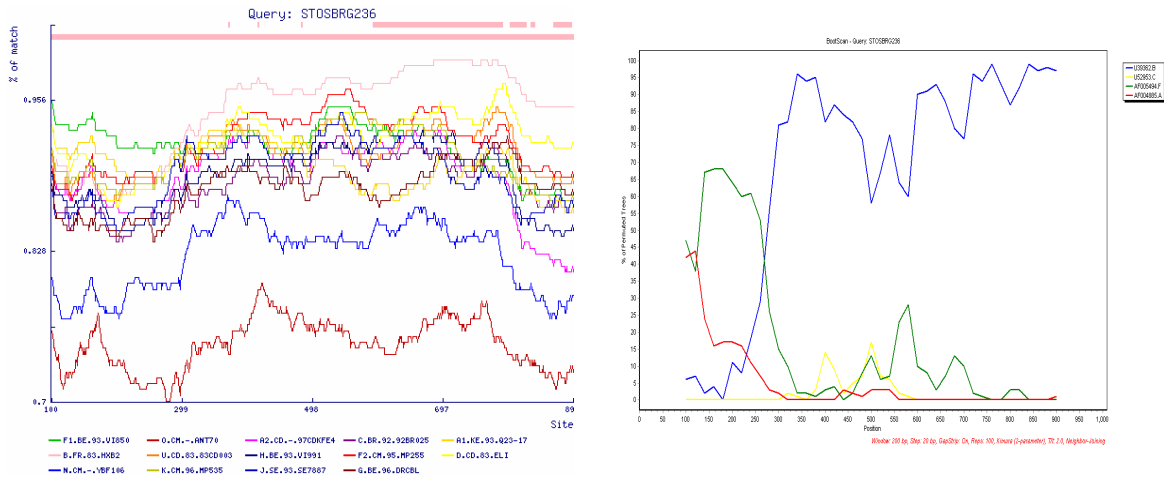
Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 15 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 2 (Paciente 07).



Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 16 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 2 (Paciente 28).



Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 17 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 2 (Paciente 33).



Fonte: *Simplot*, *RIP - Recombinant Identification program* (<http://hiv-web.lanl.gov>) e *Bootscan*.
 Figura 18 - Identificação de recombinantes intersubtipos F/B Grupo 2 (Paciente 36).

5 DISCUSSÃO

A introdução dos Inibidores de Protease a partir do início de 1996 em nosso país, e final de 1995 nos Estados Unidos da América, trouxe uma euforia sem precedentes na comunidade científica mundial, que rapidamente se transferiu para a população e principalmente aos portadores da infecção pelo HIV -1 bem como para os indivíduos que viviam com um comportamento de risco para aquisição da infecção pelo HIV - 1. Vislumbrou-se a possibilidade de erradicação da infecção pelo HIV desde que se mantivesse a Carga Viral indetectável por um período inicial de três anos (HO,1995).

Esta euforia seguiu-se de uma diminuição surpreendente do número de novos casos de Aids em todos os países onde foi disponibilizado a medicação antirretroviral denominada de *HAART* ou coquetel; esta situação, contudo associada a diversas dificuldades em se monitorar a infecção pelo HIV – 1 no que se refere a sua incidência bem como a ausência de notificação de caso de infecção assintomática pelo HIV trazem um importante viés e uma compreensão irreal da verdadeira dimensão da doença em uma comunidade (CASEIRO, 2001).

Um dos objetivos deste trabalho foi justamente tentar apresentar, a realidade dos pacientes que tem sido diagnosticado na rede municipal de Santos e encaminhado para o Centro de Referência em Aids de Santos – Craids, para saber como os pacientes estão imunologicamente no momento em que é diagnosticado como soropositivo para HIV, dando início ao tratamento, e utilizando os exames de monitoramento da doença, contagem de linfócitos TCD4+ e Carga Viral. Vale ressaltar que Santos foi pioneiro em praticamente todas as ações de combate à aids, e por esse atrevimento os erros e acertos no tratamento são mais intensos que outros centros.

Segundo dados do último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, a cidade de Santos passou de 1ª cidade com maior coeficiente de prevalência de Aids até 1997, para a 13ª atualmente; Estes dados apesar de estarem subestimados no que se refere a discordância dos dados do Ministério com os dados do boletim epidemiológico local, mostram claramente uma tendência que se iniciou em nossa cidade já em 1989, com a organização de um Centro de Referência em Aids, seguido, do pioneirismo no fornecimento já neste ano da única droga disponível até

então que foi o AZT. Posteriormente a introdução de quimioprofilaxia, em indivíduos com TCD4+ abaixo de 200 células/ μ L, após a introdução em nosso serviço de um citometro de fluxo em 1993 para a contagem das subpopulações de linfócitos TCD4+/TCD8+, já se mostrou efetivo em diminuir a mortalidade e o coeficiente de prevalência, que pode ser observado a partir de 1994.

O passo certamente decisivo para a queda mais significativa tanto da mortalidade, quanto da incidência de casos de Aids, foi o pioneirismo em nossa cidade, no diagnóstico, acompanhamento e fornecimento gratuito dos Inibidores de Proteases a partir de fevereiro de 1996.

Ao avaliar os pacientes (N=315) virgens de tratamento antirretrovirais que foram matriculados no período de 2000 e 2001 no CRAIDS, a contagem média das células TCD4+ foi de 320 células/ μ L, com variação entre (1 – 1851) células/ μ L, a contagem de células TCD4+ segundo o sexo variou entre (1 – 1070) células/ μ L com uma média de 417 células/ μ L para o sexo feminino e entre (5 – 1851) células/ μ L com uma média de 328 células/ μ L para o sexo masculino (Gráfico 1).

Destes pacientes 98 (31%) tinham TCD4+ menor que 200 células/ μ L, 69 (22%) TCD4+ entre 200 e 350 células/ μ L; 57 (18%) TCD4+ entre 350 e 500 células/ μ L e 91 (29%) com TCD4+ acima de 500 células/ μ L, mostrando a importância do diagnóstico precoce (Gráfico 4).

Em relação a carga viral a média foi de 180.000 cópias/mL, variando entre (< 50 à 4.700.000) cópias/mL e o “Log” médio foi de 4,28 variando entre (0 à 6,67) (Gráfico 2), a carga viral segundo o sexo variou entre (< 50 à 4.700.000) com uma média de 151.000 cópias/mL para o sexo feminino e entre (< 50 à 4.200.000) com uma média de 163.000 cópias/ml para o sexo masculino.

Ainda referente a quantificação da carga viral pudemos avaliar que 40,2% estavam, acima de 30.000 cópias/mL e 22% maior que 100.000 cópias/mL, justificando ainda mais o diagnóstico precoce na população de risco.

Com os dados apresentados, verificamos uma grande diferença de efetividade, na manutenção da indetectabilidade destes pacientes quando comparada com outros protocolos. Deve ser levado em consideração, as características do Centro de Referência em Aids de Santos – CRAIDS, Unidade de Saúde Pública, de atenção secundária, com financiamento tri-partite (União, Estado e Município), que efetua atendimento de livre demanda com campanhas de

prevenção; não invalida o esforço das equipes que trabalham no combate a Aids em conscientização do diagnóstico precoce.

Com a introdução da terapia *HAART*, vários estudos descrevem a prevalência de cepas resistentes aos ARVs em indivíduos recém infectados e virgens de tratamento. Na Suíça observou-se uma variação entre 5 – 10% (YERLY *et al.* 1999; YERLY *et al.*; 2001), na França a prevalência varia entre 8 – 17%, (TAMALET *et al.*, 2000; HARZIC *et al.*, 2002), na Alemanha 13% (DUWE *et al.*, 2001), na Inglaterra 14% (UKCollaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance, 2001), na Espanha 23 – 26% (BRIONES *et al.*, 2001) e nos EUA 15 – 29% (BODEN *et al.*, 1999; BRENNER *et al.*, 2000; MACHADO *et al.*, 2002). GRANT *et al.*, 2002, mostraram que no estado da Califórnia (EUA) está ocorrendo um acréscimo na resistência aos inibidores de transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN) em indivíduos recém infectados, e que ainda é rara a presença de cepas resistentes às três classes de ARVs. LITTLE *et al.*, 2002 por sua vez, estudaram amostras de indivíduos recém infectados de várias cidades dos EUA, detectaram um aumento de cepas resistentes aos ARVs ao longo do tempo, concluindo que o teste para detecção de resistência (genotípica ou fenotípica) aos ARVs em pacientes recém infectados passa a ser recomendado antes do início do tratamento.

Quando são estudados indivíduos portadores crônicos ainda virgens de tratamento, a prevalência de cepas resistentes diminui para 5 – 7% no EUA (BRENNER *et al.*, 2000; WEINSTOCK *et al.*, 2000) e para 12 – 17% na Espanha (GOMES-CANO *et al.*, 1998; PUIG *et al.*, 2000) devido à possível reversão das mutações relacionadas à resistência aos ARV que seriam substituídas ao longo do tempo por códons de cepas virais do tipo selvagem, posto que estas últimas apresentam maior *fitness* na ausência de ARVs. No Brasil foi descrita baixa prevalência de resistência aos ARVs em indivíduos que ainda não iniciaram o tratamento (menos de 5%) (BRINDEIRO *et al.*, 1999; TANURI *et al.*, 1999).

Estudos retrospectivos em amostras de doadores de sangue do Rio de Janeiro e São Paulo, realizados nos anos de 1998 e 1995/1996 mostraram que a prevalência de resistência primária aos ARVs, quando detectada, era muito baixa (BARRETO, 2001; DUMANS *et al.*, 2002), sendo detectada por sua vez, alta prevalência de mutações associadas à resistência aos ARVs em indivíduos com falha virológica aos ARVs (SUCUPIRA *et al.*, 2001).

Neste estudo detectamos a presença de cepas portadoras de mutações em que acarretaram a diminuição de susceptibilidade aos ARVs. Ao avaliarmos as mutações de resistência relacionadas com os códons mais freqüentes do HIV - 1 nos pacientes do grupo 1 e 2 (N=80), (tabelas 10 e 12), foram identificadas nos testes de resistência genotípica, 41 mutações, sendo 20 (25%) para **ITRN** (Códons = M184V, T69N, K70R, T125D/E, T69F/I/L, K70N, V75M, T215S, M41W, K219N), 17 (21,2%) para **ITRNN** (Códons = K103N, P225H, V108I, Y181V, Y188L, Y181C) e 4 (5%) para **IP** (Códons = L10V, M46L, A71V).

Ao compararmos o padrão de resistência aos ARVs dos pacientes do grupo 1 e 2, os paciente do grupo 1 no momento virgem de tratamento o fato de 21 pacientes (48,8%) apresentavam resistência primária, que em seguida iniciaram o tratamento com as combinações de drogas ARVs: AZT+3TC+NVP (9; 20,9%), AZT+3TC+EFV (11; 25,5%), d4T+3TC+EFV (6; 13,9%) d4T+3TC+NVP (1; 2,3%), AZT+3TC+NFV (6; 13,9%), AZT+3TC+IDV (2; 4,6%), d4T+3TC+NFV (1; 2,3%), AZT+3TC+ABC (1; 2,3%) e d4T+3TC+IDV ou SQV ou RTV (6; 13,9%), não conseguiram com que a carga viral atingisse níveis indetectáveis na coorte estudada (Tabela 11), devido principalmente as mutação do códon M184V 9 (20,9%) IRTN, K103N 7 (16,2%) ITRNN, destacando resistência ao 3TC (Lamivudina), NVP (Nevirapina) e EFV (Efavirenz), respectivamente.

Já o grupo 2 no momento virgem de tratamento tivemos 6 pacientes (16,2%), que em seguida iniciaram o tratamento com as combinações de drogas ARVs: AZT+3TC+NVP (8; 21,6%), AZT+3TC+EFV (10; 27%), d4T+3TC+EFV (3; 8,1%) d4T+3TC+NVP (3; 8,1%), AZT+3TC+NFV (1; 2,7%), AZT+3TC+IDV (1; 2,7%), d4T+3TC+NFV (2; 5,4%), AZT+3TC+ABC (1; 2,7%), d4T+3TC+IDV ou SQV ou RTV (7; 18,9%) e AZT+ddl+IDV ou SQV (1; 2,7%), conseguiram com que a carga viral atingisse níveis indetectáveis até 9 meses de tratamento (Tabela 11). Mas algumas mutações como M184V 2 (5,4%) IRTN e K103N 1 (2,7%) IRTNN, alguns pacientes que estavam indetectáveis após 9 meses de tratamento voltaram a ter uma ligeira viremia mostrando nitidamente que para os pacientes que iniciaram a combinação de um ITRN como 3TC (Lamivudina) ou NVP (Nevirapina) e EFV (Efavirenz) para IRTNN, se mantiveram com a carga viral < 50 cópias/mL por algum tempo, mas em seguida falharam o tratamento.

Um estudo recente realizado na cidade de Santos: *Identification of Two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil* (SA FILHO *et al*; 2006), foi

possível comprovar duas novas formas recombinantes circulantes CRF 28 e 29 do HIV - 1, mostrando a importância de pesquisas epidemiológicas detalhadas. Em termos globais estima-se que pelo menos 10% dos isolados do HIV -1 em circulação sejam recombinantes entre diferentes subtipos.

BRINDEIRO *et al.*, 2002 detectaram nas amostras de CTAs de vários estados brasileiros uma prevalência menor que aqui descrita, lembrando que na cidade de Santos, o programa de Aids foi pioneira na introdução de ARVs no sistema público para a sua população e em nenhum momento anterior foi realizado pelo programa Nacional de DST-AIDS do Ministério da Saúde. Hoje a cidade de Santos é considerada um grande centro urbano localizado muito próximo do epicentro da epidemia no Brasil (cidade de São Paulo) e os dados obtidos neste estudo vem justificar e entender porque nesta região a resistência aos ARVs está sendo detectada em índices mais elevados (SUCUPIRA *et al.*, 2002).

