

CELINA MARIA PEREIRA DE MORAES SOARES

**PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA
DO HIV-1 AOS ANTIRRETROVIRAIS NO BRASIL,
PRÉ- INÍCIO DE TRATAMENTO.**

**Tese de doutorado apresentada à
Universidade Federal de São Paulo
para obtenção do título de doutor
em Ciências.**

**SÃO PAULO
2011**

CELINA MARIA PEREIRA DE MORAES SOARES

**PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA
DO HIV-1 AOS ANTIRRETROVIRAIS NO BRASIL,
PRÉ- INÍCIO DE TRATAMENTO.**

**Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz
Orientador**

**Dra. Shirley Cavalcante Vasconcelos Komninakis
Co-Orientadora**

**SÃO PAULO
2011**

Soares, Celina Maria Pereira de Moraes
Prevalência de resistência transmitida do HIV-1 aos antirretrovirais no
Brasil, pré- início de tratamento.
Celina Maria Pereira de Moraes Soares - São Paulo - SP - Brasil - 2011.
140f., XI.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo.
Programa de Pós-graduação em Infectologia

Título em Ingles: *Prevalence of transmitted HIV-1 antiretroviral resistance*
in Brazil, among patients initiating antiretroviral therapy.

1 HIV-1., 2. Epidemiologia molecular, 3. Resistência transmitida, 4. Pacientes
crônicos pré-terapia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECTOLOGIA**

Prof. Arnaldo Lopes Colombo

Pró-Reitor de Pós-Graduação e Pesquisa

Prof. Reinaldo Salomão

Chefe do Departamento de Medicina

Prof. Dr. Eduardo Alexandrino Sérvolo de Medeiros

Chefe da Disciplina de Infectologia

Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Infectologia

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo N° 2007/54923-1.

*Aos que aprendem a qualquer tempo, inovam e sabem
compartilhar a busca de novas conquistas.
Aos verdadeiros pesquisadores e cientistas.
Ao mais valioso bem que nos foi legado, à simplicidade
deste momento: à vida.
Aos verdadeiros e melhores amigos.*

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. Ricardo Sobhie Diaz, por me possibilitar a realização desse projeto, pelo incentivo e apoio constantes e por me confiar outras tantas oportunidades.

À Dra. Shirley Vasconcelos Komninakis pela amizade e sua extrema disponibilidade, dedicação e boa vontade.

Ao Dr. Luis Mário Janini, Dra. Maria Cecília Araripe Sucupira e ao Jean Paulo Lopes Zukov, pelo auxílio com o delineamento do estudo dos subtipos do HIV.

Aos coinvestigadores Flávio Pereira (Manaus-AM), José David Urbaez Brito (Brasília-DF), Carlos Brites (Salvador-BA), Tânia Regina Constant Vergara (Rio de Janeiro-RJ), Marcos Montani Caseiro (Santos-SP), Gorki Grinberg, Carlos Correa e Ricardo Oliveira (Itajaí- SC), Cynara Carvalho Nunes e Theodoro Suffert (Porto Alegre-RS), obrigada pela participação e amizade. A todos que direta ou indiretamente participaram da realização do estudo.

À toda a equipe do Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo pelos bons momentos de convivência. E, em especial,, ao Centro de Genomas, em nome da Dra. Cythia Villena, Cláudia Gomes, Karina, Risia e Kelly, extensivo a toda equipe do CATG, pelo apoio logístico imprescindível para a finalização desse projeto

Ao Bruno Scarpellini, um amigo especial que tive a oportunidade de conhecer.

Ao Charlys Antonio da Costa pelo apoio constante e amizade.

Aos meus familiares, em especial ao Cláudio e aos filhos Juliana e Ricardo, incluindo a pequena Olívia, Leonardo e Lorayne. Obrigada pelo incentivo e compreensão.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	iii
RESUMO.....	viii
ABSTRAT.....	ix
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	2
CAPÍTULO 2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA, CICLO VIRAL, ORIGEM E	
CLASSIFICAÇÃO DO HIV.....	8
2.1.1. Características estruturais e genômicas.....	8
2.1.2. Ciclo viral.....	12
2.1.2.1. Etapa inicial do ciclo viral.....	12
2.1.2.2. Ciclo viral: fase tardia (<i>late-phase</i>).....	15
2.1.3. Origem filogenética do HIV.....	18
2.1.3.1. Variabilidade genética viral, subtipos do HIV.....	19
2.2. EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV.....	22
2.3. TERAPIA ANTIRRETROVIRAL, CLASSES DE ANTIRRETROVIRAIS,	
ESQUEMA TERAPÊUTICO INICIAL E FALHA TERAPÊUTICA.....	26
2.3.1. Terapia antirretroviral (TARV).....	26
2.3.2. Classes de antirretrovirais.....	28
2.3.3. Esquema terapêutico inicial.....	30

2.3.4. Falha terapêutica.....	32
2.4. FATORES DE RISCO DE TRANSMISSÃO DO HIV.....	33
2.5. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO DO HIV-1 NO MUNDO, NA AMÉRICA LATINA E NO BRASIL	34
2.5.1. Epidemiologia mundial do HIV-1.....	34
2.5.2. Epidemiologia da infecção pelo HIV-1 na América.Latina.....	35
2.5.3. Epidemiologia da infecção pelo HIV-1 no Brasil.....	35
2.6. MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E A ORIGEM DAS QUASISPÉCIES DO HIV-1.....	38
2.6.1. Resistência do HIV-1 aos antirretrovirais.....	38
2.6.1.1. Resistência transmitida e resistência secundária.do HIV aos. antirretrovirais	39
2.6. 1.2. Resistência transmitida do HIV-1 aos antirretrovirais.....	42
2.7. PREVALÊNCIA DOS SUBTIPOS DO HIV-1 NA POPULAÇÃO MUNDIAL.....	44
2.7.1. Prevalência de subtipos do HIV-1 no Brasil.....	45
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	50
3.1. OBJETIVOS GERAIS.....	50
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
CAPÍTULO 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	52
4.1. CASUÍSTICA.....	52
4.1.1. Critérios de Inclusão.....	54
4.1.2. Critérios de Exclusão.....	54

4.2. MÉTODOS.....	55
4.2.1. Coleta de dados.....	55
4.2.2. Kits para coleta de amostras de sangue total em .papel-filtro.....	55
4.2.3. Protocolo de orientação de coleta de sangue total em papel-filtro ou <i>dried blood spots</i> (DBS).....	56
4.3. PROCEDIMENTO TÉCNICO-LABORATORIAL.....	57
4.3.1. Protocolo de extração do material genético.....	57
4.3.2. Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i> ou PCR).....	59
4.3.3. Detecção dos produtos amplificados.....	60
4.3.4. Purificação dos produtos de PCR.....	61
4.3.5. Reação de sequenciamento.....	62
4.3.5.1. Precipitação da reação de sequenciamento.....	63
4.4. ANÁLISE DOS DADOS.....	65
CAPÍTULO 5. RESULTADOS.....	69
5.1. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, ANÁLISE DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS E DADOS COMPORTAMENTAIS.....	70
5.2. ANÁLISES DOS SUBTIPOS E MUTAÇÕES TDR DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	74
CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO.....	81
CAPÍTULO 7. CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
ANEXOS.....	131

QUADROS

Quadro 4.1 Maiores populações por região e estados brasileiros.	53
Quadro 4.2 Lista de Controle de Mutações TDR do HIV (Bennett et al, 2009).....	67

FIGURAS

Figura 2.1 Características estruturais do HIV	9
Figura 2.3 Genoma do HIV-1 e respectivas proteínas.....	11
Figura 2.4 Infecção celular pelo HIV.....	15
Figura 2.4 Brotamento viral em célula hospedeira.....	17
Figura 2.5 Ataque do HIV (em vermelho) ao Linfócito T CD4+ (em branco). Microscopia de varredura (x 20.000).....	18
Figura 2.6 Identidade filogenética dos subtipos do HIV-1.....	21
Figura 2.7 . Mapa Mundial e a “Estratégia Global de Prevenção e Acesso a Resistência aos Medicamentos pelo HIV” e localização dos laboratórios que realizam teste de resistência a medicamentos, fevereiro de 2009.....	26
Figura 2.8 Distribuição mundial de subtipos do HIV-1 do grupo M e das formas recombinantes (CRF).....	45

TABELAS

Tabela 4.1 Constituintes da reação e perfil de ciclagem das PCR para detecção dos fragmentos PR e TR.....	60
Tabela 4.2 Repertório de iniciadores da reação de seqüenciamento (POP interno do Laboratório de Retrovirologia).....	62
Tabela 5.1 Características sociodemográficas da população HIV+ pré-terapia, contagem de células T CD4+, carga viral e dados comportamentais	71
Tabela 5.2 Subtipos do HIV-1 na população estudada por região do Brasil.....	74
Tabela 5.3 Classificação das mutações de resistência transmitida pelo HIV-1 aos antirretrovirais e subtipos, por região brasileira e cidade pesquisada.....	75
Tabela 5.4 Resistência transmitida aos antirretrovirais pelo HIV-1 em pacientes virgens de tratamento e indicados a início imediato de TARV	77
Tabela 5.5 Estudo comparativo de pacientes com e sem mutações TDR e prevalência de subtipos por região no Brasil.....	78

ANEXOS

ANEXO I. Parecer do Comitê de Ética Institucional, CEP 0863/07.....	131
ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	133
ANEXO III. Ficha de Investigação dos dados individuais do paciente.....	137
ANEXO IV. Guia de coleta.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - porcentagem
°C - graus Celsius
µg - micrograma
Kb - kilo bases
Log10 - logarítimo na base dez
mL- mililitro
mm³- milímetro cúbico
min - minuto
mM - milimolar
MgCl₂ . cloreto de magnésio
n - número (amostral)
ng - nanograma
nm - nanômetro
pb - pares de base
pH – potencial hidrogenionico
pmoles/µL - picomolar/microlitro
pol - polimerase
qsp - quantidade suficiente para
rpm - rotações por minuto
seg - segundos
U/µL - unidades internacionais por microlitro
3TC - lamivudina
A - adenosina
ABC - abacavir
AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APV - amprenavir
ARV - antirretrovirais
ATV - atazanavir
AZT - zidovudina
C - citosina

CDC - Centro de Controle de Doenças e Prevenção (*Center for Disease Control and Prevention*)

cDNA - DNA complementar

CD4 - linfócito TCD4+

CD8 - linfócito TCD8+

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CRF- forma recombinante circulante (*circulating recombinant form*)

CTA - Centro de Testagem e Acompanhamento

CTR - Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

CV - carga viral do HIV

d4T- estavudina

dATP - desoxiadenina trifosfatada

dCTP - desoxicitosina trifosfatada

ddC - zalcitabina

dGTP - desoxiguanina trifosfatada

DDI - didanosina

DLV - delavirdina

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTPs - deoxinucleotídeos

DRV - darunavir

DST/Aids - Programa de Doenças Sexualmente Transmissíveis/Aids

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

EBO - esquema antirretroviral de base otimizado

EFV - efavirenz

Env - envelope

EPM - Escola Paulista de Medicina

ETR - etravirina

FPV - fosamprenavir

FTC - emtricitabina

FDA - Food and Drug Administration

HIV-1 - vírus da Imunodeficiência Humana tipo-1

HIV-2 - vírus da Imunodeficiência Humana tipo-2
HTLV - vírus linfocitotrópico humano
g - força centrífuga relativa à gravidade
G - guanosina
H₂O - água
HAART - terapia antirretroviral altamente ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy*)
HIV-BResNet - Rede Brasileira para Vigilância de Resistência a Drogas para o HIV-1
I - resistência intermediária a determinado medicamento (laudo do perfil de resistência para os ARV)
IAS - USA – *International Aids Society* dos Estados Unidos da America
IC - intervalo de confiança
IDU ou UDI - Usuário de Droga Injetável
IDV - indinavir
IF - inibidor de fusão
IN ou INT- integrase
IP - inibidores da protease viral
IR – Infecção Recente
ITRN - inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo
ITRNN - inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
LPV - lopinavir
LPV-r - lopinavir com booster de ritonavir
LTCD4 - contagem dos linfócitos T CD4+, em células/mm³
LTR - repetições terminais longas (*Long Terminal Repeat*)
MS - Ministério da Saúde
NAM - mutações aos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos
NFV - nelfinavir
Nef - fator negativo
NVP - nevirapina
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBMC - células mononucleadas do sangue periférico
PT – pré-terapia
PR ou P - protease
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PIC - complexo de pré-integração

R - resistência total a determinado medicamento (laudo do perfil de resistência para os ARV)

r - ritonavir em dose de reforço aos IP

RENAGENO - Rede Nacional de Genotipagem

rev - regulador da expressão viral

RNA - ácido ribonucléico

RNAm - RNA mensageiro

RT-PCR - Reação em Cadeia da Polimerase do Transcrito Reverso

RTV - ritonavir em dose terapêutica

S - sensibilidade total a determinada droga (laudo do perfil de resistência para os ARV)

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia

SIVcpz - Vírus da Imunodeficiência Símia do chimpanzé

SQV - saquinavir

SUS - Sistema Único de Saúde

T - timina

T20 - enfurvitida

TAM 1 - via mutacional 1 dos análogos da Timidina ou timidínicos: 41L, 210W e 215Y

TAM 2 - via mutacional 2 dos análogos da Timidina ou timidínicos: 67N, 70R, 215F, 219QE

TAM 1+2 - qualquer combinação de mutações das duas vias TAM 1 e 2 aos análogos da Timidina ou timidínicos: 41L, 215Y, 210W e 67N, 70R, 215F, 219QE

TARV - terapia antirretroviral

Tat - proteína de transativação

TBE - tri-borato-EDTA

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TDF - tenofovir

TPV - tipranavir

TR - transcriptase reversa

UNAIDS - Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids (Join United Nations Programme on HIV/AIDS)

UNESCO - Organização Educacional Científica e Cultural das Nações Unidas (United Nations Educational Scientific and Cultural Organization)

UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo

URF - forma recombinante única (unique recombinant form)

Vif - proteína viral vif

Vpr - proteína viral r

Vpu - proteína viral u

WHO - Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)

RESUMO

A seleção de mutações de resistência aos medicamentos antirretrovirais pós-falha terapêutica representam um grande desafio para a tomada de decisão de novos esquemas de tratamento na pandemia global. A elevada variabilidade genética do HIV-1 e a seleção de mutações de resistência transmitida a pacientes infectados cronicamente, sem que tenham participado de qualquer esquema terapêutico, tem sido objeto de vários estudos no mundo. Os padrões de resistência são estudados principalmente em países da Europa e Estados Unidos, que apresentam prevalência majoritária do subtipo B. Contudo, estudos que direcionam a seleção de mutações transmitidas aos medicamentos antirretrovirais e em subtipos não-B, assim como em suas formas recombinantes, tem aumentado significativamente em várias regiões do mundo. No Brasil, esses estudos são realizados esporadicamente e em regiões distintas do país e, principalmente, em pacientes recém-infectados. A alta variabilidade genética do HIV-1 no nosso país é representada de forma diversificada, com a presença do subtipo B, seguida do F, e especificamente na região Sul a importante prevalência do subtipo C. O objetivo principal deste estudo está embasado nas características de mutações de resistência transmitida aos medicamentos antirretrovirais pelo HIV-1 no gene *pol*, frações da transcriptase reversa e protease, com análise do perfil mutacional por grupos populacionais de pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1 e não tratados, porém com indicação de início imediato de tratamento. Foram avaliados os pacientes representados nas regiões demográficas do Brasil. A prevalência nacional, resultou em 12,1% de mutações de resistência transmitida aos antirretrovirais pelo HIV-1 (grau intermediário de 5 a 15%) e 70,8% de subtipo B; 15,5% C; 6,4% F; 4,0% BF e 3,0% BC na classificação dos subtipos do HIV-1. Além disso, foram classificadas as prevalências de mutações transmitidas, dos subtipos do HIV-1 e características sociodemográficas, laboratoriais e os dados comportamentais na população HIV positiva pré-terapia por cidade nas cinco regiões brasileiras.

Descritores: 1. HIV-1; 2. Epidemiologia molecular; 3. Resistência transmitida; 4. Pacientes crônicos pré-terapia.