6 CONCLUSÕES

1 – A determinação da contagem das subpopulações dos linfócitos TCD4+ e a quantificação da Carga viral do HIV – 1 representam a pedra angular no acompanhamento, estadiamento e a avaliação da resposta terapêutica dos antirretrovirais nestes pacientes;

2 – Devemos considerar também que a determinação da contagem das subpopulações dos linfócitos TCD4+ é um indicador do estágio evolutivo da doença, bem como o determinante fundamental na introdução da terapêutica antirretroviral;

3 – Avaliar as condições imunológicas dos pacientes recém diagnosticados, que chegam ao serviço de referência em Aids de Santos, é de grande valia, no momento que inicia o tratamento médico, sendo justificado pelos resultados apresentados, no qual destacamos que 53% dos pacientes tinham contagem de TCD4+ menor que 350 células/ μ L do total estudado (N=315), indicando uma imunossupressão, mostrando nitidamente a importância do diagnóstico precoce pelo HIV-1, sabendo que, segundo os critérios do Consenso Nacional Brasileiro de tratamento para a infecção pelo vírus HIV-1, os mesmos já deveriam estar fazendo o uso de medicações antirretrovirais;

4 – Quando analisamos a resistência primária dos pacientes do Grupo 1 (N=43) 21 (48,8%) comparada com o Grupo 2 (N=37) 6 (16,2%), ao longo de 48 semanas concluímos que os pacientes do grupo 1 por apresentarem maior prevalência de mutações relacionadas à resistência aos fármacos antirretrovirais prescritos, eles não conseguiram atingir os níveis de quantificação de carga viral abaixo de 50 cópias/mL, isto é a carga viral se manteve detectável após seis meses de tratamento, até final do estudo;

5 – Referente as classes dos medicamentos antirretrovirais, os pacientes do grupo 1 e 2 apresentaram resistência de 16.2% aos IRTNN; 20% aos IRTN e 2,5% aos IP. Quanto a resistência de pelo menos duas classes de ARVs (IRTNN e IRTN) foram 5% e não foi observado nenhum paciente resistente as três classes de ARVs;

6 – Na determinação da prevalência dos subtipos do HIV – 1 baseada nas seqüências do gene *pol*, a classificação filogenética das seqüências puras foi de 80% do subtipo B e 7,5% F. Quanto as seqüências recombinantes B/F foi de 12,5% mostrando uma preocupação epidemiológica na cadeia de transmissão, porque essas cepas recombinantes estão infectando novos indivíduos e predominando nos pacientes recém diagnosticados;

7 – Não foram encontradas diferenças significativas basais observadas na carga viral e níveis de TCD4+ com relação aos antirretrovirais utilizados ou a demografia entre os 2 grupos, pacientes portadores de vírus resistentes e tipo selvagem.

8 – A prevalência de 33,7% de resistência primária aos antirretrovirais entre os pacientes foi considerada extremamente elevado nesta região, portanto, em regiões atípicas como a cidade de Santos, seria de grande valia apoiar o conceito de realizar exame de genotipagem antes de iniciar o tratamento antirretroviral, fato fundamental, efetivo e econômico para o serviço público, embora alguns indivíduos com resistência primária têm conseguido uma supressão viral empírica sob *HAART*, a estreita associação entre a resistência primária e falência virológica pode sugerir que essa resistência dificulte gradativamente a atividade dos antirretrovirais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMIKU, A. G. et al. Subgroup G mv type 1 isolates from Nigeria. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 10, p. 1581-3, 1994.
- ABRAMS, D. I. et al. Persistent diffuse lymphadenopathy in homosexual men: endpoint or prodrome? **Ann. Intern. Med.**, 100, p. 801-8, 1984.
- AINSWORTH, M., TEOKUL, W. Breaking the silence: setting realistic priorities for AIDS control in less-developed countries. **Lancet** 356, p. 55-60, 2000.
- ALBERT, J. et al. Rapid development of isolate-specific neutralizing antibodies after primary HIV -1 infection and consequent emergence of virus variants which resist neutralization by autologous sera. **AIDS**, 4, p. 107, 1990.
- ALDOVINI, A.; YOUNG, R. A. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. **J. Virol.**, 64, p. 1920-6, 1990.
- ALISON, M. et al. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. **Cell**, 46, p. 63-4, 1986.
- ALKHATIB, G. et al. cc CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV -1. **Science**, 272, p. 1955-8, 1996.
- ANCELLE, R. et al. Long incubation period for mv-2 infection. **Lancet**, 1, p. 688-9, 1987.
- AQUARO, S. et al. - Clinical implications of HIV dynamics and drug resistance in macrophages. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, 12 (1-2 Suppl), p. 23-27. 1998.
- ARMSTRONG, J. A. et al. Follicular dendritic cells and virus like particles in AIDS-related lymphadenopathy. **Lancet**, 2, p. 370-1, 1984.
- ARYA, S. K. et al. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). **Science**, 229, p. 69-73, 1985.

ARYA, S. K.; GALLO, R. C. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type m: immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83, p. 2209-13, 1986.

BACHMANN, M. H. et al. WHO NETWORK FOR HIV ISOLATION AND CHARACTERIZATION. Rapid genetic characterization of HIV type 1 strains from four World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites using a heteroduplex mobility assay. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 10, p. 1345-1353, 1994.

BALL, J.K. et al. Genomic variation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): molecular analyses of HIV-1 in sequential blood samples and various organs obtained at autopsy. **J. Gen. Virol.**, 75, p. 67-79, 1994.

BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. **Nature**, 226, p. 1209-11, 1970.

BARBOUR, J. D., HECHT, F.M., WRIN, T., et al. Persistence of primary drug resistance among recently HIV – 1 infected adults. **AIDS**, 18, p. 1683-89, 2004.

BARKER, E; BARNETT, W. S.; STAMATATOS, L and Levy. **A. J. The human Immunodeficiency viruses**, in: *The Retroviridae*, vol. 4 (J. A. Levy, ed.), 1-13, Plenum Press, New York, 1995.

BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T -lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, 220, p. 868-871, 1983.

BARRÉ-SINOUSSE, F., CHERMAN, J.C., REY, F. et al. Isolation of a Tlymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, 220, p. 868-871, 1983.

BEDINGER, P. et al. Internalization of the human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4. **Nature**, 334, p. 162-5, 1988.

BENN, S. et al. Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. **Science**, 230, p. 949-51, 1985.

BJORNDAL, A. et al. Phenotypic characteristics of human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates of Ethiopian AIDS patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, 15(7), p. 647-53, 1999.

BLACKARD, J. T. et al. Transmission of human immunodeficiency type 1 viruses with intersubtype recombinant long terminal repeat sequences. **J Virol**, 254(2), p. 220-5, 1999.

BLANCHARD A. et al. Molecular evidence for nosocomial transmission of human immunodeficiency virus from a surgeon to one of his patients. **J Virol**, 72(5), p. 4537-40, 1998.

BODEN, D.; HURLEY, A.; ZHANG, L.; et al. HIV – 1 drug resistance in newly infected individuals. **JAMA**, 282, p. 1135-1141, 1999.

BOJAK, A., DEML, L., WAGNER, R. The past, present and future of HIV -vaccine development: a critical view. **Drug Discov Today** 7, p. 36-46, 2002.

Boletim Epidemiológico. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e Aids**. Ano I; No 1, 2007.

Boletim Epidemiológico. Programa Estadual de DST/Aids. **Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo**, 2007.

BONGERTZ, V.; BOU-HABIB DC.; BRIGIDO, L. F.; et al. HIV – 1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV – 1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. **J Acquir Immune Defic Syndr**; 23, p. 184-93, 2000.

BONHOEFFER, S.; COFFIN, J.M.; NOWAK. M. Human immunodeficiency virus load. **J. Virol.**, 71 (4), p. 3275-3278, 1999.

BOOM, R., et al. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids, **J Clin Microbiol**; 28, p. 495-503, 1990.

BOUR, S.; GELEZIUNAS, R.; WAINBERG, M. The Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV -1) CD4 Receptor and Its Central Role in Promotion of HIV -1 Infection. **Microb. Reviews**, 59, p. 63-93, 1995.

BRENNER, B.; WAINBERG, M. A.; SALOMON, H.; et al. Resistance to antiretroviral drugs in patients with primary HIV – 1 infection. Investigators of the Quebec Primary Infection Study. **Int. J. Antimicrob Agents**, 16, p. 429-434, 2000.

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**.17, p. 1063-1069. 2003.

BRINDEIRO, R.; VANDERBORGHT, B.; CARIDE, E.; *et al.* Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. **Antimicrob Agentes Chemother**; 43, p. 1674-1680, 1999.

BRIONES, C.; PEREZ-OLMEDA, M.; ROBRIGUEZ, C.; *et al.* Primary genotypic and phenotypic HIV – 1 drug resistance in recent seroconverters in Madrid. **J. Acquir Immune Defic Syndr**, 26, p. 145-150, 2001.

BROWN, J.A.; HOWCROFT, T.K.; SINGER, D. S. -HIV Tat protein requirements for transactivation and repression of transcription are separable. **J. Immun. Syndr. Hum. Retrovir.**, 17 (1), p. 9-16, 1998.

BROWN, P. O. *et al.* Correct integration of retroviral in vitro. **Cell**, 49, p. 349-56, 1987.

BROWN, P. O. Integration of retroviral DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 157, p. 19-48, 1990.

BROWN, P. O.; BOWERMAN, B.; VARMUS, H. E.; BISHOP, J. M. Retroviral integration: Structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the IN protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86, p. 2525-9, 1989.

BRYANT, M. L. *et al.* Textbook of Immunology-An Introduction to Immunochemistry and Immunobiology, **St Luis, CV Mosby**, 1988.

CAMAUR, D.; TRONO. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. **J. Virol.** 70, p. 6106-6111, 1996.

CANN, A. J.; KARN, J. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life cycle. **AIDS**, 3, p. S19-S34, 1989.

CAO, J.; *et al.* Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. **J. Virol.**, 67, p. 2747-2755, 1993.

CARIDE, E, BRINDEIRO, R., HERTOGS, K. et al. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. **Virology**, 275, p. 107-115, 2001.

CARRILO, A.; RATNER, L. Cooperative effects of the human immunodeficiency virus type 1 envelope variable loops V1 and V3 in mediating infectivity for T - cells. **J. Virol.**, 70, p. 1310-1316, 1996b.

CARRILO, A.; RATNER, L. Human Immunodeficiency Virus Type 1 tropism for T - Lymphoid Cell Lines: Role of the V3 Loops and C4 Envelope Determinants. **J. Virol.**, 70, p. 1301-1309, 1996a.

CARVALHO, H. B.; MESQUITA, F.; MASSAD, E. *et al.* HIV and infections of similar transmission patterns in a drug injectors community of Santos, Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** 12, p. 84-92. 1996.

CASEIRO, M. M.; Prevalência e Incidência da Infecção pelo HIV – 1 no período de 1995 a 2000 e Resistência Genotípica Primária aos Antriretrovirais no Centro de Testagem Anônima para o HIV – 1 do Município de Santos – SP. **Tese de Doutorado em Infectologia, apresentado na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)**, 2001.

CASSEB, J., HONG, M. A., GONSALEZ, C. et al. Two variants of HIV-1 B serotype are transmitted heterosexually in São Paulo, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 31, p. 1243-1246, 1998.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. mv-1 transmission between two brothers with hemophilia. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 42, p. 948-51, 1983.

CENTER FOR DISEASES CONTROL. Immunodeficiency among female sexual partners of male with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 31, p. 697-8, 1983.

CENTER FOR DISEASES CONTROL. Possible transfusion associated acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 31, p. 652-4, 1982.

Chaix, M. L., M. Harzic, B. Masquelier, I. Pellegrin, L. Meyer, D. Costagliola, C. Rouzioux, and F. Brun-Vezinet. Prevalence of genotypic drug resistance among

French patients infected during the year 1999. Program and abstracts of the **8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections**. Chicago, Illinois. Abstract 755, 2001.

CHANG, S. Y. P. et al. The origin of HIV-1 isolate HTLV-III. **Nature**, 363, p. 466-9, 1993.

CHEINGSONG-POPOV, R. et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 subtypes and their distribution in the Commonwealth of Independent States (former Soviet Union) by serologic V3 peptide binding assays and V3 sequence analysis. **J. Infect. Dis.**, 168, p. 292-297, 1993.

CHEN, S. T. L. Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. **J. Virol.**, 68, p. 2002-2010, 1994.

CHEN, Z. et al. Three dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. **J. Biol. Chem.**, 270 (37), p. 21433- 21436, 1995.

CHENG-MAYER, C.; LEVY, J. A. Human immunodeficiency virus infection of the CNS characterization of "neurotropic" strains. **Curr Top Microbiol Immunol** 160, p. 145, 1990.

CLAPHAM, P. R. HIV and Chemokines: ligands sharing cell-surface receptors. **Trends Cell Biol.**, 7, p. 264-268, 1997.

COCCHI, F. et al. MIP -1 alpha and MIP -1 beta as the major HIV -suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270, p. 1811-1815, 1995. COFFIN, JM. -HIV viral dynamics **.AIDS**, 10(suppl3), p. S75-S84, 1996.

COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 267, p. 483-489, 1995.

COFFIN, J. M., HAASE, J. A., MONTANIER, L. et al. What to call the AIDS virus? **Nature**, 321, p. 10, 1986.

COFFIN, J.; HAASSE, A.; LEVY, J. A.; MONTAGNIER, L.; OROSZLAN, S.; TEICH, N. and TEMIN, H. Human immunodeficiency viruses. **Science**. 232, p. 97. 1986.

COFFIN, J.M. Retroviridae and their replication. In: FIELDS, N.; KNIPE, D.M.-
Fundamental Virology. **Raven Press, NewYork**, p.645 1991.

COHEN, C. HUNT, S., SESION, M. et al. A randomized trial assessing the impact of
phenotypic resistance testing on antiretroviral therapy. **AIDS** 16, p. 579-88, 2002.

COHEN, J. AIDS research: debate begins over new vaccine trials. **Science**
293(5537), p. 1973, 2001.

COLLINS, J.R.; ERICKSON, J.W. Flap opening in HIV -1 protease simulated by
"activated" molecular dynamics. **Nat. Struct. Biol.**, 2, p. 334-338, 1995.

CONDRA, J.H. et al. In vivo emergence of HIV -1 variants resistant to multiple
protease inhibitors. **Nature**, 374, p. 569-571, 1995.

CONSTANTINE, N.T., Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of
evolution. **AIDS**, 7, p. 1-13, 1993.

CORNELISSENS, M., BURG, R. V. D., ZORGDRAGER, F. et al. Pol Gene diversity
of five human immunodeficiency virus type 1 subtypes: Evidence for naturally
occurring mutations that contribute to drug resistance, limited recombination patterns
and common ancestry for subtypes B and D. **J Virol**, 71(9), p. 6348-358, 1997.

COUTO-FERNANDEZ, J. C., MORGADO, M.G., BONGERTZ, V. et al. HIV – 1
subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic
characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr** 22, p. 288-293, 1999.

COUTURIER, E., DAMOND, F., ROQUES, P. et al. HIV – 1 diversity in France, 1996
– 1998. **AIDS**, 14, p. 289-296, 2000.

COVAS, D. T., BISCARO, T. A., KASHIMA, S. et al. High frequency of the GWG (Pro
Trp) envelope variante of HIV – 1 in Southeast Brazil. **J Acquir Immune Defic
Syndr Hum Retrovirol**, 19, p. 74-99, 1998.

DAVEY, R. T. Jr., CHAITT, D.G. REED, G. F. et al. Randomized. Controlled phase
I/II, trial of combination therapy with delavirdine (U-90152S) and convention
nucleosides in human immunodeficiency virus type 1 – infected patients. **Antimicrob
Agents Chemother**, 40, p. 1657-1664, 1996.

DE ANTONI, A.; FOLI, A.; LISZIEWICZ; LORI, F. Mutations in the po/gene immunodeficiency virus type 1 in infected patients receiving didanosina and hydroxyurea combination therapy. **J. Infect. Dis.**, 176, p. 899-903, 1997.

DE CLERQ E. Molecular targets for antiviral agents. **J Pharmacol Exp Ther** 297, p. 1-10, 2001.

DE PASQUALE, M.P.; MURPHY, R.; KURITZEKES, D. Resistance during early virological rebound on amprenavir plus zidovudine plus lamivudine triple therapy or amprenavir monotherapy in ACTG protocol 347 [**Abstract 71**]. **Antiviral Therapy**, 3 (suppl1), p. 50, 1998.

DEEKS S. G. Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Resistance. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome** 26, p. S25-S33, 2001.

DEEKS, S. G. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. **J. Acquir Immune Defic Syndr**, 26 Suppl 1, p. S25-33, 2001.

DELGADO E, LEON-PONTE M, VILLAHERMOSA ML, CUERVAS MT, DEIBIS L, ECHEVERRIA G, *et al.* Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: a UNAIDS study. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 17, p. 753-758, 2001.

DELWART, E. L. et al. Human immunodeficiency virus type 1 evolution in vivo tracked by DNA heteroduplex mobility assays. **J. Virol.**, 68 (10), p. 6672-6683. 1994.

DELWART, E. L. et al. Rapid molecular epidemiology of human immunodeficiency virus transmission. **AIDS Res Hum Retrovirois**, 11, p. 1081-1 093, 1995.

DELWART, E. L. et al. Rapid. transient changes at env locus of plasma human immunodeficiency virus type 1 populations during the emergence of protease inhibitor resistance. **J. Virol.**, 72, p. 2416-2421, 1998.

DELWART. E.L. et al. Genetic relationships determined by a DNA mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. **Science**, 262; 1257-1261, 1993.

DEVEREUX, H. L., YOULE, M., JOHNSON, M. A., et al. Rapid decline in detectability of HIV – 1 drug resistance mutations after stopping therapy. **AIDS**, 13, p. F123-127, 1999.

DIAZ, R. S. Guia para o manuseio de testes de resistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV – 1. **Abbott Virologia**, 2004.

DIAZ, R. S., ZHANG, L., BUSCH, M.P. et al. Divergence of HIV – 1 quasispecies in an epidemiologic cluster. **AIDS**, 11, p. 415-422, 1997.

DOMINGO, E. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annu Rev Microbiol** 51, p. 151-178, 1997.

DULIOUST, A. et al. Constrained evolution of human immunodeficiency virus type 1 protease during sequential therapy with two distinct protease inhibitors. **J. Virol.**, 73 (1), p. 850-854, 1999.

DUWE, S.; BRUNN, M.; ALTMANN, D. et al. Frequency of genotypic and phenotypic drug-resistant HIV – 1 among therapy-naive patients of German Seroconverter Study. **J. Acquir Immune Defic Syndr**, 26, p. 266-273, 2001.

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

FAUCI, A. S. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. **Ann. Intern. Med.**, 114, p. 678-693, 1991.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**. 39, p. 783-791. 1995.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies from molecular sequences. **Annu. Rev. Genet.**, 22, p. 521-565, 1988.

FISCHL, M. A., RICHMAN, D. D., GRIECO, M. H... et. al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex: a double-blind placebo-controlled trial. **N Engl J Med** 317, p. 185-197, 1987.

FLORES, I., PIENIAZEK, D., MORAN, N. et al. HIV – 1 subtype F and dual infections in Puerto Rico: a potencial sentinel site for monitoring novel genetic HIV variants in North America. **Emerg Infect Dis** 5, p. 481-483, 1999.

FOX, C. H., COTTLER-FOX, M. The pathobiology of HIV infection. **Immunol. Today** 13, p. 353, 1992.

FRANCIS, D. P., GREGORY, T., McELRATH, M. J. et al. Advancing AIDSVAX to phase 3. Safety, immunogenicity, and for phase 3. **AIDS Res Hum Retroviruses** 14 (Suppl. 3), p. S325-331, 1998.

FREED, E. O.; MARTIN, M. A. Evidence for a Functional Interaction between the V1N2 and C4 Domains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp120. **J. Virol.**, 68, p. 2503-2512, 1994.

GAGLIANI L. H., Perfil Imunológico e Viroológico dos Pacientes Recém Diagnosticados pelo HIV -1 Atendidos no Centro de Referência em Aids de Santos no Período de 2000 à 2001, São Paulo – Brasil. **Dissertação de Mestrado em Ciências da Saúde, apresentada no Centro Universitário Lusíada, UNILUS, 2004.**

GAINES, H., VON SIDOW, M. A. E., VON STEDINGK, L. V. et. al. Immunobiological changes in primary HIV – 1 infection. **AIDS**, 4, p. 995, 1990.

GALVÃO-CASTRO, B., COUTO-FERNANDEZ, J. C., MELLO, M.A. et al. A nationwide effort to systematically monitor HIV – 1 diversity in Brazil: preliminary results. Brazilian Network for the HIV – 1 Isolation and Characterization. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 91, p. 335-338, 1996.

GALVÃO-CASTRO, B., GRECO, D., GUIMARÃES, M. L. et al. HIV – 1 diversity in Brazil, biological and immunological characterization of HIV – 1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. **J AIDS** 23, p. 184-193, 2000.

GOMES-CANO, M., A. Rubio, T. Puig, M. Perez-Olmeda, L. Ruiz, V. Soriano, J. A. Pineda, L. Zamora, N. Xaus, B. Clotet, and M. Leal. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues in antiretroviral-naive and antiretroviral-experienced HIV -Infected patients in Spain. **AIDS** 12, p. 1015-1020, 1998.

GRANATO, C F. H. Diagnóstico Laboratorial das Infecções pelo HIV -1 e HIV-2. In: *Retrovíruses Humanas HIV/AIDS: etiologia, patogenia e patologia clínica: tratamento e prevenção*, VERONESI, R., FOCACCIA, R., LOMAR, AV. **Ed. Atheneu**, 2000.

- GRANT, R. M., HECHT, F. M., WARMEDAM, M., et al. Time trends in primary HIV – 1 drug resistance among recently infected persons. **JAMA**, 288, p. 181-188, 2002.
- GREENE, W. C. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 acid sequences infection. **N. Engl. J. Med.**, 324, p. 308, 1991.
- GUIMARÃES, M., MOREIRA, A., MORGADO, M. Molecular characterization of CTL epitopes among prevalent Brazilian HIV – 1 subtypes AIDS Vaccine 2001, **Philadelphia, PA, USA, abstract 261**, 2001.
- HANNA, G. J., JOHNSON, V. A., KURITZKES, D. R. et al. Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine and nevirapine. **J Infect Dis** 181, p. 904-911, 2000.
- HARZIC, M., PELLEGRIN, I., DEVEAU, C., et al. Genotypic drug resistance during HIV – 1 primary infection in France (1996-1999): frequency and response to treatment. **AIDS**, 16, p. 793-796, 2002.
- HEILEK-SNYDER, G., BEAN, P. Role of HIV phenotypic assays in the management of HIV infection. **Am Clin Lab** 21, p. 40-43, 2002.
- HENDRY R. M.; HANSON C. V.; BONGERTZ V.; et al. Immunoreactivity of Brazilian HIV isolates with different V3 motifs. **Mem Inst. Oswaldo Cruz**, 91, p. 347-8, 1996.
- HIRSCH, M. S., BRUN-VEZINET, F., CLOTET, B. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003. Recommendations of an International AIDS Society-USA panel. **Clin Infect Dis** 37, p. 113-128, 2003.
- HIV Molecular Immunology Database. In: KORBER, B. T. M., BRANDER, C., HAYNES, B. F., KOUPI, R. KUIKEN, C., MOORE, J. P., WALKER, B. D., WATKINS, D. (eds). Los Alamos National Laboratory: Theoretical Biology and Biophysics, **Los Alamos**, 2000.
- HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, 373, p. 123-126, 1995.
- HO, D. D. Time to hit HIV, early and hard. **N. Engl. J. Med.**, 333, p. 450-451, 1995.

HUGHESS, M. D., JOHNSON, V. A., HIRRSCH, M. S. et al. Monitoring plasma HIV – 1 RNA levels in addition to CD4+ lymphocytes count improves assessment of antiretroviral therapeutic response ACTG 241 Protocol Substudy Team. **Ann Intern Med** 126, p. 929-938. 1997.

HWANG, S. S., BOYLE T. J., LYERLY, H. K., CULLEN, B. R. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV – 1. **Science** 253, p. 71-4, 1991.

JACOBSEN. H. et al. Characterizatiion of human immunodeficiency virus type 1 mutants with decreased sensitivity to proteinase inhibitor Ro 31-8959. **Virology** 206, p. 527-534, 1995.

JAMES, K. Immunoserology of infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev**, 3, p. 132-152, 1990.

JANNINI L. M., PIENIAZEK, D., PERALTA, J. M. et al. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. **Virus Gene** 13, p. 69-81, 1996.

JANSSEN, R.S. et al. New testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimative and prevention purposes. **JAMA**, 280 (1), p. 42-48, 1998.

JAPOUR, A. J. et al. Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37, p. 1095-1101, 1993.

JAPOUR, A. J., WELLES, S., D' AQUILA, R. et al. Prevalence and clinical significance of zidovudine resistance mutations in human immunodeficiency virus isolated from patients after long-term zidovudine treatment. AIDS Clinical Trials Group 116B/117 Study Team and the Virology Committee Resistance Working Group. **J Infect Dis** 171, p. 1172-9, 1995.

JETZ, A. E.; YU, H.; KLARMANN, G. J.; RON, Y.; PRESTON, B. D. and DOUGHERTY, J. P. High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. **J. Virol.** 74, p. 1234-1240. 2000.

KATLAMA. C. INGRAND, D. LOVEDAY, C. et al. Safety and efficacy of lamivudine-zidovudine combination therapy in antiretroviral-naive patients: a randomized controlled comparison with zidovudine. **JAMA** 276, p. 118-125, 1996

KATZENSTEIN, D. A. Viral phenotype and Genotype as Markers in Clinical Trials. *J. Acquir. Immun. Defic. Syndr. Hum. Retrovir*, 10 (Suppl.2), p. S25-S34, 1995.

KATZENSTEIN, D. A., BOSCH, R., SHAFER, R. et al. Virological response to nelfinavir, efavirenz, or both in patients with > 4 years of previous nucleoside RT inhibitors in ACTG [abstract 67]. *Antiviral Therapy* 4 (sup), p. 47, 1999.

KATZENSTEIN, T. L., NIELSEN, C., BRUUN, L. et al. Quantification of HIV – 1 RNA during antiretroviral therapy: association with viral phenotype and development of resistance. *Antivir Ther* 1, p. 246-254, 1996.

KIMURA, M. Some models of neutral evolution, compensatory evolution, and the shifting balance process. *Theor popul Biol*, 37, p. 150-158, 1990.

KLIMKAIT, T. et al. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein Vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.*, 64, p. 621-629, 1990.

KOCH, N. et al. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protease mutations in HIV -1 genomes detected in plasma and in peripheral blood mononuclear cells from patients receiving combination drug therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 37(5), p. 1595- 1597, 1999.

KOITO, A. et al. Functional Role of the V1N2 Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp120 in Infection of Primary Macrophages and Soluble CD4 Neutralization. *J. Virol.*, 68, p. 2253-2259, 1994.

KORBER, B. T. M. et al. Genetic differences between blood and brain derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1 infected patients: evidence of conserved elements in V3 region of the envelope protein of brain-derived sequences. *J. Virol.*, 68, p. 7467-7481, 1994.

KORBER. B. et al. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, **Los Alamos**, NM. p, p. 111-36 -111-79. 1998.

KORBER. B., MULDOON, M., THEILER, J. et al. Timing the ancestor of the HIV – 1 pandemic strains, *Science* 288 (5472), p. 1789-1796, 2000.

KOZAL, M.J. et al. A mutation in HIV reverse transcriptase and decline in CD4 lymphocyte numbers in long-term zidovudine recipients. *J. Infect. Dis.*, 167, p. 526-532, 1993.

KWOK, S., MACK, D. H., MULLIS, K. B. et al. Identification of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. **J Virol** 61, p. 1690-94, 1987.

LACEY, S. F.; LARDER, B. A. Novel mutation (V75T) in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confers resistance to 2'3'-dideoxythymidine in cell culture. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 38, p. 1428-1432, 1994.

LAIEZARI, J., HENRY, K., O'HEARN, M. et al. Enfuvirtide, an HIV – fusion inhibitor for drug resistant HIV infection in North and South America. **N Engl J Med** 348, p. 2175-2185, 2003.

LANE, H. C., FAUCI, A. S. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Rev Immunol** 3, p. 477, 1985.

LARDER, B. A. et al. Quantitative detection of HIV -1 drug resistance mutations by automated DNA sequencing. **Nature**, 365, p. 671-673, 1993.

LAZZARINI, A., CLOTET, B., COOPER, D. et al. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV – 1 in Europe and Australia. **N Engl J Med** 348, p. 2186-2195, 2003.

LEAL, E. S. et al. Mutations associated with drug resistance in a population of drug naive HIV -1 infected individuals. In: III **SIMPÓSIO DE PESQUISA BÁSICA EM HIV/AIDS**; Comandatuba (BA), 1999. (Abstract 85).

LEGRICE, S. F. J. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. In: SKALKA, A.M.; GOFF, S.P. Reverse Transcriptase. **Cold Spring Harbor**, New York. p.163, 1993.

LEMP, G. F., PAYNE, S. F., NEAL, D. et al. Survival trends for patients with acquired immunodeficiency syndrome. **JAMA** 236, p. 402, 1990.

LETVIN, N. L. Progress in the development of an HIV – 1 vaccine. **Science** 280, p. 1875-1880, 1998.

LETVIN, N. L., BLOOM, B. R., HOFFMAN, S. L. Prospects to protect against AIDS, tuberculosis and malaria. **JAMA** 285(5), p. 606-611, 2001

LEVY, J. A. ed. HIV and the pathogenesis of AIDS. 2.ed. Washington, **ASM Press**, 1998.

LITTLE, S. J.; HOLTE, S.; ROUTY, J. P.; et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. **N. Engl. J. Med.** 347, p. 385-394, 2002.

LITTLE, S. J.; KOELSCH, K. K.; IGNACIO, C. C.; et al. Persistence of Transmitted Drug-resistant Virus among Subjects with Primary HIV Infection Defering Antiretroviral Therapy. 11th **Conference on Retro-viruses and Opportunistic Infection**, February, poster 36 LB, 2004.

LIU, H. et al. The Vif Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1s Package into Virions and Associates with Viral Core Structure. **J. Virol.**, 69, p. 7630-7638, 1995.

LOEB, D. D. et al. Complete mutagenesis of HIV -1 protease. **Nature**, 340, p. 397-400, 1989.

LOUWAGIE, J., McCUTCHAN, F. E., PEETERS, M. et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV – 1 isolates provides evidence for multiple genotypes. **AIDS** 7, p. 769-780, 1993.

LOUWAGIE, J.; DELWART, E. L.; MULLINS, J. I.; et al. Genetic analysis of HIV – 1 isolates from Brazil reveals presence of two distinct genetic subtypes. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 10, p. 561-7, 1994.