ABSTRACT

The selection of resistance mutations to antiretroviral drugs after failure of antiretroviral therapy represents a major challenge for decision-making of new therapeutic regimens in the global pandemic. The high genetic variability of HIV-1 and the selection of resistance mutations transmitted to patients chronically infected without having participated in the regimen has been the subject of several studies in the world. Resistance patterns are studied mainly in European countries and the United States, which have majority prevalence of subtype B. However, studies that guide the selection of transmitted mutants to antiretroviral drugs and non-B subtypes, and in their recombinant forms, has increased significantly in the several regions of the world. In Brazil, these studies are conducted sporadically and in different regions of the country and specially in newly infected patients. The high genetic variability of HIV-1 is represented in our country so diverse, with the presence of subtype B, followed by F, and specifically in the South region, the prevalence of subtype C. In addition, coexist the prevalence of recombinant forms, where the principal is the subtype BF, followed by BC. The main objective of this study estimate the characteristics of transmitted resistance mutations to antiretroviral drugs in HIV-1 *pol* gene, fractions of reverse transcriptase and protease, with mutational analysis of the profile by a population patients chronically infected with HIV-1 and not treated, but with indication of immediate initiation of treatment. We evaluated the patients represented in the demographic regions of Brazil. The national prevalence resulted in 12.1% of transmitted resistance mutations to antiretroviral (intermediate grade 5% to 15%) and 70.8%, 15.5% C, 6.4% F, 4.0% BF and 3.0% BC in the classification of subtypes of HIV-1. In addition, the prevalence of transmitted mutations, the subtypes of HIV-1 and sociodemographic characteristics, laboratory parameters and behavior data in population HIV-1 positive pre-treatment were classified by the cities in five Brazilian regions.

Descriptors: 1. HIV-1; 2. Molecular epidemiology; 3. Transmitted resistance; 4. Chronic patients pre-therapy

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A pandemia de HIV/aids (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*) permanece com muitos desafios, apesar dos enormes avanços registrados no campo da pesquisa biomédica. Após o reconhecimento do primeiro caso de Aids nos Estados Unidos (Gottlieb *et al*, 1981); a denominação de *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) determinada em 1986, pelo Comitê Internacional em Taxonomia de Vírus I (*International Committee on Taxonomy of Viruses* ou ICTV); a descoberta de um tipo diferente no oriente da África, denominado HIV-2 (Clavel *et al*, 1986), e o desenvolvimento do primeiro teste diagnóstico específico para anticorpos de HIV (1985), em relativamente pouco tempo, estudos moleculares delinearam a estrutura genética, a organização e os mecanismos de replicação viral.

Como um retrovírus, o genoma do HIV é composto por RNA e caracteriza-se por enorme diversidade genética, consequência da sua elevada taxa de mutação, ausência de mecanismos eficientes de correção de erros, altíssima taxa de replicação *in vivo* (aproximadamente 10 bilhões de partículas virais/dia) (Ho *et al*, 1995, Wei *et al*, 1995) e situações de recombinação como parte dos mecanismos naturais de replicação. Segundo as normas internacionais, baseadas principalmente nas propriedades estruturais dos vírus e estabelecidas em 1998 pelo ICTV (NCBI, 2006), os vírus conhecidos como HIV, pertencem à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus*. Estas informações, em conjunto com inúmeros dados sobre a patogênese do HIV, foram essenciais para o rápido desenvolvimento de

medicamentos antirretrovirais (ARV) capazes de limitar a replicação viral e evitar maiores danos ao sistema imunológico dos infectados.

O HIV é subdividido geneticamente em dois tipos: HIV do tipo 1 e do tipo 2, sendo o HIV-1, o mais freqüente no mundo. Todos esses vírus de tipos e subtipos diferentes encontram-se na África, que é berço da pandemia, mas o que circula quase que exclusivamente na América do Norte e Europa Ocidental é o vírus do subtipo B. No Brasil existe uma diversidade um pouco maior, onde temos cerca de 85% de vírus do subtipo B e, em locais como São Paulo e Rio de Janeiro, podemos ter tanto quanto 25% de vírus do subtipo F. No sul do país, há uma alta prevalência do subtipo C, que é de cerca de 50% no Rio Grande do Sul (Soares *et al*, 2003), enquanto a prevalência maior para o subtipo F aumenta em direção ao norte do país.

Esta grande diversidade do HIV-1 é demonstrada em inúmeros estudos epidemiológicos com forte associação geográfica e diferentes subtipos com predominância em diferentes regiões (Buonaguro *et al*, 2007).

O uso de Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (*Highly Active Antiretroviral Therapy* ou HAART) tem reduzido drasticamente a morbidade e mortalidade entre pacientes infectados pelo HIV-1 (Jaggy *et al*, 2003; Palella *et al*, 1998). O sucesso da TARV é frequentemente limitado pela emergência de resistência aos ARV pelo HIV (Richman *et al*, 2004; Tamalet *et al*, 2003). Torna-se importante citar, que os vírus resistentes aos medicamentos podem ser transmitidos à população sã e transformá-los em novos infectados (Erice *et al*, 1993; Masquelier *et al*, 1993). A transmissão de HIV resistente a medicamentos é o maior problema que concerne a saúde pública, podendo ser o

principal fator para elevar as taxas de uso de ARV não efetivos na terapia da aids.

Inúmeros ARV foram desenvolvidos e hoje, contamos com 25 disponíveis no mundo para o tratamento da infecção pelo HIV, o que tem contribuído para a substancial melhora da qualidade de vida dos pacientes respondedores à terapia e para a redução da morbidade e da mortalidade pela aids. Uma terapia bem sucedida pode resultar em acentuada redução da carga viral (contagem de vírions livres no plasma) até níveis indetectáveis (abaixo de 50 cópias/ml), fato que é responsável por reduzir significativamente as chances de transmissão (Relucio e Holodny, 2002).

No Brasil dispomos, atualmente, de 19 ARV, de acordo com o Ministério da Saúde (<http://www.aids.gov.br>), e apesar da disponibilização dos medicamentos e inúmeros benefícios trazidos pela TARV, ainda temos muitas lacunas a serem preenchidas. Além das importantes questões, que envolvem as políticas de prevenção, aconselhamento e acesso irrestrito a TARV, realizado pelo MS, fatores relacionados às características do HIV representam problemas para a erradicação da pandemia. Fato principal encontra-se no desenvolvimento de mutações de resistência pelo HIV aos ARV em pacientes experimentados e em falha terapêutica, que podem transferir esta população a novos indivíduos (resistência transmitida).

A determinação da prevalência de resistência transmitida (anteriormente, denominada resistência primária) em diferentes localidades do mundo é de extrema importância para o monitoramento da epidemiologia molecular do HIV.

Teoricamente, o conhecimento do perfil e os níveis de resistência transmitida, poderiam orientar a terapêutica empírica inicial dos pacientes de determinada área geográfica. Um fenômeno comum relaciona-se ao fato da prevalência de resistência transmitida aos ARV ser maior em pessoas com infecção recente, quando comparadas a pessoas infectadas há mais tempo. A explicação mais razoável para este quadro fenômeno reside no fato de as pessoas que não apresentam infecção recente terem se infectado em uma época em que a exposição aos ARV era mais restrita e dessa forma, a transmissão de vírus resistentes, menos provável. Outra explicação na qual se acreditava até recentemente, para explicar a menor prevalência de vírus resistentes em amostras de pessoas infectadas há longos períodos de tempo era a reversão das mutações na ausência da pressão seletiva dos antirretrovirais. Da mesma forma, quando se suspende o uso de ARV de um paciente em falha de tratamento, e o com vírus resistentes, o vírus do tipo selvagem sobrepuja o crescimento dos vírus resistentes por apresentar melhor *fitness*, ou seja, melhor capacidade adaptativa destes vírus em determinado meio ambiente, então se esperava que o mesmo ocorresse entre as pessoas que se infectassem com vírus resistentes. Não é o que parece acontecer.

Alguns estudos apontam que as TDR persistem por longos períodos de tempo, mesmo na ausência de tratamento (Jain *et al* , 2011, Barbour *et al*, 2004, Little *et al*, 2004, Brenner *et al*, 2003, Wainberg *et al*, 2002). A explicação para esse fenômeno reside no fato de que, no momento que uma pessoa se infecta, ela é contaminada com uma população viral muito homogênea, e não por uma mistura de cepas virais, em um fenômeno conhecido como restrição genética durante a transmissão viral (no inglês: *bottleneck*) (Diaz, 2004). Desta forma, nos casos de

transmissão de vírus resistentes, não haveria uma população de vírus selvagens preeexistentes, que pudesse emergir ao longo do tempo. Mesmo com o aparecimento diário, e ao acaso, de cepas sensíveis no paciente com resistência transmitida, estas não se fixariam pela grande quantidade de cepas mutantes produzidas diariamente nessa pessoa.

A repercussão prática disto está em se detectar as TDR em qualquer momento, uma vez que as cepas com mutações persistiriam. Outra tendência que se observa mundialmente com relação às TDR é o aumento proporcional de resistência aos inibidores de transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) (Grant *et al*, 2002, Little *et al*, 2002b, Ross *et al*, 2004). Esse fenômeno decorre da manipulação preferencial dos pacientes tratados por ITRNN, pelo menos em um momento inicial, e na persistência maior das mutações à essa classe de ARV, mesmo na ausência de pressão seletiva dos medicamentos, uma vez que as mutações relacionadas não proporcionam uma perda significativa da capacidade replicativa do vírus (Wrin *et al*, 2000).

Pelo aspecto pouco previsível e regionalizado da resistência transmitida é, no entanto, difícil prever com segurança as tendências de sua prevalência. Especula-se que em alguns países menos desenvolvidos ela ocorra em ritmo crescente.

Podemos estimar, que caso estejam presentes na população eleita a iniciar terapia, o desconhecimento da existência dessas mutações resultará em falhas da ação medicamentosa em prejuízo da qualidade de vida do paciente portador e maior será a probabilidade de transmissão das cepas resistentes a novos infectados (Diaz, 2004).

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 2. REVISÃO DE LITERATURA

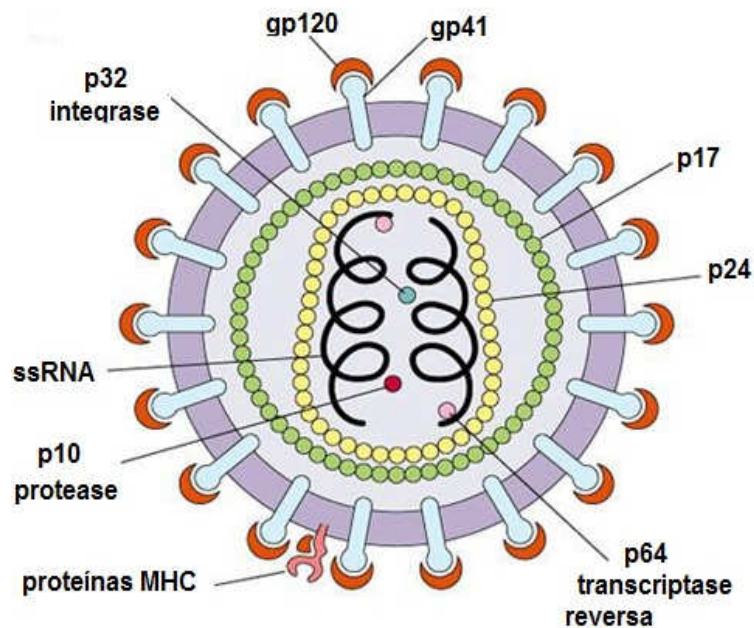
2.1. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA, CICLO VIRAL, ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO HIV

2.1.1 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E GENÔMICAS

O HIV é um vírus de 10nm de diâmetro e de complexidade diferente dos demais vírus, por apresentar um envoltório lipoprotéico, denominado envelope. Este envoltório possui uma região externa, responsável pela afinidade aos receptores celulares e outra interna, em contato com seu interior. A região externa, que compõe sua superfície, contém 72 projeções compostas por trímeros ou tetrâmeros de duas glicoproteínas: *gp120* e *gp41* (Figura 2.1). A *gp120* ou proteína externa da superfície fixa-se ao vírus, através de interações com a *gp41* ou também denominada proteína de membrana. Na *gp120* são encontrados os sítios de ligação aos receptores celulares do hospedeiro e, portanto, representam importantes domínios a serem neutralizados com a finalidade de interromper o ciclo viral. O complexo formado por essas duas proteínas encontra-se imerso em dupla cadeia lipídica, derivada da célula hospedeira e onde existem também inúmeras proteínas celulares, inclusive os antígenos de histocompatibilidade, actina e ubiquitina (Turner & Summers, 1999). Internamente, a composição do envelope possui uma capa protéica com a proteína *p17* ligada ao ácido mirístico. Esta capa é responsável por fornecer a matriz, vital para a integridade do vírion (partícula viral completa), e necessária para a incorporação das proteínas do envelope nos vírions maduros. Dentro deste envelope encontra-se o nucleocapsídeo (conjunto de capsídeo em formato icosaédrico e material genético). O nucleocapsídeo possui estrutura cônica, típica de

Lentivírus, e é formado pela proteína *p24*, além das também proteínas *p6* e *p9* (estas últimas associadas ao material genético) (Schwartz e Nair, 1999).

Figura. 2.1 Características estruturais do HIV



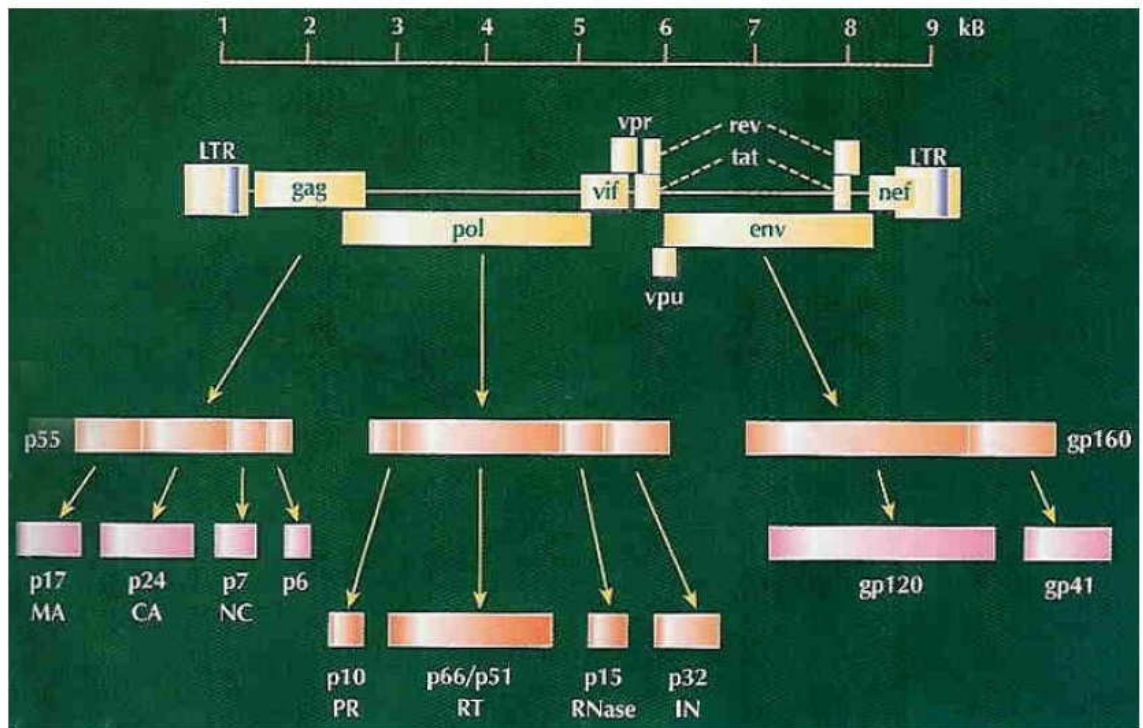
Fonte: <http://www.wikipedia.org>.

O genoma do HIV, como os demais retrovírus, é composto por duas fitas simples de RNA, positivas e idênticas entre si (Wigg, 2002). Há três importantes enzimas virais intimamente associadas a essas fitas de RNA, que são a *transcriptase reversa* (TR), a *integrase* (INT) e a *protease* (P, PR ou PRO), além das proteínas acessórias *nef*, *vif*, *vpr* e as mencionadas proteínas do nucleocapsídeo – *p6* e *p9*. Semelhante a outros retrovírus, a infecção produtiva com o HIV-1 requer três etapas-chave na replicação viral: (i) transcrição reversa do RNA viral em cDNA do genoma viral pela transcriptase reversa viral, (ii) a integração do DNA viral no genoma da célula

hospedeira usando a integrase viral, e (iii) a clivagem do recém-sintetizado polipeptídeo viral pela protease viral em proteínas virais individuais durante a montagem do vírion novo (Jegede *et al*, 2008). Em praticamente todas as etapas do seu ciclo de vida, o HIV-1 tira proveito de fatores da célula hospedeira e dos caminhos para promover a replicação bem-sucedida. No entanto, tornou-se evidente nos últimos anos que a célula hospedeira montou barreiras antirretrovirais sob a forma de fatores de restrição, que prejudicam sensivelmente os passos específicos no ciclo de replicação (Adamson & Freed, 2010).