LOVEDAY, C.; International perspectives on antiretroviral resistance. Nucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. **J. Acquir Immune Defic Syndr** 26: Suppl 1, p. S10-S24, 2001.

LUCAS, G. M., CHAISSON, R. E., MOORE, R. D. Highly active antiretroviral therapy in a large urban clinic: risk factors for virologic failure and adverse drug reactions. **Ann Intern Med** 131, p. 81-87, 1999.

MACHADO, D. M.; DELWART, E. L.; DIAZ, R. S.; et al. Use of the sensitive/less-sensitive (detuned) EIA strategy for targeting genetic analysis of HIV – 1 to recently infected blood donors. **AIDS**, 16, p. 113-119, 2002.

MALIM, M.H.; CULLEN, B.R. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: Implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. **Mol .Cell. Biol.**, 13, p. 6180, 1993.

MAMMANO, F.; PELIT, C.; CLAVEL, F.; et al. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. **J. Virol** 72, p. 7632-7637, 1998.

MANDELL G. L. **Principles and Practice of Infectious Diseases**, New York: Churchill Livingstone: 2000.

MANSKY, L. M.; TEMIN, H. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. **J. Virology**, 69, p. 5087-5094, 1995.

MANUAL DE CONTAGEM DOS LINFÓCITOS T CD4+. **Coordenação Nacional de DST e AIDS**, Brasília: Ministério da Saúde, 1998.

MANUAL DE TREINAMENTO NASBA-AMPLIFICATION SYSTEM. **Coordenação Nacional de DST e AIDS**, Brasília: Ministério da Saúde, 1996.

MARLINK, R. et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infections as compared to HIV-1. **Science**, 265, p. 1587-1590, 1994.

MARTINS, L. P., CHENCIENER, N., ASJO, B. et al. Independent fluctuation of human immunodeficiency virus type 1 rev and gp 41 quasispecies in vivo. **J Virol** 65, p. 4502-4507, 1991.

MAXAM, A.M.; GLIBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74 (2), p. 560-664, 1977.

MAYERS, D. L. et al. Dideoxynucleoside resistance emerges with prolonged zidovudine monotherapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 38, p. 307-314, 1994.

McCUTCHAN F. E. Understanding the genetic diversity of HIV -1. **AIDS**. 14Suppl3, p. S31-44. 2000.

McINTOSH, K. Antiretroviral resistance and HIV vertical transmission. **Acta Paediatr. Suppl.**, 421, p. 29-32, 1997.

MEDRANO, L.; LAHOZ, J.G. LIPA evaluation of mixtures of wild type and resistance point mutations against antiretroviral drugs in serial samples of HIV -1 proviral DNA from treated patients. In: **12TH WORLD AIDS CONFERENCE-Geneve, Switzerland.** (Abstract42198), 1998.

MELLORS, J. W. Review of Lago Maggiore resistance meeting. In: **12TH WORLD) CONFERENCE, Geneve, Switzerland,** 1998.

MELLORS, J. W., LARDER, B.A., SCHINAZI, R. F. Mutations in HIV-1 reverse transcriptase and protease associated with drug resistance. **Int. Antiviral News**, 3, p. 8-13, 1995.

MELTZER, M. S., SKILLMAN, D. R., HOOVER, D. L. et al. Macrophages and the immunodeficiency virus. **Immunol Today** 11, p. 217, 1990.

MENDONÇA, J. S. et al. Infecção associada ao HIV : quadro clínico e laboratorial. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo** 44, p. 295, 1989.

MIEDEMA, F. TERSMETTE, M., VAN LIER, R. A. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. **Immunol Today** 11, p. 293-297, 1990.

MILLER, M. D.; ANTON, K. E.; MULATO, A. S.; et al. Human immunodeficiency virus type 1 expressing the lamivudine-associated M184V mutation in reverse transcriptase shows increased susceptibility to adefovir and decreased replication capability in vitro. **J. Infect. Disc.** 179, p. 92-100, 1999.

MILLER, V., PHILLIPS, A. ROTTMANN, C. et al. Dual resistance to zidovudine and lamivudine in patients treated with zidovudine-lamivudine combination therapy: association with therapy failure. **J Infect Dis** 177, p. 1521-32, 1998.

MILLER, V.; DE BETHUNE, M. P.; KOBER, A.; et al. Patterns of resistance and cross-resistance to human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitors in patients treated with the nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor loviride. **Antimicrob Agentes Chemother** 42, p. 3129-3129, 1998.

MILLER, V.; International perspectives on antiretroviral resistance. Resistance to protease inhibitors. **J. Acquir Immune Defic Syndr** 26 Suppl 1, p. S34-50, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação **Nacional de DST e AIDS**. Recomendação para terapia anti-retroviral em adultos e adolescentes infectados pelo HIV, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e Aids**. Boletim Epidemiológico – Aids e DST, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sobrevida atual dos pacientes com aids no Brasil. Evidência dos resultados de um esforço nacional. Aumento do tempo de sobrevida das crianças com aids – Brasil. **Boletim Epidemiológico – AIDS**, Ano XV, N° 02, semanas 48^a de 2001 a 13^a de 2002, outubro 2001 a março de 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de DST e Aids**. Política Brasileira de Aids – Principais Resultados e Avanços (1994 – 2002), 2005.

MOCROFT, A., YOULE, M. MOORE, A. et al. Reasons for modification and discontinuation of antiretrovirals: results from a single treatment center. **AIDS** 15, p. 185-194, 2001.

MOORE, J. P., PERREN, P. W., BURTON, D. R. Genetic subtypes, humoral immunity, and human immunodeficiency virus 1 vaccine development. **J Virol** 75, p. 5721-5729, 2001.

MOORE, R. D., FORTGANG, I., KERULY, J., CHAISSON, R. E. Adverse events from drug therapy for human immunodeficiency virus disease. **Am J Med** 101, p. 34-40, 1996.

MORGADO, M. G. GUIMARÃES, M. L., GALVÃO-CASTRO, B. HIV – 1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97, p. 143-150. 2002.

MORGADO, M. G., GUIMARÃES, M. L., GRIPP, C. B. G. et al. The hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. High prevalence of HIV – 1 subtype B and identification of an HIV subtype D infection in the City of Rio de Janeiro, Brazil. **J AIDS Hum Retroviruses** 18, p. 488-194, 1998a.

MORGADO, M. G., GUIMARÃES, M. L., NEVES Jr., et al. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV – 1 subtype strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 91, p. 339-342, 1996.

MORGADO, M. G., GUIMARÃES, M. L., NEVES Jr., et al. The hospital Evandro Chagas AIDS Clinical Research Group. Polymorphism of the antigenically distinct HIV – 1 B subtype strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 93, p. 383-386, 1998b.

MORGADO, M. G., SABINO, E. C., SHPAER, E. G., et al. V3 region polymorphisms in HIV – 1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 10, p. 569-76, 1994.

MYERS, G. et al. Human retrovirus and AIDS 1994: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences, Eds. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, **Los Alamos**, NM, 1996.

NABEL, G., MAKGOBA, W., ESPARZA, J. HIV – 1 diversity and vaccine development. **Science** 296, p. 2335, 2002.

OLSHEVSKY, V. et al. Identification of Individual Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Amino Acids Important for CD4 Receptor Binding. **J. Virol.**, 64, p. 5701-5707, 1990.

PALLELA, F. J. Jr., DELANEY, K. M., MOORMAN, A. C. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advance human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med** 338, p. 853-860, 1998.

PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., FAUCI, A. S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med** 328, p. 327, 1993.

PERELSON, A. S. et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science**, 271, p. 1582-1586, 1996.

PETERLIN, B. M. Molecular biology of HIV. In: J.A.Levy (ed.), **The Retroviridae**, vol.4 Plenum Press, New York, 1995.

PIATAK, M., SAAG, M. S., YANG, L. C. et al. High levels of HIV – 1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. **Science** 259, p. 1749-1754, 1993

PIENIAZEK, D., RAYFIELD, M., HU, D. J. et al. Protease sequences from HIV – 1 group M subtypes A-H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease inhibitor-naïve individuals worldwide. HIV Variant Working Group. **AIDS** 14, p. 1489-95, 2000.

POPOVIC, M. SARNGADHANRAN, M. G., READ, E., GALLO, R. C. Detection isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. **Science** 224, p. 497-500, 1984.

POTTS, K. E., KALISH, M. L., LOTT, T. et al. The Brazilian Collaborative AIDS Research Group. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV – 1 envelope glycoprotein Brazil. **AIDS** 7, p. 1191-1197, 1993.

PRESTON, B. D. et al. Fidelity of HIV – 1 reverse transcriptase. **Science** 242, p. 1168, 1988.

PRESTON, B. D. et al. Reverse transcriptase fidelity and HIV – 1 variation. **Science** 275, p. 228, 1997.

PUIG, T. M., PEREZ OLMEDA, A., Rubio, L. Ruiz, Brones, J. M. Franco, M. Gomes-Cano, L. Zamora, C. Alvarez, M. Leal, B. Clotet, V. Soriano and the Erase-2 Stud Group. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain. **AIDS** 14, p. 727-732, 2000.

RAMOS, A., TANURI, A., SCHECHTER, M. et al. Dual and recombinant infections: an integral part of the HIV – 1 epidemic in Brazil. **Emerg Infect Dis** 5, p. 65-74, 1999.

REIS, M., et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 24, nº 2, p. 51-58, junho 1988.

RICHMAN, D. D. How drug resistance arises. **Scientific American**, 64-69, 1998.

RICHMAN, D. D. Resistance of clinical isolates of human immunodeficiency virus to antiretroviral agents. **Antimicrob Agents Chemother** 37, p. 1207-1213, 1993.

RICHMAN, D. D., BOZZETTE, S. A. The impact of the syncytium inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. **J Infect Dis** 169, p. 968-974, 1994.

RICHMAN, D. D., Principles of HIV resistance testing and overview of assay performance characteristics. **Antivir Ther** 5, p. 27-31, 2000.

ROBERTS, J. D., BEBENEK, K., KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV – 1. **Science** 242, p. 1171-1173, 1988.

ROBERTS, K. J. Barriers to and facilitators of HIV – positive patients adherence to anti-retroviral treatment regimens. **AIDS Patient Care STDs** 14, p. 155-168, 2000.

ROBERTSON D.L.; ANDERSON, J.P.; BRADAC, J. A.; et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**. 288, p. 55-6. 2000.

ROBINSON, P.; MONTANER, J.S.G. Long-term follow-up of patients treated with nevirapine (NVP)-based combination therapy within the INCAS trial. In: **12TH WORLD AIDS CONFERENCE, Geneva, Switzerland**. (Abstract 12368), 1998.

ROSENTHAL, N. Fine structure of a gene - DNA sequencing **N. Engl. J. Med.**, 332, p. 589-591, 1995.

ROSSINI M. A., DIAZ R. S., CASEIRO M. M., TURCATO G., ACCETTURI C. A., SABINO, E. C. HIV -1 subtypes among intravenous drug users from two neighboring cities in Sao Paulo State, Brazil. **Braz J Med Biol Res**. 34, p. 45-47. 2001.

RUSCONI, S., DE PASQUALE, M. P., MAININI, F. et al. Viral load, viral phenotype modification, zidovudine susceptibility and reverse transcriptase mutations during the first 6 months of zidovudine monotherapy in HIV – 1 infected people. **Antivir Ther** 1, p. 211-219, 1996.

SÁ FILHO D. J., COSTA L. J., OLIVEIRA C. F., GUIMARAES, A. P., ACCETTURI, C. A., TANURI, A., DIAZ. R. S. Analysis of the protease sequences of HIV-1 infected individuals after Indinavir monotherapy. **J Clin Virol**. 28, p. 186-202. 2003.

SÁ FILHO, D. J., GAGLIANI, L. H., SOARES, M. S., CANDIDO, V., CAVALIERE, E., DIAZ, R. S., CASEIRO, M. M. HIV Type 1 *pol* Gene Diversity and Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Santos, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 24(3), p. 347-353. 2008.

SÁ FILHO, D. J., KALLAS, E. G., SANABANI, S., SABINO, E., SUCUPIRA, M. C., SANCHEZ-ROSA, A. C., TESCAROLLO, G., TOMIYAMA, H., BASSICHETTO, K., JANINI, L. M., DIAZ, R. S. Characterization of the Full-Length Human

Immunodeficiency Vírus – 1 Genome From Recently Infected Subjects in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 23(9), p. 1087-1094. 2007.

SÁ FILHO, D. J., SANABANI, S., DIAZ R. S., 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 Sao Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 21, p. 145-151. 2005.

SÁ FILHO, D. J., SUCUPIRA, M. C., CASEIRO, M. M., SABINO, E. C., DIAZ, R. S., JANINI, L. M. Identification of Two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 22(1), p. 1-13. 2006.

SABINO, E., DIAZ, R. S., BRIGIDO, L. F., et al. Distribution of HIV – 1 subtypes seen in an AIDS Clinic in São Paulo City, Brazil. **AIDS** 10, p. 1579-84, 1996.

SABINO, E., SHPAER, E., MORGADO, M. G., et al. Identification of an HIV – 1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. **J Virol** 68, p. 6340-6346, 1994.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** 4, p. 406-425. 1987.

SALMINEN, M. O., CARR, J. K., BURKE, D. S. McCUTCHAN, F. E. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. **AIDS Research and Human Retroviruses**. 11, p. 1423-1425. 1995.

SANGER, F., NICKLEN, S, COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 74, p. 5463-5467, 1977.

SCHINAZI, R. F., LLOYD, R. T., NGUYEN, M. H. et al. Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37, 875-881, 1993.

SCHMIT, J. C. et al. Multiple dideoxynucleoside analogue-resistant (MddNR) HIV-1 strains isolated from patients from different European countries. **AIDS**, 12, 2005-2015, 1998.

SCHOCHETMAN, G.; GEORGE, R. **AIDS Testing, New York**: Springer-Verlag, 1994.

SCHOCK, H. B., GARSKY, V. M., KUO, L. C. Mutational anatomy of an HIV-1 protease variant conferring cross-resistance to protease inhibitors in clinical trials. Compensatory modulations of binding and activity. **J. Biol. Chem** 271(50), p. 31957-31963. 1996.

SCHUURMAN, R. et al. Worldwide evaluation of DNA sequencing approaches for identification of drug resistance mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **J. Clin. Microbiol.**, 37 (7), p. 2291-2296, 1999.

SHIRASAKA, T. et al. Emergence of human immunodeficiency virus type 1 variants with resistance to multiple dideoxynucleosides in patients receiving therapy with dideoxynucleosides. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 92, p. 2398-2402, 1995.

SIMON, F., MAUCLERE, P., ROQUES, P., LOUSSERT-AJAKA, I., MULLER-TRUTWIN, M. C., SINOUSI, F., BRUN-VEZINET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nat. Med.**, 4, p. 1032-1037. 1998.

SINOUSI, F. B. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**. 348, p. 31-35, 1996.

SINOUSI, F. B., CHERMANN J. C., REY F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune syndrome. **Science**. 220, p. 868-70. 1983.

SMITH, M. S.; KOERBER, K. L.; PAGANO, J. S. Zidovudine-resistant immunodeficiency virus type 1 genomes detected in plasma distinct from viral genomes in peripheral blood mononuclear cells. **J. Infect. Dis.**, 167, p. 445-448, 1993.

SOARES, M. A., DE OLIVEIRA, T., BRINDEIRO, R. M. et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. **AIDS**; 17, p. 11-21, 2003.

SORIANO, V., MARIA MIRO, J. GUERRERO, A. [Primary resistance to antiretroviral agents]. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin**; 19, p. 22-25, 2001.

StatSoft, Inc. (2007). **STATISTICA** (dataanalysis software system), version 7.1.

STEFANI, M. M., PEREIRA, G. A., MARTELLI, C. M. et al. Evidence of HIV – 1 genetic diversity among pregnant women with AIDS or infected with HIV – 1 in Central Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr** 23, p. 205-207, 2000.

SUCUPIRA, M. C. A. Diversidade genética da região V3 da gp120 e das regiões da protease e transcriptase reversa do HIV-1. Comparação entre o perfil viral presente em indivíduos com infecção recente e indivíduos com infecção estabelecida atendidos entre 1999 e 2001 no Centro de Testagem e Aconselhamento de Santos, SP. **Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2002.

SUCUPIRA, M. C. A., CASEIRO, M. M., ALVES, K. et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care and STDs*, **in press**, 2006.

TAMALET, C., C. Pasquier, N. Yahi, P. Colson, I. P. Martin, G. Lepeu, H. Gallais, P. Massip, J. Puel, and J. Izopet. Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV – infection. **J. Med. Virol.** 61, p. 181 – 186, 2000.

TAMBUSSI, G. et al. Prevalence of mutation associated to resistance with nucleoside analogues in a cohort of naive HIV -1 positive subjects during the period 1984-1997. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents**, 12(1-2Suppl), p. 32-34, 1998.

TANURI, A. et al. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtype B and F isolates in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 43(2), p. 253-258, 1999a.

TANURI, A., SWANSON, P., DEVARE, S., et al. HIV – 1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **J Acqui Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 20(1), p. 60-66, 1999b.

TEIXEIRA, P. R., VITÓRIA, M. A., BARCAROLO, J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: **The Brazilian experience**. *AIDS* 18, p. S5-S7, 2004.

TESCAROLO, G. Determinação da prevalência de resistência genotípica e da diversidade genética em casos de infecção recente pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV – 1). **Dissertação de Mestrado apresentada na Disciplina de Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo**, 2005.

The Euro Guidelines Group for HIV resistance. Clinical and laboratory guidelines for the use of HIV – 1 drug resistance testing as part of treatment management: recommendation for the European setting. **AIDS** 15, p. 309-320, 2001.

THOMSON, M. M., DELGADO E., HERRERO, I., VILLAHERMOSA, M. L., VAZQUEZ E. P., CUERVAS, M. T. et al. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. **J. Gen Virol.** 83, p. 107-119. 2002a.

THOMSON, M. M., PÉREZ A. L., NÁJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. **LANCET.** 2 August.461-471. 2002b.

TINDALL, B. COOPER, D. A. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. **AIDS** 5, p. 1, 1991.

TISDALE, M. et al. Rapid in vitro selection of human immunodeficiency virus type 1 resistant to 3'-thiacytidine inhibitors due to a mutation in the YMDD region of reverse transcriptase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 90, p. 5653-5656, 1993.

TOKUNAGA, K. et al. Producer cell- dependent requirements of nef protein for efficient entry of HIV-1 into cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 250 (3), p. 565-568, 1998.

UK Collaborative Group on Monitoring the Transmission of HIV Drug Resistance. Analysis of prevalence of HIV – 1 drug resistance in infections in the United Kingdom. **BMJ** 322, p. 1087 – 1088, 2001

VELASQUEZ-CAMPOY A., TODD, M. J., VEGA, S., FREIRE, E. Catalytic efficiency and vitality of HIV – 1 proteases from African viral subtypes. **Proc Natl Acad Sci USA**; 98, p. 6062-7, 2001.

VENTURI, G. CATUCCI, M. ROMANO, L. et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type – 1 infected individuals from Bolivia reveals the presence of two distinct genetic subtypes B and F. **AIDS Res Hum Retroviruses** 16, p. 1926, 2000.

VERGNE, L., PEETERS, M., MPOUDINGOLE, E., et al. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. **J Clin Microbiol** 38, p. 3919-25, 2000.

VERHOFSTEDDE, C., WANZEELE, F. V., VAN DER GUCHT, B. et al. Interruption of reverse transcriptase inhibitors or a switch from reverse transcriptase to protease

inhibitors resulted in a fast reappearance of virus strains with a reverse transcriptase inhibitor-sensitive genotype, **AIDS**, 13, p. 2541-2546, 1999.

VERONESE R., Tratado de Doenças Infecciosas e Parasitárias, São Paulo: **Guanabara Koogan**: 2001.

VICENTE, A. C. P., OTSUKI, K., SILVA, N. B. et al. The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **J AIDS** 23, p. 327-331, 2000.

VIOLIN, M., VELLECA, R., COZZILEPRI, A., et al. Prevalence of HIV-1 Primary Drug Resistance in Seroconverters of IcoNA Cohort Over the Period 1996-2001. **J. Acquir Immune Defic Syndr** 36, p. 761-763, 2004.

WEI, X. et al. Viral dynamics of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Nature**, 373, p. 117-122, 1995.

WEINSCTOK, H. R., Respass, W. Heneine, C. J. Petropoulos, N. S. Hellmann, C.C. Luo, C. P. Pau, T. Woods, M. Gwinn, and J. Kaplan. Prevalence of mutations associated with reduced antiretroviral drug susceptibility among immunodeficiency virus type 1 seroconverters in the United States, 1993-1998. **J. Infect. Dis.** 182(1), p. 330-333, 2000.

WELKER, R., KOTTLER, H. R. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. **Virology** 219, p. 228-236, 1996.

WHO Network for isolation and characterization: HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: Genetic screening, sequence analysis and preliminary biological characterization of selected viral strains. **AIDS Res Hum Retroviruses** 10, p. 1327-1343, 1994.

WOLFS, T. F. et al. HIV-1 genomic RNA diversification following sexual and parenteral virus transmission. **Virology**, 189, p. 103-110, 1992.

Workshop Report from the European Commission (DG XII, INCO-DC) and the Joint United Nations Program on HIV/AIDS. HIV-1 subtypes: implications for epidemiology, pathogenicity, vaccines and diagnostics. **AIDS** 11: **UNAIDS17-UNAIDS** 36, 1997.

WRIGHT, S. The shifting balance theory and macroevolution. **Annu Rev Genet**, 16, p. 1-19, 1982.

YERLY, S., E. Race, S. Vora, P. Rizzardi, J. P. Chave, M. Flepp, P. Vernazza, A. Telind, M. Battegay, A. L. Veuthey, B. Hirschel, L. Pernin. The Swiss HIV Cohort Study. HIV drug resistance and molecular epidemiology in patients with primary HIV infection. Program and abstracts of the **8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago, Illinois**, Abstract 754, 2001.

YERLY, S., L. Kaiser, E. Race, J. P. Brun-Vezinet, F. Clavel, L. Pernin. Transmission of antiretroviral-drug-resistants, **Lancet** 354, p. 729-733, 1999.

YERLY, S., SCHCKMEL, G., BRU.J.P. et al. Frequency of transmission of drug-resistant variants in individuals with primary HIV-1 infection. In: **12TH WORLD AIDS CONFERENCE, Geneve. Switzerland.** (Abstract 32280), 1998.

YERLY, S., VORA, S., RIZZARDDI, et al. Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. **AIDS**, 15, p. 2287-2292, 2001.

YHAI, N. TAMALET, C. TOURRÈS, C. et al. Mutation patterns of reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1 infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences, **J Clin Microbiol** 37(12), p. 4099-4106, 1999.

ZENNOU, V. et al. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. **J. Virol.**, 72(4), p. 3300-3306, 1998.

ZHANG, H. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 wild-type and mutant reverse transcriptase by the phenyl ethyl thiozoly thiourea trovirdine and MSG-127. **Antiviral Research**, 28, p. 331-342, 1995.

ZHANG, L. et al. Selection for specific sequences in the external protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. **J. Virol.**, 67; 3345-3356, 1993.

ZHANG, L. et al. HIV-1 type 1 subtypes. co receptor usage, and CCR5 polymorphism. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, 13 (16), p. 1357-1366. 1997.

ZHU, T. et al. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. **Science**, 261, p. 1179-1181, 1993.

ZOLOPA, A., SHAFER, R. WARFORD, A. et al. HIV – 1 genotypic resistance patterns predict response to saquinavir-ritonavir therapy in patients in whom previous protease inhibitor therapy had failed. **Ann Intern Med** 131, p. 813-21, 1999.

GLOSSÁRIO

Anergia – Incapacidade do organismo de reagir a uma substância ou a um agente patogênico em relação aos quais ele estava anteriormente sensibilizado.

Barreira genética para resistência aos anti-retrovirais – “proximidade” genética para aquisição de resistência completa aos anti-retrovirais. Pode estar relacionada ao número de mutações necessárias para emergência de resistência ou à facilidade na seleção de determinada mutação de resistência. Uma droga que necessita de várias mutações para resistência apresenta uma grande barreira genética. Se algumas mutações já existirem, haveria no caso uma diminuição da barreira genética para resistência ao anti-retroviral em questão. Pode também estar relacionado à facilidade com que uma mutação emerge para determinada droga.

Carga Viral – Quantidade de HIV presente no sangue. Dizemos que a carga viral está indetectável quando os exames normalmente utilizados para medir a carga viral no sangue não conseguem detectar a presença do HIV.

Códon – Grupos de 3 nucleotídeos que codificam um aminoácido.

Deleção – Perda de fragmento genético nucleotídico, geralmente múltiplo de 3 que leva a uma diminuição no número de aminoácidos da seqüência.

Doenças Oportunistas – Doenças que surgem em conseqüência da deficiência do sistema imunológico, criando, assim, a oportunidade de microrganismos comuns proliferarem e se tornarem agressivos.

Falha clínica – ocorrência ou recorrência de doenças relacionadas à AIDS após 3 meses em um tratamento anti-retroviral, excluindo síndrome de recuperação imune.

Falha imunológica – Queda do CD4 ou não aumento do CD4 pelo menos 25-50 células no primeiro ano de tratamento.

Falha virológica – Carga viral superior a 400 cópias/ml após a 24^a semana ou superior a 50 cópias/ml na 48^a semana ou carga viral detectável após supressão virológica inicial (rebote).

Fenótipo – “Comportamento” replicativo do vírus em cultura.

Fitness – Capacidade adaptativa de um vírus em determinado meio ambiente. Um dos aspectos do *fitness* é a sua capacidade replicativa, que pode indiretamente ser medida pela carga viral. Mutações de resistência produzem uma diminuição da capacidade replicativa dos vírus (perda do *fitness*, proporcionando um “vírus alejado”). As mutações adicionais de resistência recuperam o *fitness* perdido pelo vírus. Entretanto, o vírus com melhor *fitness* na presença de anti-retrovirais é o vírus mutante.

Genótipo – Seqüências específicas de nucleotídeos que determinam os genes do HIV – 1.

Glicoproteínas – Heteroproteína formada por uma proteína e um glúcido.

Hemoderivados – Que deriva do sangue, seus componentes.

Hipersuscetibilidade – Aumento da sensibilidade de uma cepa viral a um determinado anti-retroviral, quando comparado ao vírus do tipo selvagem.

Inserções – Adição de nucleotídeos, geralmente múltiplos de 3, que levam ao acréscimo no número de aminoácidos na seqüência viral. Ex.: cccagttagttg - > ccagttagacttg (o tríplice destacado representa uma inserção na seqüência de nucleotídeos que não existia na seqüência original).

Linfócitos T – Tem como função essencial a produção de anticorpos (imunoglobulinas). Representam cerca de 10% dos linfócitos do sangue circulante.

Medicamentos anti-retrovirais – São os medicamentos que defendem o CD4 do ataque do HIV. Existem dois grupos de medicamentos: os que inibem a transcriptase reversa e os que inibem a protease.

Mutação – Alteração na composição genética do vírus.

Mutação acessória ou secundária – Mutação que emerge normalmente para recuperar o *fitness* perdido pelo aparecimento da mutação principal. Propicia uma perda modesta de suscetibilidade ao anti-retroviral que a selecionou.

Mutação deletéria – Mutações que fazem com que o vírus tenha uma pior capacidade replicativa.

Mutação neutra – Aquela que não causa impacto na capacidade replicativa do vírus (*fitness* viral).

Mutação principal ou primária – Aquela que produz significativa perda de suscetibilidade ao anti-retroviral que a selecionou. Normalmente é a primeira mutação que emerge decorrente do uso do anti-retroviral em questão.

Mutações não-sinônima – Mutações nucleotídeas que levam a alteração do aminoácido em determinado códon.

Mutações pontuais – Alterações genéticas resultantes de mutações em um único nucleotídeo.

Mutações sinônimas ou silenciosas – Mutações nucleotídeas que não levam a alteração do aminoácido em determinado códon.

Polimorfismos virais – Mutações genéticas que podem estar presentes nos vírus na ausência de pressão seletiva dos anti-retrovirais. Muitas vezes são “assinaturas” de vírus de diferentes subtipos do HIV – 1.

Protease – Enzima que os novos vírus HIV usam para sair da célula CD4 pronto para infectar um outro CD4.

Próvirus – Vírus na forma DNA que se encontra integrado no núcleo celular.

Quase-espécie – Variantes virais distintas, porém geneticamente relacionadas, dentro de uma população de vírus que infectam uma pessoa. Essas cepas evoluíram ao longo do tempo a partir de uma população viral homogênea do inóculo que infectou esse indivíduo.

Reação em Cadeia pela polimerase (PCR) – Reação química em que um genoma é “amplificado” (multiplicado) para ser detectado com maior facilidade ou usado como produto para outras reações, como o seqüenciamento genômico.

Recombinação – Troca de material genético entre dois vírions.

Resistência a drogas – Diminuição da suscetibilidade do HIV às drogas.

Resistência a múltiplas drogas (MDR) – Mutações que normalmente conferem resistência a todas as drogas de uma mesma classe.

Resistência cruzada – Resistência selecionada por uma droga que levará à resistência a outra droga ainda não utilizada.

Resistência fenotípica – Redução da atividade anti-retroviral *in vitro*, evidenciada pelo aumento da replicação viral na presença da droga.

Resistência genotípica – Presença de mutações genéticas relacionadas à redução de suscetibilidade a um ou mais anti-retrovirais.

Resistência primária – Resistência aos anti-retrovirais, detectada em pacientes virgens de tratamento anti-retroviral.

Resistência secundária – Resistência aos anti-retrovirais decorrente da pressão seletiva exercida pelas drogas.