O genoma do HIV é composto de nove genes (Figuras 2.2) com aproximadamente 9,8 Kb, genes estes que apresentam diversas possibilidades de processamentos alternativos, o que possibilita a síntese de um grande número de diferentes polipeptídeos, proteínas e enzimas. Todos os retrovírus possuem os genes *gag*, *pol* e *env* que tem como função codificar importantes enzimas e proteínas participantes diretas da formação estrutural do vírus ou de seu ciclo. Os outros genes são regulatórios (*tat* e *rev*) e acessórios (*nef*, *vpr* e *vpu*). Longas sequências repetidas ou LTRs (*long terminal repeats*) situam-se nas duas extremidades 5' e 3' (Schwartz & Nair, 1999).

Figura 2.2 Genoma do HIV-1 e respectivas proteínas
(<http://hivmedicine.aidsportugal.com/html>).



Legenda: LTR=repetições terminais longas (*long terminal repeat*); MA=proteína de matriz (p17); CA=proteína de capsídeo (p24); NC=proteína de nucleocapsídeo (p7); PRO=protease; RT=transcriptase reversa; INT=integrase; gp120= proteína de superfície (SU); gp41=proteína transmembrana (TM); *splicing regulatory* em Tat e Rev="emendas" de regulação em Tat e Rev.

O ciclo de replicação do HIV-1 é um processo complexo que depende de dois fatores de células virais e do hospedeiro. A replicação inicia-se com a entrada do vírus na célula-alvo (Adamson & Freed, 2007). A possibilidade de recursos de replicação se condiciona à fusão do envelope lipídico viral à membrana plasmática celular (Doms, 2000; Melikyan, 2008). Importante fator celular é representado pela densidade do receptor CD4 e dos coreceptores CXCR4 e CCR5 na superfície das células alvos. A fusão do envelope viral nas células-alvo só ocorrerá na presença deste conjunto de receptores e coreceptores, podendo ser limitantes tanto para a infecção *in vivo* como *in vitro*. A replicação viral depende da redução de CD4, porque estas células podem interferir com indução de sinais pró apoptóticos, redução da infectividade viral pela

incorporação de receptores de superfície no envelope do vírus e conseqüente fenômeno tóxico celular (a superinfecção) (Wildum *et al*, 2006).

2.1.2 CICLO VIRAL

2.1.2.1 ETAPA INICIAL DO CICLO VIRAL

Há duas etapas no ciclo viral replicativo. A etapa inicial (ou *early phase*) envolve os processos de adsorção, fusão, desnudamento, transcrição reversa e integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (formação do provírus). A etapa seguinte e denominada final (*late phase*) tem como característica a expressão regulada do genoma proviral integrado e todos os processos que conduzem à montagem e maturação do vírus, incluindo os próprios eventos de montagem e maturação (Turner & Summers, 1999).

Adsorção, fusão e desnudamento

O processo de interação do envelope viral com receptores específicos da superfície celular é a adsorção. Duas glicoproteínas do envelope, *gp120* e *gp41*, participam do processo de formação de unidades funcionais triméricas (Peterlin & Trono, 2003). Cada uma dessas unidades é composta por três moléculas da *gp120* expostas na superfície do vírion associadas a três moléculas da *gp41* na superfície das células-alvo. Este processo induz uma alteração conformacional nas proteínas do envelope, que permite ao vírion ligar-se a receptores específicos na superfície celular. O principal receptor é o CD4, mas, além dele, participam coreceptores de quimiocinas,

que podem ser alternativamente o CCR5 ou CXCR4 e um terceiro receptor conhecido como domínio de fusão, que é um glicosaminoglicano na superfície celular.

Uma mudança radical ocorre na conformação da *gp41*, por indução da ligação entre *gp120*, CD4 e o receptor de quimiocina. Arranjada como um trímero na membrana viral, esta proteína se lança projetando três domínios de fusão de peptídeos, os quais se prendem à dupla camada lipídica da célula, formando uma estrutura em forma de grampo e que une as duas membranas (envelope e celular). Essa fusão de membranas induz à liberação do conteúdo viral no interior da célula hospedeira, através de um processo denominado desnudamento. O conteúdo viral é então finalmente introduzido na célula e composto pelo complexo ribonucleoprotéico (duas fitas de RNA, proteínas estabilizadoras e tRNA), *transcriptase reversa*, *integrase*, *protease* e algumas proteínas acessórias – *Nef* (fator negativo) , *Vif* (fator de infectividade viral) e *Vpr* (proteína viral R).

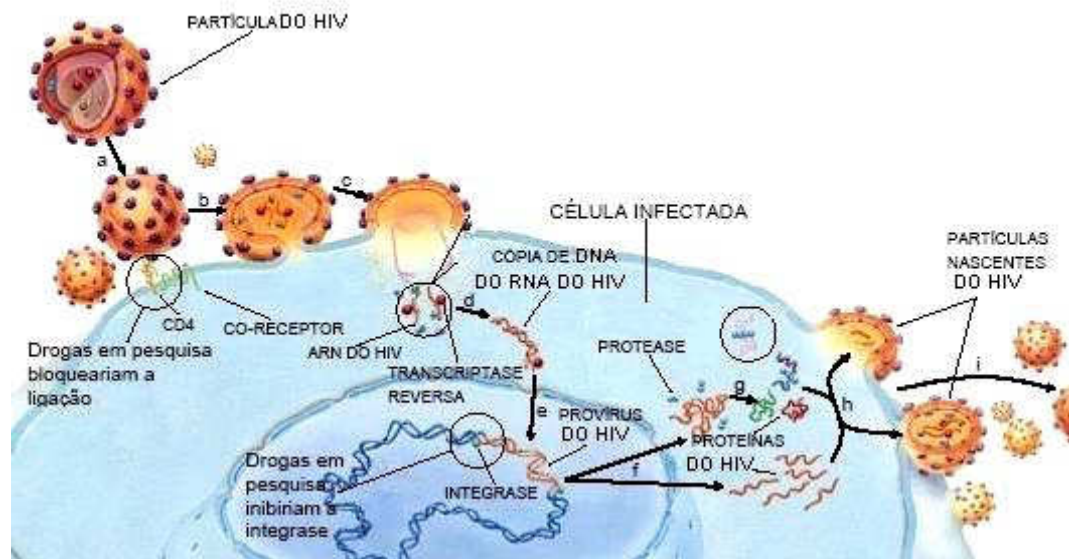
Vif melhora significativamente a infectividade do vírus. *Vpu* estimula a liberação de partículas enxertadas a partir da membrana plasmática e induz a degradação de CD4. *Nef*, que é um importante determinante da patogênese viral e da progressão da doença *in vivo*. O *Nef* realiza a regulação da baixa expressão de superfície de células CD4 e do complexo principal de histocompatibilidade I (MHC-I), modula vias de ativação celular, e aumenta a infecciosidade da partícula. *Vpr* induz parada do ciclo celular, estimula a transcrição de alguns promotores de celulares, influencia a apoptose induzida por vírus, e tem sido relatado para promover a importação nuclear do complexo preintegração (*preintegration* ou PIC), após a transcrição reversa na célula-alvo infectadas (Adamson & Freed, 2007).

Transcrição reversa e integração do genoma viral na célula hospedeira

A síntese de DNA, a partir do RNA genômico viral, ocorre no citoplasma da célula hospedeira (Figura 2.3) e a esta fase, denominamos processo de transcrição reversa. A enzima reacional catalizadora da reação é a TR e utiliza um tRNA viral ou celular como *primer* (Wigg,2002). A transcrição faz com que cada fita de RNA se transforme em uma fita negativa de DNA (cDNA). A TR tem também a função de atuar como uma ribonuclease H degradando o RNA viral, além de levar à síntese da fita positiva do DNA.

A dupla cadeia que constitui o DNA viral final pode ter dois destinos: permanecer no citoplasma na forma circular não integrada ou ser ativamente transportado para o núcleo celular. No segundo caso, o DNA viral faz parte do PIC constituído por uma matriz, pela enzima *integrase* e pela proteína *vpr*. A *integrase* cataliza uma clivagem endonucleolítica chamada processamento da extremidade 3' (3' end process) (*Integrase. HIV Slidset Download Library*, <http://clicaloptions.com>). Neste processo, dois nucleotídeos são removidos da extremidade 3' de cada uma das duas fitas de DNA viral. Após o PIC ter sido interiorizado na membrana nuclear da célula hospedeira, há o contato com o DNA do hospedeiro. Nesta fase, a *integrase* catalisa um processo conhecido como transferência de cadeia de DNA (*DNA strand transfer*). A *integrase* cliva a cadeia de DNA hospedeiro e une a extremidade 3' do DNA viral à extremidade 5' do DNA hospedeiro. Na etapa final, as enzimas celulares reparam a cadeia de DNA, resultando em uma total integração do DNA viral ao DNA hospedeiro.

Figura 2.3 Infecção celular pelo HIV-1.



Legenda: Esquema do ciclo de replicação do HIV que começa quando o vírus se liga a superfície celular (a) funde-se à membrana celular (b) e libera seu conteúdo dentro do citoplasma da célula hospedeira (c). Depois, a enzima de transcriptase reversa do HIV copia o material genético viral a partir do RNA em DNA de filamento duplo (d), o qual será unido ao DNA celular pela enzima de integrase do HIV (e). Usando-se do DNA integrado, ou provírus, como uma matriz, a célula produz RNA e proteínas virais (f). Uma terceira enzima, a protease do HIV, parte as novas proteínas (g), habilitando-as a juntar o RNA em novas partículas virais (h) que brotarão da célula (i) e infectarão outras (j) (adaptado de www.sciam.com).

2.1.2.2 CICLO VIRAL: FASE TARDIA (LATE PHASE)

Nesse momento, a expressão gênica tem início com a síntese de transcritos (mRNA) processados ou não, que são transportados por translação para fora do núcleo. As proteínas regulatórias *Tat*, *Rev* e *Nef* são codificadas pelas primeiras moléculas de RNA processadas. A proteína *Tat* é uma ativadora importante dos processos transcripcionais, enquanto a *Rev* é a responsável por mediar a saída de mRNA não processados (idênticos ao RNA viral) e mRNA com um único processamento. Em ambas as situações, os transcritos possuem informações necessárias para a síntese e

empacotamento no citoplasma das proteínas *Gag* e *Gag-Pol* e nas proteínas *Env*, *Vpu*, *Vif* e *Vpr*.

Síntese das poliproteínas virais: *Env*, *Gag* e *Gag-Pol*

A síntese da poliproteína precursora das proteínas do envelope – *Env* (*gp160*) ocorre nas membranas do retículo endoplasmático rugoso (RER), utilizando-se do código processado do gene *env*. A poliproteína *Env* é submetida a uma transformação pós-translacional no RER e sofre uma clivagem no aparelho de Golgi para traduzir o complexo glicoproteína trimérica (*gp41-gp120*)₃. Este complexo é, em seguida, transportado para a membrana celular para dar início à montagem do vírus (Wigg, 2002). As moléculas de RNA não processadas (idêntico ao RNA viral) são traduzidas em poliproteínas *Gag* e *Gag-Pol* nos ribossomos livres.

Montagem da partícula viral

Moléculas de poliproteínas virais (*Gag* e *Gag-Pol*) reúnem-se no citoplasma a duas moléculas de mRNA não processado e migram para as regiões de acúmulo de glicoproteínas do complexo (*gp41-gp120*)₃. O domínio miristilado das proteínas *Gag* conduz a uma ligação com a membrana celular e interage com a cauda citoplasmática da *gp41*. Nesta fase, entre 1200 e 2000 cópias de proteína *Gag* se aproximam para formar uma partícula imatura, que empacota duas cópias de mRNA não processado.

Brotamento e maturação

A forma de liberação da partícula imatura é por brotamento (Figura 2.4). A exteriorização da partícula imatura para o ambiente extracelular propicia a auto-ativação

da protease que, após ser ativada, promove a clivagem de precursores *Gag* e *Gag-Pol* durante a maturação. A produção viral infectante depende de um conjunto de elementos estruturais fora da célula hospedeira. A ativação da protease no interior da célula levaria à clivagem das poliproteínas e liberação das proteínas estruturais, RT e integrase em ambiente que não permitiria a produção dos vírions infectantes. A proteína *Gag*, que foi sintetizada em forma de uma proteína precursora *p55*, sofre a adição do ácido mirístico e clivagens para originar as proteínas *p24*, *p17*, *p9* e *p6* na fase de maturação. A poliproteína precursora *Gag- p160* sofre a adição do mesmo ácido e clivagem originando as mesmas quatro proteínas *p24*, *p17*, *p9* e *p6*, além as enzimas RT, protease e integrase. As proteínas estruturais são submetidas a rearranjos e a partícula viral ou vírion adquire seu formato cônico (Adamson e Freed, 2007). A liberação dos vírions implicará na infecção de novas células T CD4+ (Figura 2.5)

Figura 2.4 Brotamento viral em célula hospedeira

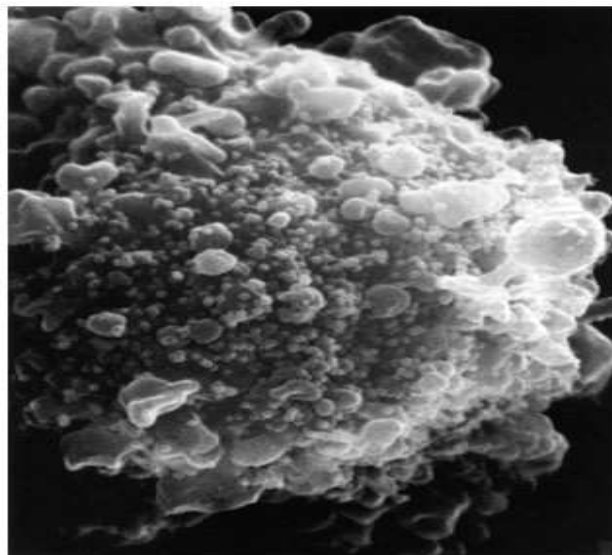


Fig. 2.5 Ataque do HIV (em vermelho) ao Linfócito T CD4+ (em branco). Microscopia de varredura (x 20.000).



<http://ciencianews.com.br/imgcien/uni-cel4/uni-cel402.htm>

2.1.3 ORIGEM FILOGENÉTICA DO HIV

Análises filogenéticas realizadas em diversas partes do globo revelam que existem dois tipos de HIV chamados de HIV-1 e HIV-2. As evidências indicam que o vírus entrou na população humana, a partir de transmissões zoonóticas do Vírus da imunodeficiência de símios (SIV) entre primatas não humanos e humanos (Gao *et al*, 1999; Hahn *et al*, 2000).

O HIV-1 é filogeneticamente mais próximo do SIV de chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), enquanto o HIV-2 está mais relacionado ao SIV encontrado em macacos mangabeus fuligentos (*Sooty mangabey*). A transferência de lentivirus de outras espécies de primatas não humanos a humanos pode ocorrer periodicamente por meio do contato estreito como, por exemplo, por meio da caça e exportação desses

animais. O ancestral do HIV-1 foi estudado por meio do SIV_{cpz} infectando chimpanzés no Oeste da África Central, mas a origem de SIV_{cpz} permanece desconhecida (Gao *et al*, 1999; Peeters *et al*, 2001). Os retrovírus infectam animais e podem estar associados ao câncer e a doenças imunossupressoras (Gallo, 2002).

2.1.3.1 VARIABILIDADE GENÉTICA VIRAL E SUBTIPOS DO HIV

O HIV-1 exibe um extraordinário grau de variabilidade genética e tem sua classificação baseada nas relações filogenéticas entre os vírus em três grupos distintos (Robertson, 2000). A análise filogenética conduziu à classificação do HIV-1 em grupos, subtipos, subsubtipos e formas recombinantes circulantes (CRF). Três grupos distintos foram descritos: M, N e O. O grupo M (*major* ou *main*) , o qual contém a maioria dos subtipos da pandemia do HIV-1; grupo O (*outline*), assim como o grupo N (*new* ou *non-M, non-O*), que compreendem cepas altamente divergentes. Em 2009, Plantier e colaboradores descreveram um novo vírus da imunodeficiência humana em uma mulher camaronesa. Ele está intimamente relacionado com o gorila através do vírus da imunodeficiência símia (SIV_{gor}) e não apresenta qualquer evidência de recombinação com outras linhagens do HIV-1. O novo vírus parece ser o protótipo de uma nova linhagem do HIV-1, que é diferente do HIV-1 grupos M, N e O e foi designado como HIV-1 do grupo P. São aguardados novos relatos de pacientes contaminados com esse subtipo para que a classificação seja definida.