Retrovírus – Grupo de vírus com ácido ribonucléico, com simetrias cúbicas, envolvidas por um envelope e possuindo uma enzima capaz de sintetizar o ácido desoxirribonucléico a partir do ácido ribonucléico (ao contrário do habitual de transcrição). Isso permite que eles se introduzam tanto nas células-hospedeiras com genoma DNA quanto nas com genoma RNA.

Ribonuclease – Enzima que cinde o ácido nucléico.

Seqüenciamento genômico – Reação laboratorial que determina a composição genética (seqüência de nucleotídeos) de determinado genoma.

Sistema Imunológico – Sistema responsável por defender o organismo de doenças.

TCD4+ – São células muito importantes para a defesa do organismo. Elas comandam nosso sistema imunológico.

Testes de resistência fenotípica (fenotipagem) – Testes usados para determinar em cultura a suscetibilidade do vírus aos anti-retrovirais.

Testes de resistência genotípica (genotipagem) – Testes laboratoriais que determinam a presença de mutações genéticas no HIV – relacionadas à diminuição de suscetibilidade às drogas.

Transcriptase – Enzima que o HIV utiliza para entrar no CD4.

Vírião – Vírus livre na sua forma RNA que é liberado na corrente sanguínea, fruto da replicação viral.

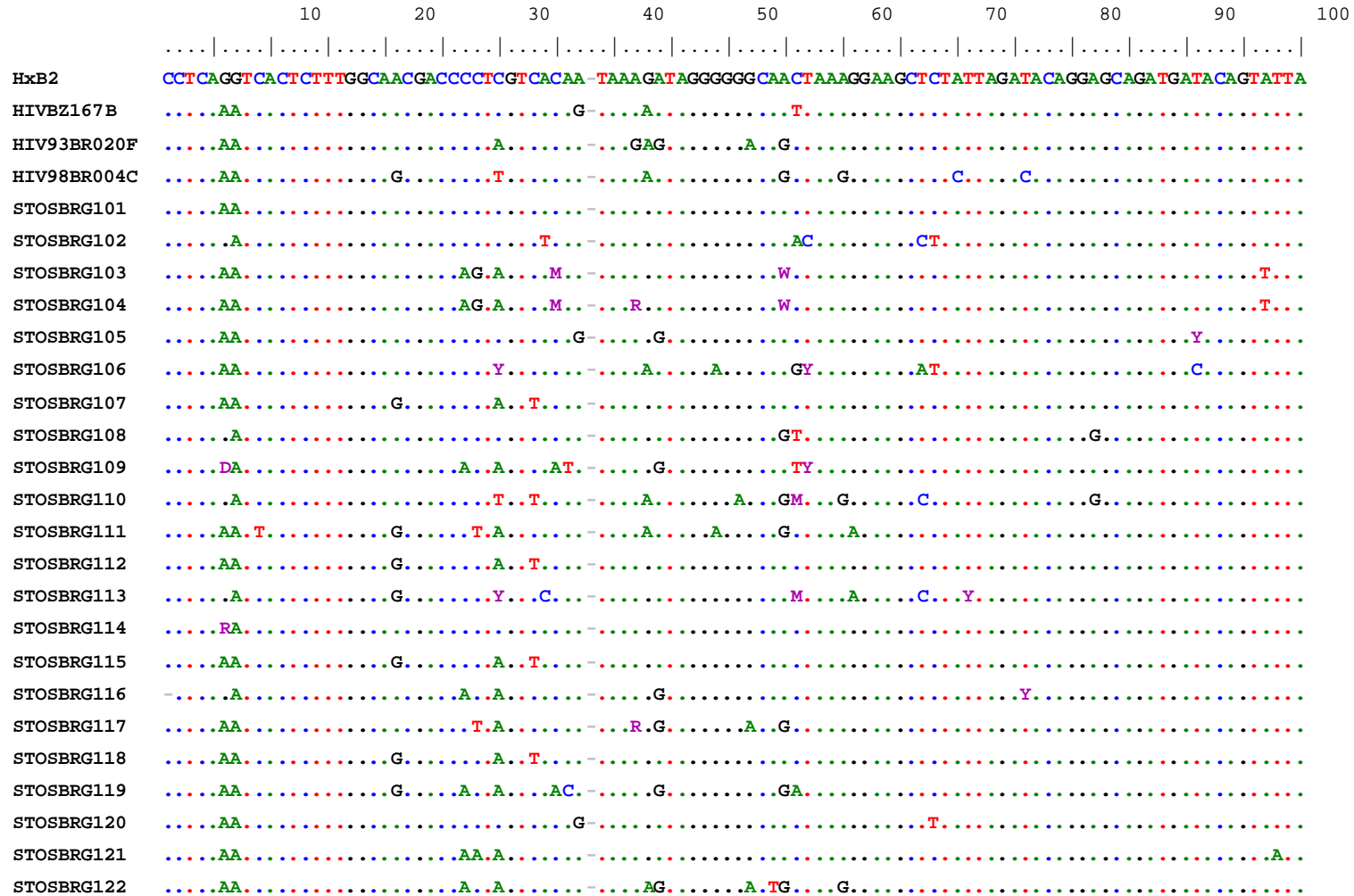
“**Vias mutacionais**” para resistência aos anti-retrovirais – Grupo de mutações específicas selecionadas por uma mesma droga. Um determinado anti-retroviral pode selecionar mutações por várias vias mutacionais distintas em pacientes diferentes, porém normalmente apenas uma via ocorrerá em um mesmo paciente.

Vírus do tipo selvagem – Cepa viral com constituição genética considerada normal, sendo sensível aos anti-retrovirais.

Vírus mutante – Cepa viral com alterações genéticas.

Vírus recombinantes – Vírus “híbridos” frutos da recombinação e que apresentam material genético de dois vírus parentais.

ANEXO A - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS – PACIENTES DO GRUPO 1 (N=43)



STOSBRG106A.....R.MC.....
 STOSBRG107GAA.A.....M.....G.....T.....C.....
 STOSBRG108A.....A.A.A.C.....
 STOSBRG109GAA.R.....T.....C.....
 STOSBRG110C.GA.....A.....A.A.CT.....
 STOSBRG111C.A.A.....A.....A.....A.C.....T
 STOSBRG112GAA.A.....M.....G.....T.....C.....
 STOSBRG113A.....R.....CY.....
 STOSBRG114 R.R.C.A.C.....G.CA.....T
 STOSBRG115GAA.A.....M.....G.....T.....C.....
 STOSBRG116R.....GC.A.....A.....C.....
 STOSBRG117C.A.A.....A.R.....G.A.....A.C.....T.T
 STOSBRG118GAA.A.....M.....G.....T.....C.....
 STOSBRG119C.A.A.....A.....A.....A.C.....C.....C.T
 STOSBRG120R.....A.....C.....T
 STOSBRG121A.A.....A.....C.....
 STOSBRG122G.A.A.....A.R.....A.....A.T.TG.....T
 STOSBRG123A.....A.R.....A.A.....
 STOSBRG124A.....G.....GG.A.....
 STOSBRG125T.A.....A.....ACAG.....
 STOSBRG126CT.A.A.....A.....C.....A.....A.C.....T
 STOSBRG127C.A.A.....A.....A.....A.C.....C.....C.T
 STOSBRG128A.A.....A.....AG.....A.C.TGT.....T
 STOSBRG129A.....R.....G.TG.....R...
 STOSBRG130C.....A.G.....A.....A.A.A.A.....G.A.....C.....
 STOSBRG131A.....Y.....G...
 STOSBRG132T.....A.G.....
 STOSBRG133C.AGAG.....A.....A.....R.....T
 STOSBRG134AY.....R.....M.....Y.....AG.....
 STOSBRG135A.AA.A.....AT.....A.....G.....A.ACT.....T
 STOSBRG136T.A.A.....A.....G.....A.....GG.C.....
 STOSBRG137C.GA.....GG.....C.....
 STOSBRG138T.....A.....A.....G.GCT.....

STOSBRG122C.G.....G.G.....G.....T.....
 STOSBRG123
 STOSBRG124G.....G.....G.....C.....C
 STOSBRG125 ..C.....T.....C.....
 STOSBRG126C.C.G.....G.GA.....R.....CA.....T.....
 STOSBRG127C.G.....R.G.....C.....CA.....T.....
 STOSBRG128C.G.....G.....G.....A.....A.....T.....
 STOSBRG129R.....T.....C.....
 STOSBRG130AG.....A.....A.....A.....C
 STOSBRG131G.....G.A.....C.....C.....C.T.....
 STOSBRG132 ..C.....C.....G.....Y.....C.....
 STOSBRG133 ..C.T.....G.....G.....C.....
 STOSBRG134R.....C.....M.....
 STOSBRG135A.A.G.....C.....C.....C.A.....AC.....
 STOSBRG136C.G.....C.....G.....G.....A.....C.....C.....
 STOSBRG137C.....
 STOSBRG138 ..C.....A.....C.....
 STOSBRG139G.....T.....C.....
 STOSBRG140GA.A.G.....C.....G.....A.....C.A.A.A.....
 STOSBRG141C.....C.....M.....
 STOSBRG142 ..Y.R.....G.....R.....R.....R.A.....C.....
 STOSBRG143G.C.G.....T.G.....G.....C.C.....T.....

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

HxB2 CCCATTAGCCCTATTGAGA-CTGTACC-AGTAAAA TTAAAGCCAGGAATGGATGG-CCC AAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAA GAAAAA TAAAAG
 HIVBZ167BT.....A.....
 HIV93BR020F ..A.....T.....G.....G.....
 HIV98BR004C ..A.....T.C.....A.....G.C.....G.....
 STOSBRG101Y.T.....A.....G.....
 STOSBRG102T.....A.....C.G.....
 STOSBRG103A.....A.....G.G.....
 STOSBRG104T.....A.....G.....

STOSBRG105 ..T....T.....A-.....RM.....
STOSBRG106T.....A-.....RR.....S.....
STOSBRG107T.....A.A.K.....A.....
STOSBRG108C..T.....A-.....G.....A.....
STOSBRG109 ..Y....T.....A-.....Y.....
STOSBRG110T.....A-.....C.....
STOSBRG111 ..A....T.....T-.....G.....G.....
STOSBRG112T.....A.A.K.....A.....
STOSBRG113T.....A-.....GT...A.....
STOSBRG114T..Y...A-.....C.....
STOSBRG115T.....A.A.K.....A.....
STOSBRG116Y.....A-.....T..R.....G.....
STOSBRG117T.....A-.....S.....
STOSBRG118T.....A.A.K.....A.....
STOSBRG119T.....A-.....
STOSBRG120T.....A-.....G.....G.....
STOSBRG121T.....A-.....G.....
STOSBRG122 ..A....T.....A-.....G.....G.....
STOSBRG123 ..Y....T.....A-.....G.....G.....G.....
STOSBRG124T.....A-.....A.....
STOSBRG125T.....A-.....G.....
STOSBRG126 ..A....T.....A-.....G.....G.....
STOSBRG127T.....A-.....
STOSBRG128T.....G.....G.....G.....C.....
STOSBRG129T.....A-.....G.....G.....
STOSBRG130C..T.....A-.....A..A.....G.....
STOSBRG131T.....A-.....G.....G.....
STOSBRG132TT.....A-.....G.....G.....
STOSBRG133 ..Y....T.....A-.....
STOSBRG134Y..T.....A-.....A.....G.....
STOSBRG135 ..A....T..C...A-.....G.....G..C.....G.....
STOSBRG136T.....A-.....G.....
STOSBRG137T.....A-.....T...GG..C.....A..G.....

STOSBRG103C..T.....-.....
STOSBRG104C.....G.....-.....
STOSBRG105C.....-.....G.....
STOSBRG106C.....G.....T.....
STOSBRG107A.....A.....-.....
STOSBRG108AS.....T.C.....
STOSBRG109C.....A.....A.....-.....
STOSBRG110C.....C.....T..T.....
STOSBRG111CC.C.....A.G.G.C.....T.....
STOSBRG112A.....A.....-.....
STOSBRG113-.....T.....
STOSBRG114W.....A.....A.....T.....Y.....
STOSBRG115A.....A.....-.....
STOSBRG116G.K.....Y.....Y.....R.R.....T.....
STOSBRG117C.....R.....G.....Y.....C.....
STOSBRG118A.....A.....-.....
STOSBRG119C.....-.....G.....
STOSBRG120C.....C.....G.....-.....
STOSBRG121C.....A.C.....-.....
STOSBRG122T.....A.....A.....R.....A.....T.....
STOSBRG123C.....-.....
STOSBRG124 ..C..C.....G.....C.....A.....T.....T.....
STOSBRG125 ..C..C.....C.....-.....
STOSBRG126C.C.....A.....C.....A.....T.....
STOSBRG127C.....-.....G.....
STOSBRG128C.....T.....-.....
STOSBRG129C.....G.....T.....
STOSBRG130C.....A.G.....A.....A.....A.....
STOSBRG131C.....A.....C.....G.....-.....
STOSBRG132C.....A.....G.C.....M.....T..T.....
STOSBRG133C.....R.....C.....-.....C.....
STOSBRG134 ..C..R.....R..R.....R..R.....-.....
STOSBRG135A.....A.....G.....T.....

STOSBRG136R.....A.....G.....G.....
 STOSBRG137A.....
 STOSBRG138
 STOSBRG139C.....C.....G.....
 STOSBRG140T.....A.....
 STOSBRG141T.....M.....CA.....
 STOSBRG142Y.....C.....R.....G.....
 STOSBRG143A.....A.....C.....

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

HxB2 AA-AATCTTAGAGCCTTT-TAGAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGC
 HIVBZ167BR.....G.....
 HIV93BR020FT..C.....GC.A.....C.....G.....A.....
 HIV98BR004CA..C.....GGC.....A.....T.....C.....A.....
 STOSBRG101Y.....M.....A.....T.....A.....
 STOSBRG102T.....G.....C.....G.....
 STOSBRG103R.....G.....C.....C.....C.....
 STOSBRG104G.....
 STOSBRG105R..C.....G..YG.....A..A.....
 STOSBRG106A.....A.....
 STOSBRG107 .G.....C.....A.....
 STOSBRG108 ..G.....G.....G.....G.....A.....
 STOSBRG109A.....T.....
 STOSBRG110A.....G.....A.....
 STOSBRG111 ..G.....T..C.....GC.A.....T..C.....A.....
 STOSBRG112 .G.....C.....A.....
 STOSBRG113MW.....A.....
 STOSBRG114 .R.....C.....A.....
 STOSBRG115 .G.....C.....A.....
 STOSBRG116G.....C.....
 STOSBRG117R.....T.....
 STOSBRG118 .G.....C.....A.....

STOSBRG102A.....T.....

STOSBRG103A..G.....A.A.....T.....

STOSBRG104 ..GT.....A.....M.....T.A.....

STOSBRG105MT.....A.....Y.....A.....

STOSBRG106A.....R.....A.....GT..GAR.....G.....Y.....

STOSBRG107T.A.....T.....G.....

STOSBRG108A.A.....T.....GT.....

STOSBRG109A.....T.....

STOSBRG110A.....A.A.....T.....

STOSBRG111GY.....A.....T.....G.....

STOSBRG112T.A.....T.....G.....

STOSBRG113G.....A.....G.A.....RT.....C.....

STOSBRG114R.....A..AT.W.....C.C.A.....GT.....A.R.....

STOSBRG115T.A.....T.....G.....

STOSBRG116T.....T.....R..C.....

STOSBRG117R.....A.....R.....T.G.....C.....

STOSBRG118T.A.....T.....G.....

STOSBRG119G.....T.....Y.....G.....

STOSBRG120A.....T.....

STOSBRG121T.....A.....T.....

STOSBRG122T.A..G.....AC..GCA.....T...T.....A.G...C.....

STOSBRG123 ..Y..R.....A.....Y.....RT.....Y.....

STOSBRG124A.A..G.....GT.....C.....

STOSBRG125A.....G.....

STOSBRG126G.....T.A..GG.....AC..AA.....T...T.....G.....A.....C..C.....

STOSBRG127G.....T.....Y.....G.....

STOSBRG128G.....A..AT.A..G.....AC..AA.....T...T.....A.....G..C.....

STOSBRG129G.....G.....A.....T.....T.....

STOSBRG130G.....CT.A.....A.A.....

STOSBRG131A.....T.....

STOSBRG132 ..C..R.....T.....T.A..K.K.....AY..AA.....T...T.....C.....

STOSBRG133GA.....A.A.....A.....

STOSBRG134A.....R.....T.....R.....

STOSBRG118 ...K.....
 STOSBRG119 G.....
 STOSBRG120 ..Y.....K.....
 STOSBRG121
 STOSBRG122 G.....
 STOSBRG123 T.....
 STOSBRG124 ..G.....A.....
 STOSBRG125 C.....
 STOSBRG126 C...G...C...C.
 STOSBRG127 G.....
 STOSBRG128 G.....
 STOSBRG129 Y.....Y...C.....
 STOSBRG130 T...A...AA.....C.
 STOSBRG131
 STOSBRG132 M...A.....
 STOSBRG133 Y...C.....
 STOSBRG134 C.....A.....
 STOSBRG135 T.....G.....C.
 STOSBRG136 T.....
 STOSBRG137
 STOSBRG138 T.....A.....
 STOSBRG139
 STOSBRG140 T.....A.....C.
 STOSBRG141 ..C.....
 STOSBRG142 T.....K.....
 STOSBRG143

ANEXO B - ALINHAMENTO DAS SEQÜÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS – PACIENTES DO GRUPO 2 (N=37)



STOSBRG222AA.....A.....R.....C.....

STOSBRG223A.....Y.A.....A.....A.....

STOSBRG224AA.....R.....Y.....

STOSBRG225AA.....A.A.....G.....A.....A.G.....

STOSBRG226AA.....R.....Y.....

STOSBRG227AA.....G.....G.....

STOSBRG228AA.....AG.A.....G.C.....A.G.....C.....R.....

STOSBRG229A.....G.....T.....TG.....

STOSBRG230AA.....

STOSBRG231AA.....R.....Y.....

STOSBRG233AA.....T.A.....A.TT.....

STOSBRG234AA.....AG.A.....A.....AG.....A.G.....T.....

STOSBRG235A.....M.....G.....Y.....

STOSBRG236AA.....A.....A.G.....

STOSBRG237AA.....T.T.CR.....R.....A.....

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

HxB2 GAAGAAATGAGTTTGCCA-GGAAGATGGAAACCAAAAATGATAGGGGCAATTGGAGGTTTTATCAAAGTAAGACAGTATGATCAGATACTCATAGAAAT

HIVBZ167BA.....C.....

HIV93BR020FCG..A.A.....A.....A.....AGC.....

HIV98BR004CA.AA.....AT.....A.....G.....A.....T.....

STOSBRG201V.....A.....R.....G.....

STOSBRG202 ..C.....CA.....Y.....W.....G.G.C.....

STOSBRG203CT.....

STOSBRG204C..A.A.....A.....R.....A.....C.....A.TG.....

STOSBRG205CAG.....A.....

STOSBRG206C..A.A.....A.....G.....A.....A.....GG.C.....

STOSBRG207C..A.A.....R.....R.A.....A.....A.T.....

STOSBRG208G.....

STOSBRG209AGA.....AG.....A.....C.....

STOSBRG210Y.....

STOSBRG211C..A.....A.....C.....

STOSBRG202G.....R.....A.....W...K.....K..C.....-.....
STOSBRG203 T.....A.....CA.....CG.....-.....
STOSBRG204 T.....C.....R..A.....G..A.....C..Y.....-.....
STOSBRG205 T.....A.G.....G.....C.....C.....-.....
STOSBRG206 T.....C..G.....G.....C.....T.....C..T.....-.....
STOSBRG207 T.....G...C.....G..G.....G.....A.....AGC.....-.....
STOSBRG208 T.....G.....K.....C.....-.....
STOSBRG209G.....G.....C..C.....-.....
STOSBRG210G.....M..C.....-.....
STOSBRG211 A.....G...C.....G.....C.....T.....-.....
STOSBRG212 M.....G..G.....G.....C..T.....-.....
STOSBRG213G..C...TC.C.....G.....C..C.....-.....
STOSBRG214 T.....C..G...C.....G..G.....A.....C.....-.....
STOSBRG215 T.....G.....G.....G.....C.....-.....
STOSBRG216G..C.....C.....-.....
STOSBRG217 T.....G.....G...A...G.....A..C...C.....-.....
STOSBRG218 .A.....G.....T..T.....T.....-.....
STOSBRG219 T.....G.....C.....-.....
STOSBRG220 T..G...C..G..G.....G..G.....G.....A.....T.....-.....
STOSBRG221R.....M.....A.....T.....C.....-.....
STOSBRG222 T.....R.....G.....C.....C.....-.....
STOSBRG223R.....M.....A.....T.....C.....-.....
STOSBRG224 T.....G.....G...A...G.....A..C...C.....-.....
STOSBRG225 .A.....R.....C.....G..T.....-.....
STOSBRG226 T.....G.....G...A...G.....A..C...C.....-.....
STOSBRG227G.....C.....-.....C.....
STOSBRG228 T...M..C..G.....G..G.....G.....C.....-.....
STOSBRG229A.....A.....C.....-.....
STOSBRG230 T.....A.....G.....C.....-.....
STOSBRG231 T.....G.....G...A...G.....A..C...C.....-.....
STOSBRG233 T.....C..G...C.....G..G.....T.....G..A.....T.....-.....
STOSBRG234 T..G...C..G..G.....G..G.....G.....A.....T.....-.....
STOSBRG235 ...Y..G...A.....G.....A.....C..C.....-.....

STOSBRG225T.....A..A-.....Y.....G.....M.....
 STOSBRG226Y..T..Y.....C-.....
 STOSBRG227T..C.....A-.....A.....
 STOSBRG228T.....A-.....A.....T-.....
 STOSBRG229T.....A..A-.....CC.....A.....G.....T.....
 STOSBRG230T.....A-.....
 STOSBRG231Y..T..Y.....C-.....
 STOSBRG233TT.....A-.....G-.....
 STOSBRG234 ..A.....T.....A-.....G.....G.....
 STOSBRG235T.....A-.....
 STOSBRG236T.....A-.....
 STOSBRG237Y.....C..A-.....Y.....

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

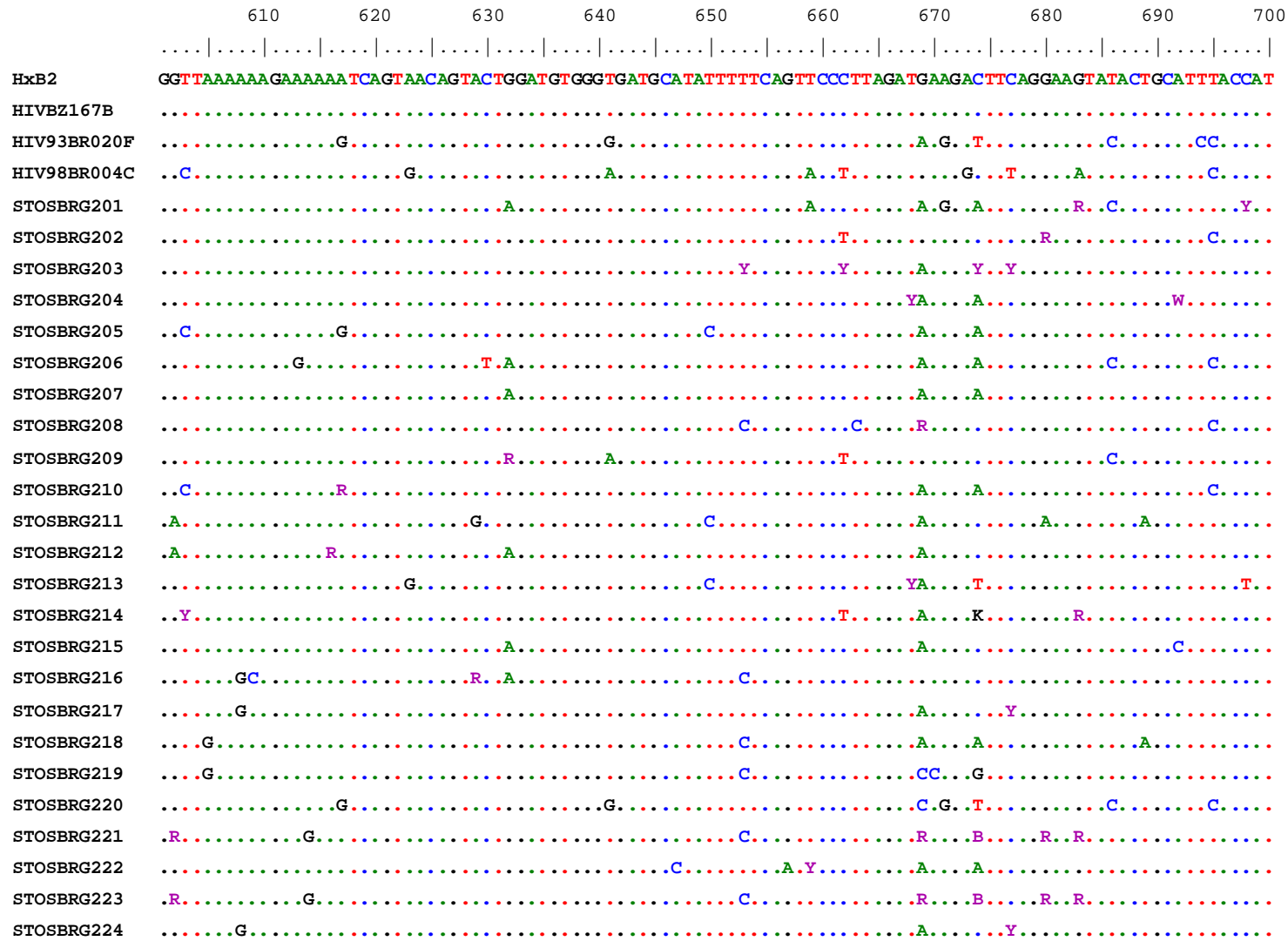
HxB2 GCAATTAGTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAA CGAAGGCAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAA
 HIVZ167BA.....
 HIV93BR020FAC.....A.....TG..A.....A.....
 HIV98BR004CAC.....GAT..A.....G..G.....A.....A.....T..C.....A..G.....
 STOSBRG201A.....C.....A.....A.....T.....
 STOSBRG202K.....A.....R.....A.....A.....G.....
 STOSBRG203A.....A..R.....A.....R..R.....
 STOSBRG204W.....A.....A.....T.....C.....
 STOSBRG205R.....A.....A.....
 STOSBRG206A.....A.....T.....T..T..A..G.....
 STOSBRG207A.....Y.....A.....W.....T.....
 STOSBRG208A.....A.....R.....
 STOSBRG209R.....AC.....A.....A.....
 STOSBRG210 ..Y.....A.....
 STOSBRG211A-.....G.....
 STOSBRG212C.....A.....A.....WA.....T.....
 STOSBRG213A.....
 STOSBRG214G.....A.....A.....T.....R.....

STOSBRG215A.....A.....T.C.....T.....A.....
STOSBRG216A.....A.....
STOSBRG217A.....A.....
STOSBRG218A.....A.....
STOSBRG219C.....A.....A.G.....G.....
STOSBRG220A.....A.....A.....A.....G.....C.....
STOSBRG221C.....A.....A.....
STOSBRG222A.....G.C.....AT.....R.....C.A.R.....
STOSBRG223C.....A.....A.....
STOSBRG224A.....A.....
STOSBRG225AC.....A.....TT.....A.....A.....A.....
STOSBRG226A.....A.....
STOSBRG227A.....A.G.....
STOSBRG228A.....A.....T.....
STOSBRG229A.....A.....
STOSBRG230C.....A.....A.G.....
STOSBRG231A.....A.....
STOSBRG233A.....A.....C.T.....
STOSBRG234A.....A.....A.....A.....G.....C.....
STOSBRG235A.....A.....R.....
STOSBRG236C.....A.....G.....
STOSBRG237G.....A.....A.....T.....R.....

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

HxB2 AAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTAGTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGAATACCCATCCCGC-AG
HIVBZ167BG.....
HIV93BR020FG.....A.....T.T.....G.....G.....A.....
HIV98BR004C .GA.....GG.....G.....A.....T.....G.....C.G.....
STOSBRG201 .G.....A.....T.....
STOSBRG202R.C.....K.....
STOSBRG203R.....Y.....
STOSBRG204TG.....T.....G.....

STOSBRG205 .G.....R.....A.....-
STOSBRG206 .G.....G.....T.....A.....-
STOSBRG207A.....Y.....-
STOSBRG208 .G.....C.....G.....T.....Y.....-
STOSBRG209 .G.TG.....G.C.....T.....R.....-
STOSBRG210 .G.....Y.....G.....-
STOSBRG211T.T.....C.....T.....-
STOSBRG212C.....G.....A.....-
STOSBRG213 .G.....G.....G.....-
STOSBRG214 ..TG...Y.....G.....Y.....R.....R.....T.....-
STOSBRG215 .G.TG.....G.C.....T.....T.....-
STOSBRG216M.....G.-W.
STOSBRG217 .G.....R.....T.K.....-
STOSBRG218 .G.T.....T.....-
STOSBRG219 .G.....-
STOSBRG220C.....G.....A.....T.T.....G.....T.....-
STOSBRG221Y.....AM.....T.Y.....R.....-
STOSBRG222 .GA...GA.....C.....G.....G.....-
STOSBRG223Y.....AM.....T.Y.....R.....-
STOSBRG224 .G.....R.....T.K.....-
STOSBRG225G.....A.....C.....M.....-
STOSBRG226 .G.....R.....T.K.....-
STOSBRG227-
STOSBRG228 .G.....T.....G.....-
STOSBRG229 .G.....G.....C.....-
STOSBRG230 .G.....T.....GR.....-
STOSBRG231 .G.....R.....T.K.....-
STOSBRG233GG.....A.....C.....C.....-
STOSBRG234C.....G.....A.....T.T.....G.....T.....-
STOSBRG235 .G.....A.....C.....Y.....-
STOSBRG236 .G.....G.....G.....A.....T.....-
STOSBRG237 ..TG...Y.....G.....Y.....R.....R.....T.....-



STOSBRG225G.....K.....G.Y.....A.....G.....
STOSBRG226G.....A.....Y.....
STOSBRG227C.....G.....T.....A.....Y.....
STOSBRG228A.....Y.....A.....C.....G
STOSBRG229C.....C.....G.G.....
STOSBRG230G.....A.....K.Y.KC.....CC.....G.....G.K.....K.....G
STOSBRG231G.....A.....Y.....
STOSBRG233T.....A.....C.....
STOSBRG234G.....G.....C.G.....T.....C.....C.....
STOSBRG235A.....A.....Y.....
STOSBRG236A.....C.....
STOSBRG237 ..Y.....T.....A.....K.....R.....