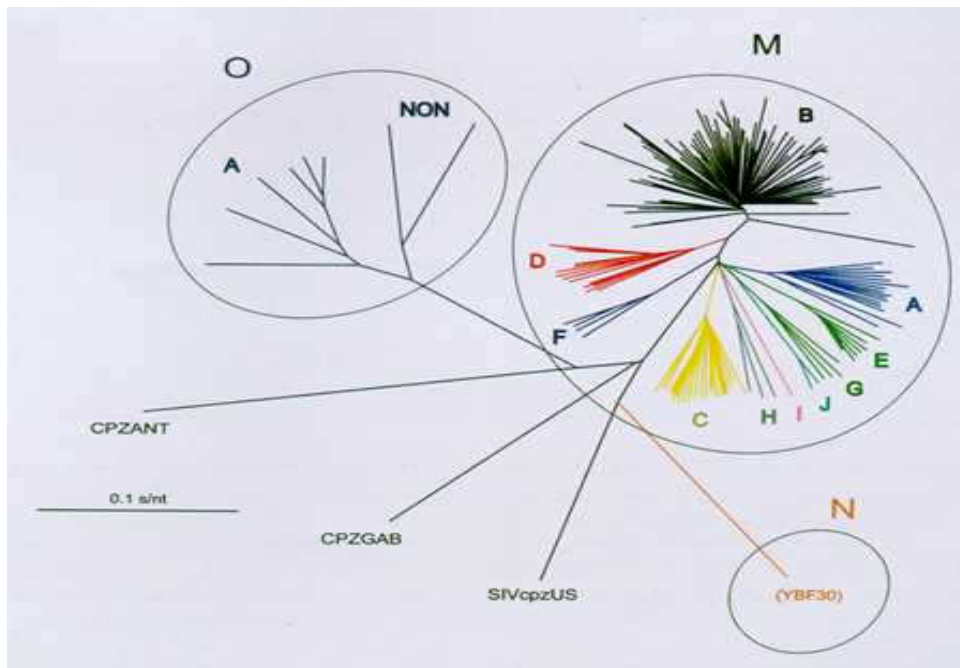
A grande maioria das cepas responsáveis pela pandemia da AIDS pertence ao grupo M, tendo sido identificados nove subtipos genéticos (A-D, F-H, J, e K), quatro sub-subtipos (A1, A2, F1 e F2) e das formas recombinantes circulantes (CRF) caracterizadas no mundo, sendo as mais comuns as CRF02_AG e CRF01_AE

(Robertson *et al*, 1999; Pinto & Struchiner, 2006). Cinco CRF foram caracterizadas no Brasil: CRF_28_BF e CRF_29_BF em São Paulo (De Sá Filho *et al*, 2006); CRF_31_BC no Rio Grande do Sul (Santos *et al*, 2006); CRF_02_AG no Rio de Janeiro (Eyer-Silva & Morgado, 2007) e CRF_46_BF em São Paulo (Sanabani *et al*, 2010).

De forma similar, os isolados de HIV-2 também são classificados em subtipos genéticos, podendo ser categorizados como subtipos epidêmicos (A e B) e como subtipos não-epidêmicos (C, D, E, F e G) (Lemey *et al*, 2003). O subtipo HIV-2 apresenta uma única forma recombinante, a A/B, (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CFRs/CRFs.html>).

Como referido no capítulo anterior, a existência de pelo menos três grupos do HIV-1 e sete subtipos do HIV- 2 sugere que a transmissão zoonótica do SIVcpz e SIVsm a humanos, embora rara, tenha ocorrido em baixas taxas por milhares de anos (Gisselquist, 2003). Algumas evidências demonstram que a diversificação de todos os subtipos do grupo M, ocorreu em tempos recentes, há mais ou menos 50 anos atrás. As análises evolucionárias dos grupos M, N e O, em comparação aos isolados de SIVcpz, indicam que esses grupos do HIV-1 representam três transferências distintas de chimpanzés a humanos (Weiss & Wrangham, 1999) (Figura 2.6).

Figura 2.6 Identidade filogenética dos subtipos do HIV-1



Uma CRF é estabelecida quando um vírus recombinante é identificado em pelo menos três indivíduos epidemiologicamente não relacionados (Robertson, 2000). Estes vírus observados devem apresentar estruturas coincidentes e agrupamento filogenético consistente e estudados em pelo menos 2 genomas completos para que sejam considerados CRF. A formação de retrovírus recombinantes requer que dois vírus infectem uma mesma célula, sequencialmente ou simultaneamente, em múltiplos eventos de transmissão (Nájera *et al*, 2002). Mais uma condição necessária, é o empacotamento dos dois genomas de RNA em cada vírion, o que resulta na produção de partículas “híbridas”. Esta formação recombinante pode ocorrer no próximo ciclo de infecção, através da leitura alternada (*alternative jumps*) executada pela TR entre ambos os genomas coempacotados.

A identificação de subtipos e de CRF fornece meios de acompanhar a disseminação do HIV-1 seguindo a pandemia pelo mundo. A maioria dos subtipos e

CRF está presente no continente africano, visto que em outras regiões poucos subtipos ou CRF são predominantes. Esta distribuição sugere, indiretamente, que a propagação inicial do HIV-1 para o exterior da África foi iniciada por poucos indivíduos. A disseminação inicial da pandemia, em uma área previamente não infectada, é geralmente caracterizada por um efeito fundador. O autor cita a influencia dos viajantes, que contribuem com o crescimento da diversidade do HIV no mundo e acrescenta, que o desenvolvimento do mundo com a migração da população rural e guerras civis,

também representam fatores adicionais de contribuição para diversidade viral. A elevação de variantes do HIV-1 tem ainda implicações no diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas (Perrin *et al*, 2003).

O HIV-1 apresenta extensa variabilidade genética devido à alta taxa de erros da TR, à rápida circulação de vírus em indivíduos infectados, além da possibilidade de recombinação gerada por pressão da resposta imune do hospedeiro e por medicamentos antivirais (Gadelha *et al*, 2003).

2.2. EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO PELO HIV

A infecção pelo HIV é uma doença infectocontagiosa de evolução crônica e progressiva, caracterizada por definir em seu estágio final as infecções oportunistas, neoplasias e outras diversas manifestações clínicas decorrentes do grave comprometimento do sistema imunológico do paciente. O alvo principal da infecção pelo HIV é o CD4 e sua contagem no sangue periférico, tem estreita relação com a deficiência imunológica do paciente, funcionando como marcador de prognóstico (Mellors, 1998). Uma vez que a evolução natural da infecção pelo HIV caracteriza-se por contínua replicação viral, com conseqüente destruição ou disfunção dos CD4, a

dinâmica da replicação viral em cada indivíduo constitui fator prognóstico importante em relação à velocidade da evolução para o quadro clínico de aids (Levy, 1996). Assim, classicamente a quantificação das partículas virais circulantes (carga viral ou CV), por meio da medição dos níveis de RNA do HIV-1 no plasma, passou a ter papel central no seguimento clínico de pacientes infectados pelo HIV (Mellors, 1998).

A evolução do quadro de infecção pelo HIV pode variar amplamente de indivíduo para indivíduo e possui duas fases distintas: aguda e crônica. Uma das principais diferenças entre elas está relacionada com a CV. O valor da CV na fase aguda pode atingir alguns milhões de cópias/ml. Após um período variável, ocorre um *set-point* e esse valor geralmente decresce. Quanto mais alta a CV no *set-point*, mais rápida a progressão da doença (Fraser *et al*, 2007). A transmissibilidade tem relação direta com a CV, portanto a fase aguda assume um importante papel na transmissão do HIV, uma vez que a CV neste período é sempre elevada (Wawer *et al*, 2005). Quanto maior, mais elevada será a probabilidade de transmissão. Quando o valor fica abaixo de 1.700 cópias/ ml, as chances de transmissão são muito baixas. Entretanto, não é raro que indivíduos infectados mantenham cargas altas, mesmo após a redução característica, após o *set-point*.

Após a infecção primária os pacientes geralmente permanecem assintomáticos e outros podem desenvolver, entre 3 e 6 semanas, uma síndrome aguda semelhante à mononucleose infecciosa denominada síndrome retroviral aguda com a presença de elevadas taxas de replicação viral e viremia plasmática, porém com redução importante da contagem de CD4 no sangue periférico (Mendonça *et al*, 1989; Tindal, 1991).

Na fase pós-infecção primária são produzidos os primeiros anticorpos específicos, caracterizando a fase de soro-conversão do paciente (Gaines *et al*, 1990). Em função da resposta imune do hospedeiro nessa fase, há a redução da taxa de

replicação viral, da contagem de CD4 no sangue periférico, que volta aos índices normais ou próximos do normal, e o portador do HIV entra em um longo período de latência clínica, inicia-se um longo período de infecção assintomática, que pode durar de 8 a 12 anos (Gaines *et al*, 1990; Tindall, 1991).

Há a transmissão também na fase crônica. Um agravante na evolução do processo é a presença de doenças sexualmente transmissíveis, que podem induzir o aumento dos níveis de CV na região genital, sem que ocorra um aumento detectável no sangue. Indivíduos portadores do HIV e também portadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST), tem altas chances de transmitir o HIV, mesmo na fase crônica da doença (Chakraborty *et al*, 2001; Serwadda *et al*, 2003). Num processo crescente inserido na evolução da infecção, as conseqüências como já mencionado são graves ao paciente, com a depleção das células CD4, alvos principais da infecção viral. A diminuição de CD4 pode ser reduzida, prejudicando o reconhecimento da completa gama de antígenos, que potencialmente deveriam ser detectados, permitindo o surgimento de doenças oportunistas (Stevenson, 2003).

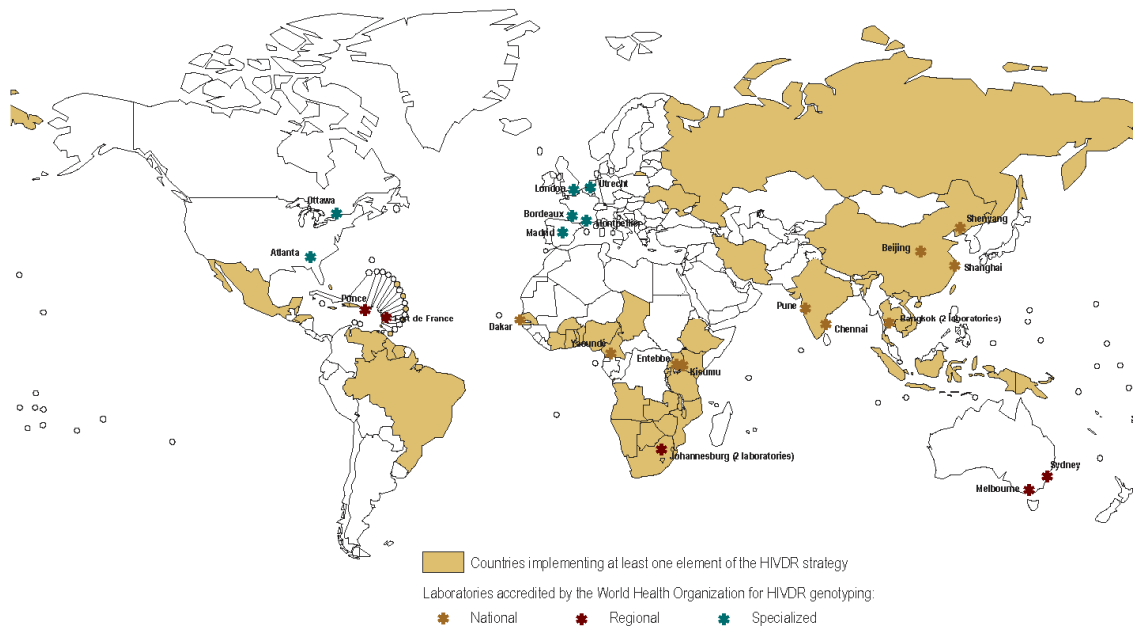
Durante o período de latência clínica, o vírus permanece em replicação com constantes danos ao sistema imunológico, principalmente em relação à quantidade de células CD4, que são reduzidas lenta e progressivamente ao longo do tempo (Fauci, 1991). Este período termina quando o sistema imune do hospedeiro apresenta-se muito debilitado, principalmente no que se refere à imunidade celular. O estágio final da infecção pelo HIV se caracteriza por intensa depleção do sistema imunológico, caracterizando as doenças oportunistas (aids), que levam o indivíduo ao óbito .

Schwartz e Nair, em 1999, referiram que na evolução do quadro de aids surgem uma série de respostas imunes no 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 Natural Killer (NK) e imunidade celular dependente de anticorpos, entre outras. Todos esses mecanismos imunológicos objetivando conter a infecção pelo HIV são ineficientes devido a mecanismos de escape do vírus.

Os pacientes sintomáticos são aqueles que apresentam condições definidoras de aids especificadas nas “Recomendações para TARV em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV” (MS, 2008; [http:// www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br)). A figura 2.7 representa o mapa mundial dos países que adotam pelo menos uma das orientações preconizadas pela Organização Mundial de Saúde para a Estratégia Global de Prevenção e Determinação de Resistência do HIV a Medicamentos Antirretrovirais e a localização dos laboratórios, que realizam teste de Resistência a medicamentos, atualizado em fevereiro de 2009 (WHO, 2011).

Figura 2.7 Mapa Mundial e a “Estratégia Global de Prevenção e Acesso a Resistência aos Medicamentos pelo HIV” e localização dos laboratórios que realizam teste de resistência a medicamentos, fevereiro de 2009 (<http://www.oms.org>).



Fonte: WHO, 2011

2.3 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL, CLASSES DE ANTIRRETROVIRAIS, ESQUEMA TERAPÊUTICO INICIAL E FALHA TERAPÊUTICA

2.3.1 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL (TARV)

A TARV tem como objetivo, a redução da capacidade replicativa do vírus ao mais baixo nível possível, prevenindo a infecção de novas células e maiores danos ao sistema imunológico. A redução ideal da CV a níveis abaixo de 50 cópias/ml (Hammer

et al, 2006) e mantê-los nesse patamar pelo maior tempo possível permite melhora na qualidade de vida dos pacientes e redução de infecções oportunistas. No seguimento periódico dos pacientes em TARV, a CV indetectável (<50 cópias/mL) após 24 semanas de terapia tornou-se o parâmetro de avaliação a ser atingido. Pelas metodologias laboratoriais mais antigas, a CV plasmática era definida como indetectável se presente em níveis menores que 400 cópias/mL. Atualmente, exames ultrassensíveis podem mensurar a carga viral em níveis próximos a 20 cópias/mL (<http://www.cdc.gov/globalaids>). Evidências acumuladas sugerem que tratamentos capazes de reduzir a CV para níveis inferiores a 50 cópias/mL estão associados com supressão viral mais sustentada, se comparados a tratamentos que mantêm carga viral entre 50 e 500 cópias/mL. Ressalta-se que a redução do RNA viral plasmático para níveis indetectáveis limita a seleção de vírus resistentes às medicações (Hammer *et al*, 2006).

Os atuais parâmetros utilizados para início da TARV foram publicados pelo Programa Nacional de DST e Aids nas “Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV” em 2008, referidos no site (<http://www.portal.saude.gov.br>). O guia determina que a contagem de CD4 define o risco de progresso para a aids e morte; portanto, é o principal indicador laboratorial em pacientes assintomáticos, para determinar o momento de iniciar a terapia. A CV também deve ser considerada para este grupo, como um auxiliar para a decisão sobre quando iniciar o tratamento, quando a contagem de CD4 estiver entre 350 e 200 cel/mm³. Ainda sob informação da publicação, a TARV somente deverá ser iniciada com avaliações laboratorial e clínica, determinantes para avaliação do grau de imunodeficiência existente e risco da progressão da doença. A contagem de CD4 como marcador principal, reduz a necessidade de avaliações de CV com intervalo inferior a 6 meses

para indivíduos virgens de tratamento e com contagem de CD4 acima de 500 células/mm³. Está indicado iniciar TARV, para pacientes assintomáticos com CD4 entre 200 a 350 cel/mm³, sendo que, quanto mais próximo de 200 cel/mm³, maior risco de desenvolver a aids, principalmente, se associado à CV plasmática elevada. Para pacientes sintomáticos, independente dos parâmetros laboratoriais, há a indicação da terapia (MS, 2010; <http://www.portal.saude.gov.br>).

2.3.2 CLASSES DE ANTIRRETROVIRAIS

O objetivo dos ARV é o de suprimir a replicação do HIV em diferentes alvos moleculares e são capazes de afetar o ciclo viral em suas diversas fases. Os ARV são classificados em cinco categorias, sendo duas de inibidores de TR, contando com os ITRN e ITRNN; uma para IP, uma para inibidores de entrada e uma de inibidores de INT. As duas últimas classes citadas apresentam dois e um inibidores aprovados, respectivamente, e diversos medicamentos em fase de estudo (MS, 2010; <http://www.aids.gov.br>; <http://www.portal.saude.gov.br>)).

INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS

Os ITRN apresentam uma estrutura química constituída de uma versão modificada de um nucleosídeo natural. A ação deste grupo de medicamentos suprime a replicação viral através da interferência na ação da enzima TR. Os inibidores desta classe de medicamentos são precursores que sofrem trifosforilação pelas enzimas celulares hospedeiras. As formas trifosfatadas competem com os deoxinucleosídeos naturais (dNTP) pela incorporação nas novas cadeias de DNA sintetizadas, onde

provocam a terminação prematura destas cadeias. Essa classe de medicamentos conta com a zidovudina (AZT), didanosina (DDI), didanosina EC, estavudina (d4T), lamivudina (3TC), abacavir (ABC) e tenofovir (TDF), sendo este último o único análogo de nucleotídeo por se tratar de um fosfato do nucleosídeo acíclico (nucleotídeo) análogo da adenosina 5-monofosfato (<http://aids.about.com/od/hivaidslattern/g/nrt.htm>; MS, 2010).

INIBIDORES DA TRANSCRIPTASE REVERSA NÃO ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS

Este grupo de medicamentos tem ação específica sobre o HIV-1, porém os ITRNN de primeira geração não apresentam ação sobre o HIV-2 (<http://aids.about.com/od/hivaidslattern/g/nrt.htm>). Os ITRNN são uma classe de medicamentos com compostos estruturalmente diversos, que se ligam próximos ao sítio catalítico da RT do HIV-1. Como inibidores não competitivos da RT, sua atividade ARV é aditiva e sinérgica com a maioria dos outros ARV. Porém, quando adotados com IP, os medicamentos devem necessitar ajustes de dosagens (<http://aids.about.com/od/hivaidslattern/g/nrt.htm>). No Brasil utilizam-se os seguintes ITRNN: nevirapina (NVP), efavirenz (EFV) e etravirina (ETV) (Hamall *et al*, 2010).

INIBIDORES DE PROTEASE

Os IP pertencem a uma classe de compostos peptidomiméticos que se ligam ao sítio ativo da enzima. Os IP bloqueiam a produção de vírus infecciosos de células infectadas, através da clivagem das poliproteínas precursoras, necessária para produzir vírions. As partículas, produzidas por células tratadas com IP, apresentam precursores não processados e não tem a característica de infectar novas células (Peng *et al*, 1989).

É recomendado que os IP sejam utilizados em combinação com, pelo menos, outros dois ARV para um tratamento eficaz da infecção. Estão disponíveis no Brasil: ritonavir (RTV), saquinavir (SQV), indinavir (IDV), amprenavir ((APV), lopinavir/r cápsula e lopinavir/r comprimido (LPV/r), atazanavir ((ATV), fosamprenavir (FPV), darunavir (DRV) e tipranavir (TPV) (Sturmer *et al*, 2011; Wang *et al*, 2011; MS, 2010).

INIBIDOR DE ENTRADA

Desde 2005, o Brasil adotou o enfuvirtida (Fuseon ou T20), que atua ligando-se à proteína gp41 e interfere com sua habilidade para aproximar o envelope viral à membrana celular. Este medicamento é indicado para a TARV em terapia combinada com outros ARV para pacientes em que os demais esquemas apresentem falha virológica com resistência confirmada.

INIBIDORES DE INTEGRASE

Os inibidores de integrase bloqueiam a ação da enzima integrase, enzima esta, que é necessária para que o DNA viral seja inserido com sucesso no DNA da célula hospedeira. Quando coibido este processo, o vírus passa a não utilizar este maquinário de produção de novos vírions. Sua utilização é indicada para pacientes adultos, que já tenham apresentado falha virológica com resistência a múltiplos medicamentos.

2.3.3 ESQUEMA TERAPEUTICO INICIAL

O esquema terapêutico inicial deve objetivar a melhor escolha terapêutica, ou seja, a que dará ao paciente a chance de suprimir a replicação viral e elevar a contagem de CD4 a níveis que possibilitem o restabelecimento do sistema imunológico com o

mínimo de efeitos colaterais. A escolha mais adequada precisa ser individualizada e alguns fatores devem ser considerados, como as dificuldades de aderência à terapia e a possibilidade de pré-existência de mutações de resistência. O guia brasileiro “Recomendações para Terapia Antirretroviral em Adultos e Infectados pelo HIV”, editado pelo Ministério da Saúde, 2008 (<http://www.portal.saude.gov.br>) recomenda especial atenção na conscientização dos pacientes, quanto aos riscos de um tratamento não seguido como se preconiza, e com interrupções frequentes e suas prejudiciais consequências.

O guia brasileiro de TARV inicial está baseado na utilização de três medicamentos. A primeira orientação é que se adote o uso de dois ITRN e um ITRNN (geralmente efavirenz). Outra é a combinação de dois ITRN e um IP potencializado com ritonavir (IP/r). Após o seguimento dos dois esquemas por 48 semanas, ambos respondem bem, conduzindo a resposta virológica esperada (Barlett *et al*, 2006).

Grande desafio a se considerar, é a dificuldade de manutenção do esquema terapêutico em função das dosagens, quantidade de cápsulas ou comprimidos/dia, interações com alimentos e medicamentos. Adoção de esquema com dois ITRN e um ITRNN apresenta uma posologia mais simples, o que provavelmente facilita a adesão à terapia. A adoção de IP/r oferece maior barreira genética à resistência do que os ITRNN. Na prática clínico-laboratorial, significa que, para se ter evolução de resistência ao IP/r, há necessidade de um número maior de mutações, do que para o desenvolvimento de resistência a ITRNN. A resistência a qualquer IP/r resulta do acúmulo de mutações, enquanto apenas uma mutação para ITRNN confere resistência completa ao EFV e à NVP.

2.3.4 FALHA TERAPÊUTICA

Um paciente encontra-se em falha terapêutica, quando apresenta sintomas característicos da aids e/ou CV detectável e baixos níveis de CD4 na vigência de TARV. Um número elevado de pacientes atinge os objetivos da TARV e conseguem a supressão viral com conseqüente decréscimo de CV a níveis indetectáveis, porém alguns não atingem a resposta esperada.

Em média, entre 10 e 20% dos pacientes que iniciam o tratamento apresentam falha primária (não atingem a supressão viral e a terapia falha após poucos meses de tratamento (<http://www.portal.saude.gov.br>). São diagnosticados, em média, 35.000 novos casos/ano e destes, aproximadamente 40% com diagnóstico tardio (sintomáticos ou assintomáticos com contagem de CD4 menor que 200 células/ mm³) (Hallal *et al*, 2010).

Garantida a boa resposta inicial, ainda podemos ter falha virológica, apesar da terapia no decorrer do acompanhamento dos pacientes. Quando a falha ocorre, após um ano de tratamento, é chamada falha virológica secundária. Os índices de ocorrência da falha virológica secundária, podem chegar de 20 a 50% naqueles indivíduos com sucesso terapêutico inicial. Os indivíduos que apresentam falha virológica são frequentemente submetidos a teste de genotipagem para a avaliação da presença de mutações associadas à resistência aos ARV nos vírus circulantes (Shafer, 2002). O resultado de genotipagem permite a escolha de um novo esquema ARV para o qual as cepas virais presentes no indivíduo não apresentem resistência. A incompleta adesão aos esquemas terapêuticos é maior causa de falha ao TARV (MS, 2008).

2.4 FATORES DE RISCO DE TRANSMISSÃO DO HIV

A transmissão do HIV se dá por contato sexual, pela transmissão vertical materno-fetal, e por exposição a produtos contaminados com sangue. Usuários de medicamentos apresentam alta taxa de contaminação pelo HIV, assim como pessoas que manipulam inadequadamente produtos contendo sangue.

Embora o vírus tenha sido isolado de vários fluidos corporais como saliva, urina, lágrimas, somente o contato com sangue, sêmen, secreções vaginais e leite materno têm sido implicados como fontes de infecção. Dados laboratoriais e epidemiológicos não determinam suporte à possibilidade de infecção por HIV por qualquer das seguintes vias teóricas de transmissão: contato interpessoal não sexual e não percutâneo (por contato casual), vetores artrópodes (picadas de insetos), fontes ambientais (aerossóis, por exemplo) e objetos inanimados (fômites), além de instalações sanitárias (<http://www.portal.saude.gov.br>). Conclui-se que formas alternativas de transmissão são altamente improváveis e que a experiência cumulativa é suficientemente ampla para se assegurar enfaticamente que não há qualquer justificativa para restringir a participação de indivíduos infectados em seus ambientes domésticos, escolares, sociais ou profissionais (Programa Nacional de DST e Aids - Manual DST e Aids, 2005; <http://www.portalsida.org>).

As doenças sexualmente transmissíveis são consideradas como cofatores, porque aumentariam a susceptibilidade do indivíduo a contrair a infecção do HIV, pelas possíveis lesões genitais. Entre elas estão: as úlceras genitais, como aquelas causadas por cancro mole ou cancro venéreo (causado pela bactéria *Haemophilus ducreyi*), Linfogranuloma venéreo (causado pela bactéria *Chlamydia trachomatis*), pelo cancro duro (Sífilis) e pelo Herpes simples genital, sendo estas consideradas condições

facilitadoras da transmissão sexual do HIV. Outros cofatores adicionais são a promiscuidade, a multiplicidade de parceiros (as), o trauma genital durante o coito e a exposição ao sangue (menstruação) (Hart; Signori, 1998).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO DO HIV-1 NO MUNDO, NA AMÉRICA LATINA E NO BRASIL

A infecção do HIV transformou-se rapidamente em uma pandemia, originadas inicialmente no continente africano, disseminando-se pela Europa e Estados Unidos e atingindo o mundo, independente da etnia, idade, status social ou opção religiosa, grau de instrução ou sexo.

2.5.1 EPIDEMIOLOGIA MUNDIAL DO HIV-1

A distribuição global de subtipos do HIV-1 varia com a origem geográfica populacional. A dispersão de diferentes subtipos de HIV-1 parece estar mais relacionada preferencialmente com as mudanças socioeconômicas, imigração e deslocamentos internacionais do que nas diferentes vias de transmissão (Paraskevis & Hatzakis, 1999). Desde sua expansão inicial em seres humanos, aproximadamente há sete décadas na África Central, por meio de mutação e recombinação, cepas do HIV-1 diversificaram-se extensivamente. O primeiro caso de transmissibilidade da infecção pelo HIV-1 ocorreu provavelmente ao redor de 1930 na África Ocidental, de acordo com entrevista dada pela Dra. Bette Korber do Laboratório Nacional Los Alamos no Novo México (<http://www.hivaidsonline.in/.../from-monkey-to-man.html>).

Segundo a UNAIDS, em dezembro de 2009 foram contabilizados no mundo em torno de 2,6 milhões de novos infectados (crianças abaixo de 15 anos representam 370.000) e o número de pessoas vivendo com o HIV estava em torno de 33.3 milhões, sendo que 30.8 milhões de adultos (destes 51.6% mulheres ou 15.9 milhões). A UNAIDS (<http://www.unaids.org>), ainda informa, no *Report on the Global AIDS Epidemic*, 2010, que a aids provocou 1,8 milhões de mortes em 2009.

2.5.2 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HIV-1 NA AMÉRICA LATINA

A América Latina mantém uma estimativa de 1.6 milhões de infectados. O Brasil apresenta a mais alta prevalência de infectados com a estimativa de 635.000 infectados (460.000-810.00), representando mais de um terço do total de portadores da América Latina ([http:// www.opas.org.br](http://www.opas.org.br)). Embora os grupos mais vulneráveis ainda sejam os trabalhadores do sexo (TS), homens que fazem sexo com homens (HSH) e usuários de drogas injetáveis (UDI) em grandes centros urbanos, a epidemia de HIV/aids tem se alastrado de forma preocupante entre mulheres, idosos, na população de baixa renda, além de avançar pelo interior (Greco e Simão, 2007). Podemos também estimar que um grande número de portadores, desconhece seu estado de portador, por ausência de diagnóstico ou por não saber a importância de conhecer o resultado, porque os sintomas iniciais da aids podem levar em média 10 anos para ocorrer (<http://www.portal.saude.gov.br>).

2.5.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO DO HIV-1 NO BRASIL

A epidemia de aids no Brasil vem sendo estudada principalmente nos grandes centros urbanos (Soares *et al*, 2004). As áreas de fronteira, onde existe um grande potencial de interação entre pessoas e grupos populacionais, foram pouco estudadas até o momento, apesar de que suas características particulares possam vir a constituir-se em espaços críticos para a disseminação do HIV. Nos estados que mantêm divisa (s) com outros países da América do Sul há processos migratórios, principalmente nas fronteiras, que podem se analisadas como uma importante porta de entrada para a transmissão de novas formas genéticas do HIV-1. Um pequeno exemplo, a cidade de Oiapoque (ponto extremo na região norte do país), situada às margens do rio do mesmo nome e à divisa com a Guiana Francesa, é um ponto importante na conexão com este país e com o Suriname (Rodrigues Jr *et al*, 2009). Sobretudo em um país de dimensões continentais como o Brasil, com 8.514.876,60 km² (senso IBGE 2010; <http://www.ibge.gov.br/censo2010>) distribuídos em território heterogêneo, com grande diversidade cultural e muitas vezes de difícil acesso. Em contrapartida, temos o contato com grande movimento de estrangeiros, que trabalham no transporte marítimo internacional, que tem contato com a população local de cidades portuárias de importância, como o porto de Santos (o maior da América Latina), Rio de Janeiro, Salvador, Manaus, Porto Alegre, Itajaí entre outros.

Segundo informações publicadas no “Boletim Epidemiológico DST/Aids”, 2010 (<http://www.aids.gov.br/publicacao/boletim-epidemiologico-2010>) obtivemos, de 1980 a 2010, casos notificados no Brasil que atingiram um número de 592.914 indivíduos portadores do HIV, com taxa de incidência estimada no período de 1997 a 2009 de 20,1/100.000 habitantes. O número de óbitos decorrentes de aids entre os anos de 1980 e 2009 foi de 229.222. O coeficiente de mortalidade por aids foi de 6,2/100.000 habitantes no ano de 2009 (cálculo projetado no método direto, usando como base a

população brasileira) . Houve a alteração do grupo populacional com a maior incidência em heterossexuais, principalmente no sexo feminino e em idosos (em relação aos dados anteriores, que referiam a maior incidência em UDI, HSH e TS (<http://www.portal.saude.gov.br>).

Outras características epidemiológicas da infecção pelo HIV/aids no Brasil, refere-se aos últimos anos, onde houve a tendência da epidemia à interiorização e pauperização, isto é, incidência em população de menor poder aquisitivo e menor escolaridade (MS, 2008; <http://www.portal.saude.gov.br>). Os pequenos centros urbanos representam, mais recentemente, importância pelo o número crescente de portadores do HIV, característica que se diferencia do relato de anos anteriores. Considerando a disseminação de variantes do HIV-1 na população, pesquisas são necessárias para identificar as características mutacionais e os subtipos circulantes do HIV-1 em pacientes não só recém infectados, mas também aqueles que apresentam infecção crônica em todas as regiões do nosso território, utilizando a biologia molecular como ferramenta da epidemiologia molecular para a caracterização do perfil da epidemia em todo o território nacional. A alta variabilidade genética do HIV-1 pode ter implicações na patogênese, transmissão, diagnóstico, tratamento e desenvolvimento de vacinas (Hemelaar *et al*, 2006). Alguns estudos apontam para diferenças na prevalência de algumas mutações de resistência entre os subtipos B e “não-B”, especialmente aquelas relacionadas à protease (Pieniazek *et al*, 2000; Couto-Fernandez *et al*, 2005; Cavalcanti *et al*, 2007; Soares *et al*, 2007). Entretanto, o impacto destas diferenças na eficácia da TARV ainda não é muito conhecido.

2.6 MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E A ORIGEM DAS QUASISPÉCIES DO HIV-1

O HIV tem alta taxa de mutação por replicar-se muito rápido e não apresenta nenhuma alternativa eficiente de correção de erro durante a replicação viral. Então, sabemos que as mutações ocorrem com constância e se uma delas possibilita alguma vantagem, pode ser fixada e transferida à próxima geração. A ação terapêutica, quando efetiva e presente no hospedeiro representa imensa pressão seletiva e qualquer mutação que possa conferir resistência aos medicamentos adotados representa grandes vantagens ao vírus. O esquema terapêutico ideal é aquele que previne o aparecimento e a fixação de mutações de resistência, e somente ocorre com altos níveis de aderência ao tratamento. Se levarmos em conta as altas taxas de replicação viral e de sucessivas mutações aleatórias e por pressão seletiva dos ARV, somadas à baixa atividade de correção de erros no HIV-1 (também em outros vírus RNA), resultam numa complexa distribuição de genomas estreitamente relacionados – ou as quasispécies (Eigen *et al*, 1996). Diferentes combinações associadas às mutações, que habilitam resistência a múltiplos medicamentos, conferem um *fitness* relativo e distinto ao HIV-1 na presença ou ausência de inibidores (Kosalaraksa *et al*, 1999; García-Lerma *et al*, 2001; Matsumi *et al*, 2003).

2.6.1 RESISTÊNCIA DO HIV-1 AOS ANTIRRETROVIRAIS

Os dados divulgados pela Organização Mundial de Saúde em 2010 (<http://www.who.int>) e *Join United Nations Programme on HIV/AIDS*, UNAIDS em 2010, (<http://www.unaids.org>) referem que, apesar das constantes campanhas de prevenção e aconselhamento ao redor do mundo, o conhecimento das características virais e do hospedeiro, testes diagnósticos de última geração e recursos terapêuticos disponibilizados aos diversos ARV, o quadro evolutivo da pandemia permanece preocupante. Uma das importantes causas de redução no sucesso da TARV está no aparecimento de mutações de resistência aos medicamentos.

2.6.1.1 RESISTÊNCIA TRANSMITIDA E RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA DO HIV AOS ANTIRRETROVIRAIS

A resistência do HIV aos ARV pode ser classificada como TDR (anteriormente denominada primária) ou resistência secundária. Resistência secundária é aquela que emerge em decorrência de pressão seletiva exercida pelo uso da TARV. A resistência transmitida está presente, mesmo antes do uso de TARV pelo indivíduo infectado. Esta transmissão de vírus resistentes acontece quando em algum momento da cadeia de transmissão do vírus, um paciente-fonte sabidamente infectado e portador de vírus resistente aos ARV não adotou as medidas preconizadas para impedir a transmissão.

Estudo realizado entre 2000 e 2002, que analisou 395 indivíduos portadores de vírus resistentes, obteve 23% dos pacientes que praticavam sexo desprotegido num período de três meses o que resultou em 1.126 eventos de sexo desprotegido com 191 parceiros (Kozal *et al*, 2004). Vale frisar que essa população apresenta vírus resistentes transmitidos, e não há a presença de vírus selvagens, diferentemente dos pacientes com resistência secundária aos ARV.

O grupo de pacientes que apresenta TDR aos ARV possui características associadas a um alto risco de falha virológica e alto risco de desenvolver resistência a cada um dos medicamentos usados no esquema terapêutico (Daar & Richman, 2005).

O estudo de TDR pode adicionar informações para que novas medidas de saúde pública sejam adotadas não só na terapia, como em educação e prevenção. A percepção da existência de pacientes portadores dessas mutações e ainda não tratados, se traduz em um indicador da necessidade de suporte diagnóstico racional para o uso de TARV.

Há de se ressaltar que há algum tempo, observa-se a alta prevalência de TDR aos ITRNN em indivíduos com IR, como no sul da Califórnia, EUA, que é de 16% (Little *et al*, 1999). Outro dado intuitivo, porém alarmante, relaciona-se ao aumento ao longo do tempo da prevalência de TDR nos EUA entre indivíduos com infecção primária/recente, que foi de 3,5% entre 1995-1998 a 14% nos anos de 1999-2000 (Little *et al*, 2002a; Little *et al*, 2002b; Machado *et al*, 2002).

A determinação da prevalência de TDR é de grande importância no monitoramento da epidemiologia molecular do HIV-1 e para dar maior suporte ao acompanhamento clínico na escolha inicial da terapêutica numa dada região (Deeks, 2001; Soriano *et al*, 2001). Baseado nesses fatos, a prática de rotina de utilização da primeira linha de HAART adaptada às resistências presentes em estudos de genotipagem, devem ser adotadas antes da terapia (Oette *et al*, 2004).

Atualmente na Europa, o uso clínico de testes de resistência aos ARV é recomendado para recém diagnosticados, para pacientes com diagnóstico de síndrome retroviral aguda ou IR (menos de um ano) e pacientes virgens de tratamento cronicamente infectados que iniciam a terapia, caso a suspeita de resistência seja elevada, ou se a prevalência da resistência na população for superior a 10% (Vandamme *et al*, 2004).

Shafer *et al* (2007) publicaram um estudo, propondo critérios na seleção de mutações de TDR e desenvolveu uma lista baseada neste critério. O autor coloca a importância de estudos continuados da sequência do HIV em diferentes subtipos, determinando que esforços devam ser somados para termos um número suficiente de sequências e respectivos subtipos de todos os países do mundo.

Bennett *et al*, (2009) publicaram novo estudo que propõe 93 mutações, incluindo 15 posições em TR com 34 mutações de resistência associadas aos ITRN, 10 posições em TR com 19 mutações aos ITRNN e 40 mutações de resistência em 18 posições associadas aos IP. O estudo de 2009 contém 77 das 80 mutações listadas em 2007 e um adicional de 16 mutações, incluindo 4 novas mutações de resistência associadas aos ITRN (D67E, K70E, L74I, K219N), 3 aos ITRNN (K101P, V179F, Y181V), e 9 novas mutações associadas aos IP (L23I, M46L, G48M, F53Y, L76V, V82C/L, N83D e I85V). Dessas 16 novas mutações, 9 se devem ao reconhecimento das tendências específicas dos ARV em desenvolvimento e uso: o aumento do uso de análogos à timidina contidos nos esquemas terapêuticos com K70E e L74I, o crescente reconhecimento das mutações associadas à etravirina (K101P, V179F e Y181V), tipranavir (V82L e N83D), e darunavir (L76V). As sete mutações restantes se devem à sua inclusão na expansão do número de mutações observadas no estudo.

Estudos recentemente realizados, representam enorme contribuição para elucidar quais são as diferenças entre os subtipos B e não-B, no que se refere aos perfis de mutações de resistência a TARV, tanto em pacientes em falha virológica e que emerge em decorrência da pressão de seleção exercida pelos ARV (resistência secundária), quanto naqueles que apresentam TDR aos ARV, ou seja, pacientes com TDR e virgens de tratamento (Kantor *et al*, 2005; Shafer *et al*, 2008; Shafer & Shapiro, 2008). Em conclusão, podemos reforçar que a resistência transmitida aos

ARV está presente, mesmo antes do uso da medicação pelo indivíduo infectado. O indivíduo fonte infectante é aquele que transmite variantes resistentes pós-falha na TARV.

A maioria dos estudos realizados até a década passada foi direcionada para o subtipo B do HIV-1, o mais prevalente em grande parte dos países desenvolvidos. Atualmente, sabemos que a epidemia do HIV-1 tem mudado suas características epidemiológicas. As mutações relevantes de resistência à TARV entre subtipos não-B contribuirá para o acompanhamento da evolução e transmissão de resistência, determinando estratégias de tratamento inicial de pessoas infectadas com os vírus não-B, e para interpretar a resistência genética entre pacientes que falham a TARV (Kantor et al , 2005).

2.6.1.2 RESISTÊNCIA TRANSMITIDA AOS ANTIRRETROVIRAIS PELO HIV-1 NO BRASIL

Vários estudos realizados no mundo e referidos na atual revisão demonstraram a importância da TDR à TARV na população e as consequências da falha virológica. Se o regime inicial é determinado, sem o conhecimento das mutações associadas à resistência presente, a escolha terapêutica não pode ser ótima (Yerly *et al*, 1999).

Estudos brasileiros indicam que cepas resistentes do HIV-1 circulam em pacientes com IR (Sucupira, 2007). Mas, qual será o perfil da epidemia no Brasil, naqueles que apresentam infecção crônica, e em consequência estão infectados há alguns anos ? Dessa forma, é importante salientar, que as TDR podem estar intimamente associadas à localidade pesquisada e às peculiaridades regionais relacionadas à manipulação dos ARV, sendo difícil fazer generalizações muito amplas.

De fato, depois de tudo que foi exposto acima, parece haver uma epidemia secundária do HIV-1 em pacientes com TDR aos ARV que hipoteticamente poderia reduzir a eficácia da TARV inicial, como já foi demonstrado anedoticamente (Little *et al*, 2002a).

No Brasil, apesar do acesso universal à TARV, as taxas de mutações TDR têm se mantido em níveis intermediários (5% a 15%) a baixos (<5%) (Inocêncio *et al*, 2009).

Foi determinada a prevalência de TDR à TARV em gestantes portadoras do HIV em estudo realizado na Escola Paulista de Medicina em análise retrospectiva e a correlação entre TDR e a eficácia da profilaxia ARV na prevenção da transmissão vertical. Foram encontrados 20% de TDR, o que corresponde a oito mulheres, das quais quatro apresentavam a mutação M184V, duas a mutação K103N e duas a mutação L90M. Coincidentemente, todas as pacientes foram tratadas, como parte de seu esquema HAART com o medicamento à qual elas apresentavam resistência. Ou seja, as gestantes com a mutação M184V tiveram 3TC em seu esquema, aquelas com K103N foram tratadas com nevirapina e as com L90M com nelfinavir. Todas alcançaram o momento do parto com CV indetectável, o que, apesar da casuística pequena, enfatiza a importância do uso ARV em gestantes. Apesar da eficácia em avaliações a curto prazo, nesses casos é difícil especular sobre o desempenho destes tratamentos a médio e longo prazo (Gasparotto, 2005). A indicação de HAART orientada por testes de resistência tem apresentado eficácia similar em pacientes com TDR à TARV, quando comparados com pacientes portadores de vírus selvagem.

Um estudo que foi conduzido com 100 pacientes com infecção recente pelo HIV-1 na cidade de Santos revelou prevalência de 22% de resistência aos ITRN, 15% aos ITRNN e 13% aos IP, com prevalência de resistência cumulativa de 36% (Sucupira *et al*, 2007).

De fato, há referência de casos de transmissão de vírus resistentes aos ARV pelo menos nos últimos 10 anos no Brasil e no mundo (Sucupira *et al*, 2007; Brindeiro *et al*, 2003; Johnson *et al*, 2001; Garcia-Lerma *et al*, 2001; Conway *et al*, 1999; Quigg *et al*, 1997; Rubio *et al*, 1997; de Ronde *et al*, 1996; Conlon *et al*, 1994; Erice *et al*, 1993). Como o primeiro ARV a ser utilizado foi a zidovudina, os primeiros relatos de transmissão de vírus resistentes relacionaram-se a mutações a esse medicamento (Kamkamidze *et al*, 2001). Com a disponibilização de outros ARV, iniciaram-se também os relatos de transmissão de vírus com mutações relacionadas a esses outros fármacos (Conway *et al*, 1999; Hecht *et al*, 1998; Imrie *et al*, 1997).

2.7 PREVALENCIA DOS SUBTIPOS DO HIV-1 NA POPULAÇÃO MUNDIAL

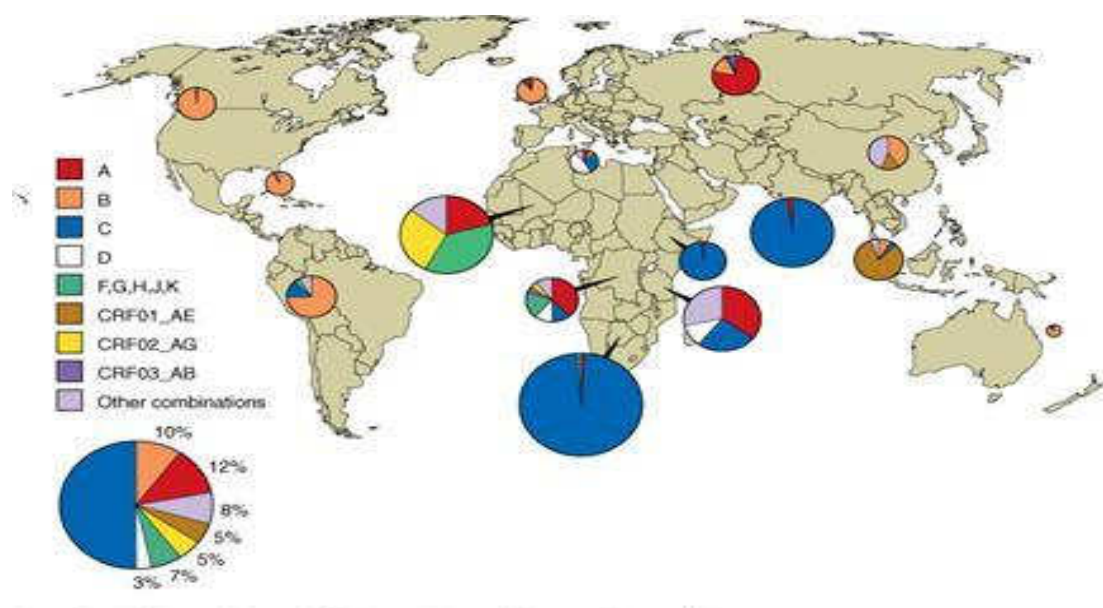
As análises filogenéticas com base na variabilidade genética de amostras de HIV e isoladas de diferentes regiões geográficas do mundo tem classificado com maior clareza a presença de subtipos e sua distribuição geográfica. Há evidência de predominância do subtipo C na pandemia, sendo que este é o mais prevalente na África subsaariana e no sul asiático, locais onde se concentram aproximadamente 82% dos casos de HIV entre adultos e crianças (UNAIDS, 2007; <http://www.unaids.org>), o que sugere que este subtipo pode apresentar características peculiares quanto à capacidade de transmissão. Nas Américas e Europa há predominância do subtipo B.

A variação genética intrasubtipos pode chegar a 20%, porém entre subtipos diferentes de 25 a 35% (Korber *et al*, 2001). A Figura 2.8 apresenta o panorama global da distribuição dos subtipos do HIV (apud Hemelaar *et al*, 2006, adaptado por Thomson 2002). O grupo O (*outlier*) foi descrito em amostras altamente variáveis na África

(Peeters *et al*, 1997) e o grupo N (não M e não O ou new) foi identificado em pacientes da República de Camarões (Simon *et al*, 1998).

O HIV-1, tido como o responsável pela pandemia, apresenta grande diversidade genética, apresentando vários subtipos e é o responsável pela epidemia no Brasil.

Figura 2.8 Distribuição mundial de subtipos do HIV-1 do grupo M e das formas recombinantes circulantes (CRF). Adaptação: Thomson (2002).



Fonte: www.acessmedione.com/2011
Adaptação: Thomson, 2002

2.7.1 PREVALÊNCIA DE SUBTIPOS DO HIV-1 NO BRASIL

No Brasil, o subtipo B é a principal cepa de HIV-1 circulante, sendo em ordem decrescente, seguido pelo subtipo F, que é o responsável por 15 a 20% das infecções (Soares *et al*, 2003). Dados anteriores relatam que em Manaus (AM), a prevalência desse subtipo era de aproximadamente 50% (Vicente *et al*, 2000). Este perfil vem se

modificando ao longo do tempo conforme a região pesquisada. O terceiro subtipo encontrado no Brasil é o subtipo C (Simon *et al*, 2010; Soares *et al*, 2003). A presença do subtipo C no sul do Brasil foi inicialmente detectada em 1 das 5 amostras de HIV-1 coletadas em Porto Alegre (RS), em amostragem de um estudo internacional realizado pela OMS, 1994. Um estudo realizado com o plasma de 85 pacientes HIV+ de um hospital em Rio Grande (sul do Brasil) demonstrou a prevalência de subtipo B e C, com respectivamente, 42% e 45% (Soares *et al*, 2005). Novo estudo em 80 pacientes descreveu a prevalência do subtipo C no sul se modificou para 43.8%, seguido por 35% de CRF_31BC, 18% do subtipo B e 2.4% do F (Simon *et al*, 2010).

Até o momento, foram identificados os subtipos B, F, C e D, além das amostras adicionais de vírus recombinantes e de infecções duplas em diferentes áreas geográficas (Janini *et al*, 1996; Brindeiro *et al*, 1999; Couto-Fernandez *et al*, 1999 Proietti *et al*, 1999; Vicente *et al*, 2000).

As infecções mistas (B/F, B/D e F/D) e recombinantes também foram observadas em várias regiões do país (Ramos *et al*, 1999; Tanuri *et al*, 1999a; Machado *et al*, 2004).

Outros trabalhos mais recentes referem-se à identificação, de pelo menos, cinco subtipos diferentes (B, F, C, D e A). Nas regiões sudeste, centro-oeste e nordeste predominam o subtipo B, seguido do F (Morgado, 1994; Sabino, 1996; Brindeiro, 2003; Cerqueira, 2004; Couto-Hernandez, 2005; Aleixo, 2006; Cavalcanti 2007; Caseiro, 2008).