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

HxB2 ACCTAGTATAAA CAATGAGAC ACCAGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACAGGGATGGAAA GGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGAC
HIVBZ167B
HIV93BR020FCC.....AG.....G.....C.....A.....TA.....
HIV98BR004CC.....A.....T.....G.....T.....
STOSBRG201C.....R.....
STOSBRG202C.....M.....RY.....R.....T.....
STOSBRG203G.....C.....T.....C.....
STOSBRG204C.....T.....
STOSBRG205R.....G.....C.....
STOSBRG206C.....K.....G.....T.....
STOSBRG207C.....C.....
STOSBRG208G.....C.....G.....
STOSBRG209C.....R.....G.....
STOSBRG210Y.C.....T.....T.....C.....G.....T.....
STOSBRG211A.....
STOSBRG212C.....C.....A.....
STOSBRG213C.....G.....Y
STOSBRG214C.....A.....G.....K.....Y.....

STOSBRG215GY.....G.....A.....
 STOSBRG216C.....A.....A.....Y.....
 STOSBRG217T.....A.....R..R.....A.....T.....T.....
 STOSBRG218C.....
 STOSBRG219C.....G.....G.....
 STOSBRG220C.C.....A.....A.....G.....A.....G.....TA.....
 STOSBRG221Y.....G.....S.....GT.....
 STOSBRG222C.....C.....A.....
 STOSBRG223Y.....G.....S.....GT.....
 STOSBRG224T.....A.....R..R.....A.....T.....T.....
 STOSBRG225C.....A.....G.....
 STOSBRG226T.....A.....R..R.....A.....T.....T.....
 STOSBRG227G.....R.....A.....
 STOSBRG228G..G.G..Y.....C.....C.....
 STOSBRG229A.....A.....C.....A.....
 STOSBRG230G..K.C.....G..G..G.....G.....T.....T.....
 STOSBRG231T.....A.....R..R.....A.....T.....T.....
 STOSBRG233C.....
 STOSBRG234C.C.....A.....A.....G.....A.....G.....TA.....
 STOSBRG235C.....Y..G.....C.....KS.....
 STOSBRG236
 STOSBRG237C.....A.....G.....K.....Y.....

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

HxB2 AAA--AATCTTAGAGCCTTT-TAGAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAG
 HIVBZ167BR.....G.....
 HIV93BR020FT..C.....GC.A.....C.....G.....A..
 HIV98BR004CA..C.....GGC.....A.....T.....C.....A
 STOSBRG201C..A.....TW.....
 STOSBRG202R.....C..C..A.....T.....A
 STOSBRG203Y.....AC.....M.M.....A
 STOSBRG204Y..A.....

STOSBRG205A.....AA..

STOSBRG206

STOSBRG207G.....R

STOSBRG208T.....Y.....G.....A.....CA..

STOSBRG209S.....G.....G.....TA.....R.....AA..

STOSBRG210R.....C.AM.....G.....A..C.....A..

STOSBRG211 G.....C.....A.....T..C..G.....A.....A..A

STOSBRG212R..G.....G.....A

STOSBRG213G.....A.....

STOSBRG214R.....A

STOSBRG215G.....A.....T.....

STOSBRG216T.....C.A..C.....G.....Y.....T.....

STOSBRG217C.....A.....Y.....

STOSBRG218A.....G.....A..A

STOSBRG219T.....C.....A.....A.....A.....

STOSBRG220T..C.....GC.A.....A..A.....C.....G.....T.....

STOSBRG221B.....Y.....A.....A

STOSBRG222Y.....T.....G.....A

STOSBRG223B.....Y.....A.....A

STOSBRG224C.....A.....Y.....

STOSBRG225K.....T.....

STOSBRG226C.....A.....Y.....

STOSBRG227R.....A..R

STOSBRG228 ..G.....A..

STOSBRG229T.....A..G.....G.....

STOSBRG230C.....A.....A.....

STOSBRG231C.....A.....Y.....

STOSBRG233G.....C.....T.....

STOSBRG234T..C.....GC.A.....A..A.....C.....G.....T.....

STOSBRG235A.....W.....G.....

STOSBRG236C.....G.....

STOSBRG237R.....A

```
          910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
HxB2      CATAGAAACAAAAA---TAGAGGAGCTGAGACAACATCT-----GTTGAGGTGGGGACTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCTCCAT
HIVBZ167B .....A.....T.....A.....G.....T.....A.....G.....
HIV93BR020F .....A...T.A...G.....AC...AA...T.A.T.....A.....C.....
HIV98BR004C .....GG.....A...AT.A...G...T.....A...A...T.C...C.....G.....C.....
STOSBRG201 .....A...R.....R.....T.....
STOSBRG202 .....G.....R..A.....Y.....R.....RT.....
STOSBRG203 .....R.....A.....A.....GT...T.....
STOSBRG204 .....G.....C.A.....T.Y.....R.....
STOSBRG205 .....R.....C.A...T...C...G..G.....
STOSBRG206 .....C..G.....R.....GT.....C.....G.....
STOSBRG207 .....G...G.....Y.....T.....
STOSBRG208 .....A.....R.....T.....
STOSBRG209 .....Y.A...T...G.R...T..TA...G..T...G.....
STOSBRG210 .....GM.....A.....CY.....T.....
STOSBRG211 .....AC.....AT.....CA...T.G...G...A.....
STOSBRG212 .....R.....A.....R...G...T...T...R...C.....
STOSBRG213 .....A...A...C...GC...C.....
STOSBRG214 .....G.....R.T...R.....T.....R...R.....
STOSBRG215 .....G.....A.....T.....
STOSBRG216 .....G.....A.....Y.....R...GT.C...Y..G.....C.....
STOSBRG217 .....A..AT.A.....C.C.A...GT.....A.....
STOSBRG218 .....A.....
STOSBRG219 .....G.....GA.....T.....
STOSBRG220 .....GA.....T.A..A.....AC..GCA...T...T...A..G...C.....
STOSBRG221 .....G.....A.....M.....H.....
STOSBRG222 .....G...G...CA..A...T...G..A...RT..TA...Y..G.....
STOSBRG223 .....G.....A.....M.....H.....
STOSBRG224 .....A..AT.A.....C.C.A...GT...A.....
```

STOSBRG225A.....T.....W.....T.A.....Y.....
 STOSBRG226A.AT.A.....C.C.A.....GT.....A.....
 STOSBRG227A.....A.....GT.....G.A.....
 STOSBRG228A.....T.....M.G.....
 STOSBRG229G.....GT.....G.....
 STOSBRG230G.....C.....T.....
 STOSBRG231A.AT.A.....C.C.A.....GT.....A.....
 STOSBRG233A.....A.....T.....
 STOSBRG234GA.....T.A.A.....AC.GCA.....T.T.....A.G.C.....
 STOSBRG235G.....R.....S.....R.....T.....Y.....T.....
 STOSBRG236G.....A.A.....C.....CA.....T.....T.....
 STOSBRG237G.....R.T.....R.....T.....R.R.....

 1010 1020 1030
|.....|.....|.....|.....|.....|.....
 HxB2 TCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATA
 HIVBZ167BA.....
 HIV93BR020FG.....
 HIV98BR004C .T.....G.....C.....
 STOSBRG201 ...M.....
 STOSBRG202C.....G.....
 STOSBRG203
 STOSBRG204
 STOSBRG205G.....
 STOSBRG206 ...K.....
 STOSBRG207
 STOSBRG208
 STOSBRG209
 STOSBRG210
 STOSBRG211
 STOSBRG212K.....
 STOSBRG213C.C.....
 STOSBRG214 .T.....

STOSBRG215C.
STOSBRG216 ...Y.....
STOSBRG217
STOSBRG218
STOSBRG219G.....
STOSBRG220G.....
STOSBRG221 ...W.....
STOSBRG222
STOSBRG223 ...W.....
STOSBRG224
STOSBRG225
STOSBRG226
STOSBRG227
STOSBRG228 ...Y.....
STOSBRG229
STOSBRG230
STOSBRG231
STOSBRG233 ...A.....
STOSBRG234G.....
STOSBRG235
STOSBRG236
STOSBRG237 .T.....

ANEXO C - LISTA DE PUBLICAÇÕES (A PARTIR DE RESULTADOS PARCIAIS)

1. The association between primary antiretroviral resistance and HAART virological failure in a developing set. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Cecília Sucupira, Ricardo Sobhie Diaz. XVIII International HIV Drug Resistance Workshop: Basic Principles & Clinical Implications, 9– 13 June, Fort Myers, Florida, USA, 2009.
2. Primary antiretroviral resistance and HIV – 1 is the major determinant of HAART virologic failure in the city of Santos, Brazil. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Maria Cecília A. Sucupira, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. 7th European HIV Drug Resistance Workshop, 25 – 27 March, Stockholm, Sweden, 2009.
3. Primary drug antiretroviral resistance and HIV – 1 subtype among antiretroviral – naïve patients immediately before starting haart in Santos, Brazil. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. International Aids Conference, Mexico city, Mexico, 2008.
4. Estudo comparativo da avaliação imunológica e virológica dos pacientes recém diagnosticados pelo HIV – 1 Santos – São Paulo – Brasil. Rafael Gonçalves de Azevedo*, Marcos Montani Caseiro, Luiz Henrique Gagliani*. Revista “The Brazilian Journal of Infectious Diseases”, Volume 11, Supplement 2, October 2007. p. 21 - ISSN 1413-8670.
5. Primary drug antiretroviral resistance and HIV – 1 subtype among antiretroviral naïve patients immediately before starting haart in Santos, Brazil. Luiz Henrique Gagliani*, Wagner Alkmim, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. Brazilian Aids Research Conference. Itapema, Santa Catarina, Brazil, 2007.
6. Avaliação imunológica e virológica inicial dos pacientes diagnosticados pelo HIV – 1 no CRAIDS – Santos – São Paulo – Brasil. Luiz Henrique Gagliani*, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; II Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa e I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagem – Campos de Jordão – São Paulo – Brasil. 2007.
7. Prevalência das doenças diagnosticadas até 2005 nos pacientes que iniciaram o tratamento do HIV – 1 (2000 e 2001) matriculados no CRAIDS – Santos – São Paulo – Brasil. Luiz Henrique Gagliani*, Dercy José de Sá Filho, Marcos Montani Caseiro, Ricardo Sobhie Diaz. XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical; II Encontro de Medicina Tropical dos Países de Língua Portuguesa e I Encontro da Sociedade Brasileira de Medicina de Viagem – Campos de Jordão – São Paulo – Brasil. 2007.

ANEXO D - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 18 de maio de 2007.
CEP 0500/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) LUIZ HENRIQUE GAGLIANI

Co-Investigadores: Marcos Montani Caseiro; Dercy José de Sá Filho; Marta Soares; Wagner Tadeu Alkimin Maia e Érika Etsuko Fusuma; Ricardo Sobhie Diaz(orientador)

Disciplina/Departamento: Doenças Infecciosas e Parasitárias/Medicina da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Fapesp.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Estudo da resistência genotípica primária aos antiretrovirais nos pacientes diagnosticados pelo HIV- no Município de Santos**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: .

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: sem contato com o paciente.

OBJETIVOS: Determinar a prevalência de subtipos de HIV -1 no município de Santos, baseada na análise da seqüência genética do gene pol.

Determinar a prevalência de cepas do HIV-1 resistente em indivíduos que ainda não iniciaram tratamento antiretroviral.

RESUMO: Serão selecionadas amostras(cepas) de pacientes diagnosticados com o HIV-1 do município de Santos, no período de 2000 e 2001 que foram submetidas ao exame de quantificação da carga viral. As amostras encontram-se armazenadas em freezer -70 no Laboratório Molecular - CRAIDS em Santos. Para a determinação dos subtipos do HIV-1 e a Genotipagem dos pacientes virgens de tratamento aos antiretrovirais, o RNA das amostras será extraído convertido com cDNA, amplificado e, posteriormente, sequenciado, que serão realizados nos laboratórios de retrovirologia da DIPA da Unifesp e no Laboratório de Biologia Molecular do centro Universitário Lusíadas UNILUS.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: desenvolvimento de forma diagnóstica laboratorial, de levantamento genético e de formas de promoção de saúde

Avallar a circulação subtipos e de cepas de HIV resistentes aos anti-retrovirais.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos laboratoriais.

TCLE: não se aplica.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp.

CRONOGRAMA: 48 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: doutorado.



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 17/5/2008 e 17/5/2009.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo



PREFEITURA MUNICIPAL DE SANTOS
Estância Balneária
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE



LABORATÓRIO BIOLOGIA MOLECULAR - SECAIDS

Santos, 10 de abril de 2007

Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP/EPM
A/C Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana


Prezado Professor Medina,

Autorizo o Biólogo Luiz Henrique Gagliani, a utilizar as amostras congeladas em freezer -70°C , que estão estocadas em nosso Laboratório de Biologia Molecular – CRAIDS, no qual ele é responsável, para o projeto intitulado “Estudo da Resistência Genotípica Primária aos Antiretrovirais nos Pacientes Diagnosticados pelo HIV – 1 no Município de Santos” do período de 2000 e 2001 que foram realizadas a quantificação da Carga Viral pela rede Laboratórios. Esse estudo será importante para conhecermos melhor a epidemiologia molecular do vírus HIV – 1 em nossa cidade.

Informo que esse projeto será para obtenção do doutoramento do senhor Gagliani na UNIFESP, no qual está matriculado. Ele já vem monitorando esses pacientes desde o início do seu diagnóstico pelo HIV – 1. Salientamos que possuímos as iniciais, características sócio-demográficas e o esquema terapêutico que os pacientes vem fazendo ao longo do tempo, até a presente data, no qual será mantido o mais absoluto sigilo.

Sem mais, encontro-me à disposição para qualquer esclarecimento que se fizerem necessário.

Atenciosamente,


Dr. Alcino Antonio Campos Golegã
Diretor – CRAIDS – PMS

RECEBI
13/04/07
Chouf

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](#)