Outro estudo demonstra a diferença do perfil dos subtipos de HIV-1, também identificadas ao longo do tempo, em diferentes regiões do Brasil. Em Manaus (AM) foram observadas proporções semelhantes na prevalência do subtipo B e F (Vicente *et al*, 2000), enquanto na região sul, a prevalência do subtipo C é maior do que no resto do

Brasil, podendo ultrapassar 50% dos casos (Morgado 2002; Brindeiro 2003, Soares 2005).

A diversidade genética em estudos comparativos no Brasil, demonstraram a presença de cepas circulantes do subtipo B, com uma variante distinta dos vírus B clássicos, pela presença da sequência GWGR no topo da região hipervariável 3 (V3) da *gp 120*, ao invés do clássico motifGPGR (Morgado *et al*, 1994; *Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization*, 2000; [http:// www.scielo.br](http://www.scielo.br)). Estas duas variantes genéticas do subtipo B podem ser diferenciadas pela abordagem genética (Covas *et al*, 1998; Morgado *et al*, 1998 a) e também antigênicamente (Bongertz *et al*, 1994; Casseb *et al*, 1998). Alguns dados foram relatados em pesquisas no país, desde a década passada. A prevalência do subtipo B já estava presente em algumas áreas do Brasil, como os 37% de amostras estudadas no Rio de Janeiro (RJ) (Morgado *et al*, 1998 a,b) e 57% das amostras detectadas em Rio Preto (SP) (Covas *et al*, 1998). Ainda na região sudeste vários estudos vem demonstrando a predominância do subtipo B (85%) e do F (10 a 15%) (Tanuri *et al*, 1999; *Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization*, 2000; [http:// www.scielo.br](http://www.scielo.br)). Em relação aos estudos realizados nas regiões nordeste e centro-oeste, uma ampla prevalência (acima de 90%) do subtipo B, com poucos casos de subtipos F e C (Couto-Fernandez *et al*,1999; Stefani *et al*,2000).

Dias *et al*, 2009, avaliaram um grupo de 128 pacientes recém-infectados pelo HIV-1 e virgens de tratamento no sul do Brasil, pacientes atendidos na cidade de Porto Alegre. Baseados no sequenciamento parcial da região do gene *pol* das amostras realizaram um estudo filogenético, que resultou em 29% de HIV-1 do subtipo C, 22.6% do B, 23.4% de CRF 31_BC, 10% do F e outros 5.5% classificados como mosaicos. Ainda citaram a importância do estudo do comportamento de risco na característica de

transmissão do HIV-1, com o subtipo B com maior transmissibilidade por contato sexual anal e os outros subtipos e CRF por transmissão transvaginal.

Formas recombinantes circulares do HIV-1 foram identificadas no Brasil. A mais recentemente foi publicada por Sanabani e colaboradores (2010), com a identificação de um novo recombinante designado de CRF46_BF1 em uma população de adultos HIV-1 positivos de São Paulo, perfazendo a quinta CRF identificada no Brasil. O estudo foi realizado com a seleção de 36 amostras de um total de 888 pacientes. A região do gene *pol* com a classificação do subtipo F1 norteou a seleção das amostras e o subsequente estudo do genoma completo.

De fato, com todas as informações que dispomos, há o entendimento da necessidade do atual estudo com a finalidade de estimar o perfil populacional dos pacientes HIV-1+ crônicos não tratados e indicados a iniciar terapia imediata, com abrangência nas diferentes regiões do território nacional.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar a prevalência de resistência transmitida aos medicamentos antirretrovirais e a diversidade genética do HIV-1, em indivíduos cronicamente infectados e com indicação imediata de início de terapia antirretroviral, em cidades representativas das cinco regiões demográficas do Brasil.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Determinar o perfil das mutações de resistência transmitida aos ARV observadas nas frações Transcriptase Reversa e Protease do gene *pol*, comparando a prevalência dessas mutações nas cidades brasileiras pesquisadas.

3.2.2 Determinar as características sociodemográficas do indivíduo portador crônico do HIV-1 com indicação de início imediato de terapia antirretroviral, de acordo com as diretrizes nacionais vigentes (<http://www.aids.gov.br>).

CAPÍTULO 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

CAPÍTULO 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este trabalho caracteriza-se como um estudo multicêntrico nacional, com perfil de avaliação transversal, prospectivo e embasado em amostras de pacientes e informações com origem nas Clínicas das Macrorregiões ou Centros Ambulatoriais de Acompanhamento DST/ HIV/aids das cinco regiões demográficas do Brasil. Foram incluídos dois centros considerados como especiais pela alta prevalência de aids: Santos(SP), que apresentou 36% de prevalência cumulativa de mutações TDR pelo HIV-1 aos ARV em recém-infectados (Sucupira, 2007) e Itajaí(SC) pela prevalência representativa de pacientes recém-infectados (<http://www.aids.gov.br>). Todos os coinvestigadores receberam carta convite de participação e após adesão ao projeto, tiveram a aprovação da CEP regional para o início do estudo. O projeto da atual pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - CEP 0863/07 (Anexo I).

O estudo do mapeamento genotípico e subtipos do HIV-1 em pacientes crônicos de HIV-1, virgens de tratamento e indicados para início imediato de TARV, foi realizado nas principais cidades das cinco regiões demográficas do Brasil. As cidades escolhidas por região e seus respectivos estados federativos foram: Norte (Manaus-AM), Nordeste (Salvador-BA), Centro-Oeste (Brasília-DF), Sudeste (Rio de Janeiro-RJ e Santos-SP) e Sul (Porto Alegre-RS e Itajaí-SC) (Quadro 4.1). A primeira ou segunda maior população de cada região foi o critério adotado, onde a maioria das cidades apresentam atividades portuárias (com exceção de Brasília-DF).

Quadro 4.1 Maiores populações por região e estados brasileiros.

*Região	Norte	Nordeste	Centro-Oeste	Sudeste	Sul
<i>Maior cidade</i>	Manaus	Salvador	Brasília	São Paulo	Curitiba
População/Hab.	*1.927.346	*2.711.372	**2.333.108	*11.016.703	*1.788.559
<i>Segunda maior cidade</i>	Belém	Fortaleza	Goiânia	R. de Janeiro	P. Alegre
População/Hab.	*1.428.368	*2.416.920	*1.220.412	*6.136.652	*1.440.939

Fonte: IBGE*estimativa 2006

Legenda: Foram incluídas as cidades de Santos-SP e Itajaí-SC, não apresentadas na tabela, pela importância atual na epidemia brasileira de HIV-1. Ambas apresentam características peculiares, de alta prevalência de aids e presença de mutações TDR em recém-infectados (36% em Santos-SP) e alto número de recém-infectados (Itajaí-SC). Em negrito, as localidades onde o estudo foi desenhado, conforme dados do IBGE, 2005.*

O número amostral foi estimado em cinco períodos semestrais, coletados em 30 meses consecutivos, de julho de 2008 a dezembro de 2010, com um número limite de 70 amostras de cada localidade e tipo de pesquisa. O número limite determinado do tamanho amostral está baseado na estratégia de amostragem binominal sequencial adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no estudo *HIV Drug Resistance Threshold Survey* (Blower et al, 2005; Bertagnolio, Sutherland, 2005). A amostragem sequencial é um método alternativo em que o número máximo amostral é definido previamente, mas o número necessário de amostras pode ser de fato, menor do que o número máximo.

Foi realizado o treinamento prévio da equipe técnica de coleta e de entrevistadores da população alvo constituída.

4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram determinados para pacientes HIV positivos, não tratados, com idade igual ou superior a 18 anos, de ambos os sexos e, em caso de mulheres grávidas, foram selecionadas aquelas que estão com indicação para tratamento, de acordo com as “Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos e Adolescentes infectados pelo HIV-1”, 2008 (<http://www.aids.gov.br>). Os pacientes tiveram a referência dos resultados de contagem de CD4 e CV disponíveis nos setores de atendimento e realizados em até 90 dias antes da coleta do teste de genotipagem viral. Os pacientes que não apresentavam tais resultados disponíveis deveriam ser submetidos à coleta dos mesmos juntamente com as amostras para análise dos testes de resistência.

Os indivíduos que obedeceram aos critérios de inclusão receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, para a opção de adesão à pesquisa (Anexo II).

4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas do estudo, mulheres grávidas HIV positivas com indicação de profilaxia pré-natal.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 COLETA DE DADOS

Os dados sociodemográficos da população, assim como o perfil de resultados de CD4 e CV foram referidos no preenchimento da Ficha de Investigação Individual do Paciente (Anexo III) pela equipe dos setores competentes selecionados, em questionário investigativo elaborado por nossa equipe. Após o preenchimento, foi realizado o encaminhamento desta ficha para o Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP, juntamente com a amostra coletada em *Dried Blood Spots* ou DBS.

4.2.2 KITS PARA COLETA DE AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL EM PAPEL-FILTRO

As amostras para estudo do genótipo e subtipos do HIV-1 receberam identificação no Laboratório de Retrovirologia, com número pré-definido seriado por região demográfica, assim como a montagem dos kits de coleta.

O kit individual de coleta era composto de um par de luvas para uso do profissional, um *card*, contendo cinco círculos de papel-filtro da Whatman (*Protein Safe Card*, Whatman®, USA), dois envelopes individuais de *swab* com álcool isopropílico a 70% para antissepsia pré e assepsia pós-punção, lanceta descartável (marca *Salsted* – gatilho automático e ponta retrátil), um *sachê* de 1g de sílica gel azul (indicador de umidade), acondicionados em envelope aluminizado, plastificado próprio e com lacre duplo (Anexo IV).

4.2.3 PROTOCOLO DE ORIENTAÇÃO DE COLETA DE SANGUE TOTAL EM PAPEL-FILTRO OU DBS

- Identificar o *card* com o nome do paciente e data.
- Realizar a antissepsia local, utilizando um *swab* de álcool isopropílico a 70%. Deixar secar.
- Colher o sangue por meio de punção digital, com a lanceta automática descartável. Observação: não tocar a pele na superfície do papel, há enzimas na superfície da pele que podem inibir a extração do material genético.
- Aplicar uma gota de sangue (aproximadamente 50µL), no centro de cada círculo de papel-filtro, num total de cinco *spots* círculos (11 mm de diâmetro cada um).
- Higienizar o local da punção com o segundo de álcool do kit, até que pare totalmente o sangramento.
- Deixar secar o kit de DBS a temperatura ambiente, por um tempo mínimo de 3 horas, podendo se estender até 24 horas em local protegido de contaminantes.
- Após secagem, fechar o *card* e acondicioná-lo no envelope, observar a manutenção do *sachê* de sílica gel, manter a temperatura ambiente, conforme orientação do fabricante (Orientações de Coleta - ANEXO III).
- Enviar os kits em envelope próprio pré-tarifado, através dos correios, para o Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo.

Informação adicional ao profissional: o ácido nucléico é automaticamente estabilizado, sem necessidade de refrigeração e isento da presença de patógenos. O transporte ocorre sem o risco de material biológico infectante. O material obtido, por

meio desse método, será utilizado para os procedimentos técnicos de seqüenciamento genético do HIV.

4.3. PROCEDIMENTO TÉCNICO-LABORATORIAL

A coleta e envio do material foi realizada de acordo com o proposto. As amostras recebidas foram armazenadas a temperatura ambiente e submetidas ao protocolo de extração do DNA com o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Quiagen) com modificações.

4.3.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

- 1- Cortar um *spot* de papel-filtro com tesoura ou *punch* de 11 cm de diâmetro (dividindo-o em 4 partes), adicioná-lo ao tubo de 1,5 µL identificado com o número da amostra.
- 2- Lavar e eluir com a adição de 360 µL de tampão ATL (Quiagen).
- 3- Homogeneizar, imediatamente por agitação (*vortex*) por 20 segundos.
- 4- Centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm (*spin*).
- 5- Em seguida, colocar no aparelho Thermomixer (Eppendorf), previamente aquecido a temperatura de 85°C sob agitação constante de 400 rpm durante 15 minutos.
- 6- Acrescentar 40 µL de proteinase K na concentração de 20 mg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e homogeneizar.
- 7- Incubar a 56°C por 1 hora sob agitação a 800 rpm.

- 8- Adicionar 400 μ l de solução tampão de *lise* (AL Buffer da Qiagen) e homogeneizar.
- 9- Agitar a 400 rpm com incubação a 70°C por 30 minutos. Este procedimento é realizado para liberação do DNA genômico.
- 10- Transferir o conteúdo para um tubo de 1,5 ml previamente identificado, dispensando o papel-filtro.
- 11- Acrescentar 400 μ l de álcool absoluto, agitar e dar um *spin*.
- 12- Transferir para a coluna de sílica da Qiagen, com centrifugação em duas etapas (meio volume, depois o restante) com descarte do tubo base em cada etapa.

A presença do tampão de lise (AL) propicia baixo pH à solução, e essa condição, associada à adição de etanol absoluto, permite a adsorção do DNA à coluna de sílica, quando a mistura é centrifugada a 14.000 rpm (por 1 minuto). Com o DNA ligado à malha da sílica, sucedem-se lavagens e centrifugações sucessivas para a remoção de hemácias, proteínas e outras moléculas não-DNA com os tampões AW1 (500 μ L, 1 minuto de centrifugação a 8.000 rpm, por uma vez) e AW2 (500 μ L, 3 minutos de centrifugação a 14.000 rpm, por uma vez), repetir a centrifugação, agora por 1 minuto a 8.000 rpm. Observar a troca de tubo base, para que não sobre resíduo do tampão AW2, conforme indicação do fabricante.

Para finalizar, o DNA é eluído em 100 μ L de água deionizada ultra-purificada e aquecida a 70 °C. Deixar em repouso por 5 minutos, centrifugar a 8.000 rpm por 30 segundos e armazenar em tubo cônico de 1,5 μ L a -20°C.

4.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (*POLYMERASE CHAIN REACTION* ou PCR)

Um fragmento do gene *pol* do HIV-1 de 1,07 Kb foi amplificado pela reação da PCR em duas etapas, para flanquear os fragmentos da transcriptase reversa (RT) e da protease (P), utilizando os *primers* externos (Sanabani *et al*, 2006; Sá-Filho, 2006)

POL1 (GGGAGTGGGGGGACCCGGCCATAA) e

INBO-1R (CCACTCAGGAAT CCAGGTGG), e um par de *primers* internos:

KOZAL 1 (CAGAGCCAACAGCCCCACCA);

KOZAL 2 (TTTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGAC)

Os produtos da PCR da segunda etapa (*primers* Kozal 1 e Kozal 2) foram purificados por meio de kit comercial disponível. Após a purificação, os fragmentos foram submetidos à reação de seqüenciamento utilizando-se o *DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kits GE Healthcare, Life Sciences (GE Healthcare, EUA)*. Os produtos desta reação foram analisados por seqüenciador automático modelo ABI 3100 e 3130xl (*Applied Biosystems, EUA*).

Como alternativa, no caso de não amplificação inicial dos fragmentos estudados, utilizamos dois pares de *primers* que anelam em uma região mais externa que o *primer* POL1, anteriormente estabelecido. Os novos iniciadores são denominados SC-BOS (GCTAATTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTT, posição 2.080 a 2.107 no HXB2) e IN-BO-2R (AAATCACTAGCCATTGCTCTCCA, posição 4.284 a 4.306) como *primers* externos e, como internos, SC-BNS (AGCCCCACCAGAAGAGAGCTT, posição 2.157 a 2.177 no HXB2) e POL 2 (CATTGGCCTTGCCCCTGCTTCTGT) (Sanabani *et al*, 2006; Sá-Filho, 2006).

Para padronização das reações de PCR, foram avaliadas várias condições incluindo concentrações de reagentes, temperaturas de anelamento dos iniciadores e tempo de extensão do fragmento.

Por fim, estabeleceu-se o protocolo com as melhores condições para a PCR. As concentrações finais dos reagentes utilizadas para uma reação de volume final igual a 100 µL para o primeiro round (50 µL do mix da PCR e 50 µL do produto de extração) e 50 µL para o segundo round (com 45 µL do mix e 5 µL do produto do primeiro round), bem como as condições de incubação em termociclador, estão descritas a seguir (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 Constituintes da reação e perfil de ciclagem das PCR para detecção dos frações PR e TR.

PCR	COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO (1X)	CICLAGEM
POL1/IN-BO1R	Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), MgSO ₄ 1,5mM, dNTP 0,2 mM, iniciadores 0,1 pmoL e Taq DNA polimerase High-Fidelity 1 U.	94°C – 7' 00" (1x); 94°C – 5''; 55°C – 45''; 72°C – 2'00" (35x) 72°C – 7'00" (1x)
K1/K2	Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), MgSO ₄ 1,5mM, dNTP 0,2 mM, iniciadores 0,1 pmoL e Taq DNA polimerase High-Fidelity 1 U.	94°C – 7' 00" (1x); 94°C – 45''; 55°C – 45''; 72°C – 1'30" (35x); 72°C – 7'00" (1x)

4.3.3. DETECÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Para verificar a presença dos produtos amplificados, foi realizado o fracionamento eletroforético. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0 % em Tampão TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA, Invitrogen, Califórnia, USA), corado com o intercalante *GelRed*TM 10.000X em água (*Biotium, Inc.*, Alemanha). O tempo de corrida eletroforética foi de 45 minutos a 100 V e 500 mA. Todos esses ajustes na eletroforese permitiram obter imagens de qualidade na detecção das bandas referentes aos produtos amplificados.

Foram utilizados 5,0 µL do produto de PCR e 2,0 µL de tampão de carregamento (40% de sacarose; 0,25% de azul de bromofenol) para a corrida eletroforética. Para averiguar a especificidade da PCR, a determinação do tamanho do produto amplificado se deu pela comparação com um marcador de peso molecular padrão de 1.000 pares de bases (*High DNA Mass Ladder*, Invitrogen, Califórnia, USA).

O gel de agarose foi visualizado em exposição à radiação ultravioleta (320 nm) e fotografado utilizando-se o fotodocumentador *Geldoc-it TS Imaging Systems BioImaging* (UVP, Cambridge, CA, EUA).

4.3.4. PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos das PCR, foram purificados utilizando-se o *kit ChargeSwitch PCR Clean-Up Kit* (Invitrogen, Califórnia, USA), conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, sem remover os tubos da frente do ímã, o sobrenadante contendo o produto purificado da PCR foi cuidadosamente transferido para tubos estéreis, armazenados a – 20°C.

Após obter o produto de purificação, foi realizado novo fracionamento eletroforético em gel de agarose (1,0% em TBE 0,5 X) com 2,0 µL de tampão de carregamento e 5,0 µL do produto purificado. Para a comparação do peso molecular dos fragmentos amplificados foi utilizado um marcador padrão de peso molecular de 1.000 pares de bases - *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Califórnia, USA).

4.3.5. REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Para detecção do gene *pol*, foram seqüenciados cinco fragmentos. Para cada amostra foram realizadas no mínimo cinco reações de seqüenciamento, utilizando os iniciadores senso e seus respectivos iniciadores antissenso. As seqüências bases dos iniciadores estão descritas na Tabela 4.2. Como o fragmento a ser seqüenciado era muito extenso, ou seja, de aproximadamente 1070 pares de bases (pb) e o limiar ótimo de detecção de eletroforese capilar pelo analisador genético é de 500-650 pb, as seqüências foram obtidas utilizando-se um conjunto de cinco *primers* (Tabela 4.2), que geram seqüências que se sobrepõem. Para execução das reações seguiu-se as especificações do *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, CA, EUA).

Tabela 4.2 Repertório de iniciadores da reação de seqüenciamento, conforme POP interno padronizado pelo Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP.

Primers	Iniciador	Seqüência (5'-3')	Posição (HXB2)
K1	senso	CAGAGCCAACAGCCCCACCA	2147-2166
K2	antissenso	TTCCCCACTAACTTCTGTATGTCATTGAC	3338-3309
F2	antissenso	GTATGTCATTGACAGTCCAGC	3321-3301
DP11	antissenso	CCATTCTGGCTTTAATTTTACTGGTA	2598-2572
RTint	antissenso	GGGATGGAAAGGATCACCAGCAA	3018-3042

A reação de seqüenciamento foi realizada, conforme o protocolo do laboratório. O volume de cada amostra foi definido, por meio da quantificação, realizada através da sua comparação visual com um padrão de massa molecular *High DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Califórnia, USA) em gel de agarose pós-purificação, e ajustado para o volume final de 6,0 µL em água deionizada ultra-purificada livre de RNase

q.s.p.. Cada amostra seqüenciada apresentou concentração entre 80 a 120 ng e quando necessário, a amostra foi diluída. A solução final (mix, tampão, iniciador e amostra) totalizou 15,0 µL por reação.

As ciclagens foram processadas no termociclador modelo *Veriti* (*Applied Biosystems*, CA, EUA). Durante a ciclagem, o iniciador se liga à seqüência complementar da fita de DNA e os nucleotídeos são incorporados de acordo com a fita molde. Ocorre tanto a incorporação dos nucleotídeos livres não-marcados, quanto a de nucleotídeos marcados com fluorescência. Os nucleotídeos marcados são chamados de nucleotídeos de terminação, pois apresentam um átomo de hidrogênio na posição 3' do anel de carbono da ribose ao invés de um grupo OH.

Visto que a polimerização da cadeia de DNA ocorre pela ligação entre um grupo fosfato do carbono 5' e um grupo OH no carbono 3', cada vez que um nucleotídeo de terminação é incorporado à cadeia nascente, a leitura da fita molde é interrompida, gerando um fragmento de tamanho respectivo ao local onde o nucleotídeo de terminação foi incorporado.

4.3.5.1. PRECIPITAÇÃO DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Ao final da reação de seqüenciamento, são gerados fragmentos de tamanhos diferentes e existe sobra de iniciadores, ddNTP (didesoxirribonucleosídeos trifosfatados), alguns sais, entre outros. Procedeu-se a precipitação para eliminar esses resíduos.

Inicialmente, adotamos o protocolo a seguir:

- Adicionar 90 µL de etanol 70% ao produto da reação sequenciamento, suceder a mistura do mesmo, em agitador automático e breve centrifugação.

- Incubação por 15 minutos sob condição de temperatura ambiente e ausência de luz, centrifugar o produto a 4000 rpm, por 45 minutos a 0°C. O resultado dessa centrifugação resulta em formação de um botão (*pellet*) com o produto do seqüenciamento precipitado.
- Desprezar o sobrenadante.
- Adicionar 150 µL de etanol 70%, submetendo o produto a uma segunda etapa de mistura sob agitação automatizada e centrifugação a 4000 rpm, por 15 minutos a 20° C, para formação de botão (*pellet*) mais purificado e desprendimento de resíduos.
- Após a retirada do sobrenadante, colocar o produto precipitado no termociclador a 94° C, por cerca de 3 minutos, descoberto, para secagem completa das amostras.

Posteriormente, houve necessidade de atualização do protocolo de precipitação, descrito a seguir, para otimizar a qualidade do seqüenciamento, em treinamento realizado pela assessoria científica da *Applied Biosystems*, após a aquisição do novo seqüenciador ABI Prism 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, CA, EUA).

Foram adicionados a cada produto da reação de seqüenciamento: 50 µL de etanol absoluto, 2 µl de EDTA (125 mM), 2 µl de Acetato de Sódio 3M. Em seguida, a placa de seqüenciamento foi agitada para homogeneização e brevemente centrifugada. Seguiu-se uma incubação por 15 minutos e, então, uma centrifugação a 4000 rpm, 4°C por 30 minutos. Visto que houve a formação do *pellet* contendo o produto do seqüenciamento, o sobrenadante foi descartado e acrescentou-se 70 µL de etanol 70%, submetendo o produto a uma segunda etapa de mistura em agitador automático e centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos a 4° C para formação de botão (*pellet*) mais purificado e desprendimento de resíduos. Após a retirada do

sobrenadante, o produto precipitado foi colocado no termociclador a 94° C por cerca de 3 minutos, descoberto, para secagem completa do botão (*pellet*) evitando assim que resíduos de etanol interfiram na qualidade dos resultados.

As amostras precipitadas foram re-suspendidas em 15 µL de formamida *Hi-Di*. A seguir, foram desnaturadas a 95° C por 3 minutos, depois submetidas a um choque térmico a 4°C por 2 minutos e introduzidas no sequenciador automático *ABI Prism 3130xL Genetic Analyzer* para separação eletroforética.

A edição foi realizada utilizando-se o programa *Sequencher* versão 4.0 e versão 4.5 (*Gene Codes Corporation*). Após a montagem dos fragmentos genômicos, estes foram avaliados para a identificação das diferentes fases de leitura das proteínas do HIV-1. Utilizamos os dados individuais da edição de seqüenciamento para a leitura dos resultados no programa *HIVdb* no site (<http://hivdb.stanford.edu/>) da *Stanford University* e encaminhados os resultados aos coinvestigadores. As seqüências foram alinhadas no programa *ClustalX* e corrigidas no *SeAl*, ambos disponíveis em *Los Alamos National Laboratory HIV Database* (<http://www.hiv.lanl.gov>). Também utilizamos para as análises filogenéticas os sites *BioAfrica – Viruses Genotyping Tools* (*REGA HIV-1 Automated Subtyping Tool*; <http://dbpartners.stanford.edu/RegaSubtyping>) e *NBCI (National Center for Biotechnology Information; [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)*

4.4. ANÁLISE DOS DADOS

O critério de análise dos resultados do estudo das genotipagens do HIV-1, das mutações TDR, os subtipos do HIV-1 e as variáveis sociodemográficas da população alvo foram submetidas à análise de prevalência.

Para análise de mutações aos ARV utilizamos HIVdb (<http://www.hivdb.stanford.edu/pages/alg/HIVdb.html>) e o algoritmo brasileiro através dos sites <http://www.saude.gov.br> e <http://www.aids.gov.br/genotipagem>. A identificação de subtipos e de recombinantes intersubtipos foi realizada, através de árvore filogenética (*Neighbour-joining Trees*), não apresentada no estudo, após alinhamento no ClustalX e corrigidas no SeAl, ambos disponíveis em *Los Alamos National Laboratory HIV Database* e *bootscanning* no programa *Simplot*, disponível em *Los Alamos National Laboratory HIV Database*. Também realizamos análises de subtipos pelos sites BioAfrica REGA (<http://jose.med.kuleuven.be/genotypetool/HTML/subtypinghiv.html>) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os dados iniciais de CV, CD4 e resultados dos testes de genotipagem foram posteriormente submetidos à análise de prevalência.

Os resultados das mutações de resistência observadas na análise por Stanford *HIVdb* e pelo algoritmo brasileiro foram analisados pela lista de IV – TSH da Organização Mundial de Saúde e consideradas as citadas pelo estudo de Bennett e colaboradores, 2009 (Quadro 4.2).

Quadro 4.2 Lista de Controle de Mutações TDR do HIV (Bennett *et al*, 2009).

ITRN		ITRN		IP	
<i>M41</i>	<i>L</i>	<i>L100</i>	<i>I</i>	<i>L23</i>	<i>I</i>
<i>K65</i>	<i>R</i>	<i>K101</i>	<i>E, P</i>	<i>L24</i>	<i>I</i>
<i>D67</i>	<i>N, G, E</i>	<i>K103N</i>	<i>N, S</i>	<i>D30</i>	<i>N</i>
<i>T69</i>	<i>D, Ins.</i>	<i>V106</i>	<i>M, A</i>	<i>V32</i>	<i>I</i>
<i>K70</i>	<i>R, E</i>	<i>V179</i>	<i>F</i>	<i>M46</i>	<i>I, L</i>
<i>L74</i>	<i>V, I</i>	<i>Y181</i>	<i>C, I, V</i>	<i>I47</i>	<i>V, A</i>
<i>V75</i>	<i>M, T, A, S</i>	<i>Y188</i>	<i>L, H, C</i>	<i>G48</i>	<i>V, M</i>
<i>F77</i>	<i>L</i>	<i>G190</i>	<i>A, S, E</i>	<i>I50</i>	<i>V, L</i>
<i>Y115</i>	<i>F</i>	<i>P225</i>	<i>H</i>	<i>F53</i>	<i>L, Y</i>
<i>F116</i>	<i>Y</i>	<i>M230</i>	<i>L</i>	<i>I54</i>	<i>V, L, M, A, T, S</i>
<i>Q151</i>	<i>M</i>			<i>G73</i>	<i>S, T, C, A</i>
<i>M184</i>	<i>V, I</i>			<i>L76</i>	<i>V</i>
<i>L210</i>	<i>W</i>			<i>V82</i>	<i>A, T, F, S, C, M, L</i>
<i>T215</i>	<i>Y, F, I, S, C, D, V, E</i>			<i>N83</i>	<i>D</i>
<i>K219</i>	<i>Q, E, N, R</i>			<i>I84</i>	<i>V, A, C</i>
				<i>I85</i>	<i>V</i>
				<i>N88</i>	<i>D, S</i>
				<i>L90</i>	<i>M</i>

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

A estudo em amostras de sangue em papel-filtro (DBS) trata-se de um procedimento razoavelmente mais barato que as técnicas convencionais, pela vantagem do transporte e manutenção das amostras em temperatura ambiente. Porém, requer maior tempo no procedimento de extração do material genético.

Até o momento da análise de resultados, foram recebidas 381 amostras para o estudo de prevalência de mutações TDR. Após avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, 49 amostras não tinham perfil nos critérios de inclusão exigidos e, apesar de analisadas e liberados os laudos para os coinvestigadores, não foram consideradas nos resultados do trabalho. Das 332 amostras restantes, 35 (11,8%) amostras restantes não amplificaram na técnica desenvolvida para o estudo. Dessas 35 amostras que não tiveram amplificação na metodologia adotada, 16 eram procedentes de Itajaí (SC) e 12 de Porto Alegre (RS), sendo 7 amostras das demais cidades pesquisadas.

Foram considerados os resultados do estudo de genotipagem de 297 amostras de pacientes oriundos das cinco regiões do Brasil. A representatividade nas regiões, cidades, estados e respectivos números de pacientes é citada a seguir: região norte, 47 pacientes na cidade de Manaus (AM); nordeste, 47 pacientes em Salvador (BA); região centro-oeste (ou central), 47 em Brasília (DF); sudeste, cidades do Rio de Janeiro (RJ) e Santos (SP), respectivamente 47 e 33 pacientes e região sul, representada pelas cidades de Itajaí (SC) com 31 indivíduos e Porto Alegre (RS) representado por um número amostral de 45 pacientes.

5.1. CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, ANÁLISE DOS PARÂMETROS LABORATORIAIS E DADOS COMPORTAMENTAIS.

O estudo das características sociodemográficas, a análise dos parâmetros laboratoriais e dos dados comportamentais da população HIV positivas antes de iniciar TARV, estão representados na tabela 5.1.

Em relação à idade pode-se observar: 35,6 anos em Salvador (BA), seguida por 37,0 em Itajaí (SC), 38,3 em Manaus, 38,5 no Rio de Janeiro (RJ), 40,2 em Brasília (DF); 40,3 em Porto Alegre (RS) e 44,6 anos nos pacientes de Santos (SP). A prevalência da população estudada no Brasil foi de 39,0 anos e o intervalo de idade ficou entre 18 e 76 anos (Tabela 5.1).

A mediana de idade dos pacientes foi de: 35 anos em Itajaí, 36 em Manaus, 37 no Rio de Janeiro, 38 em Brasília, 39 em Salvador, 41 anos em Porto Alegre e 47 anos nos pacientes da cidade de Santos (Tabela 5.1).

Realizou-se o estudo da prevalência da população em relação ao gênero masculino, com os seguintes resultados: 89,4% no Rio de Janeiro, 76,6% em Brasília; 66,7% em Santos; 64,5% em Itajaí; 64,4% em Porto Alegre; 63,8% em Salvador, e Manaus com 59,6% de homens (Tabela 5.1). A prevalência do gênero masculino no Brasil foi de 69,7%.

A prevalência de etnia branca do grupo estudado resultou em: 80,6% em Itajaí, 80,0% em Porto Alegre; 55,3% no Rio de Janeiro; 42,6% em Salvador (BA); 6,1% em Santos (SP) e a prevalência de 2,1% em Manaus (AM). Há uma diferença importante entre etnia branca em relação a não branca, característica previamente estimada pela diversidade populacional existente nas regiões estudadas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Características sociodemográficas da população HIV+ pré-terapia, contagem de células T CD4+, carga viral e dados comportamentais.

Região	Cidade/UF	Características sociodemográficas da população HIV+ pré-terapia, contagem de TCD4+, CV e dados comportamentais.											
		Média/Med Idade anos (max-mín)	Masc. %	Brancos %	Escol. (≥8 anos) %	Viagem ext. %	Média/Med CD4+ cel/mm3	Média/Med CV log ₁₀	HSH %	UDI %	Parc HIV+ %	Parc TARV %	n
N	Manaus (AM)	38.3 /36 (18-61)	59.6	2.1	78.7	4.3	291.9/294	4.42/4.30	23.4	40.4	51.0	29.8	47
NE	Salvador (BA)	35.6/ 39 (18-51)	63.8	42.6	54.5	8.6	185.5/233	4.99/4.94	29.8	14.0	36.2	17.0	47
CO	Brasília (DF)	40.2/ 38 (21-56)	76.6	31.9	63.8	14.9	211.1/225	5.20/4.89	38.3	19.1	23.4	21.3	47
SE	Rio de Janeiro (RJ)	38.5/ 37 (27-76)	89.4	55.3	89.4	34.0	213.1/257	5.16/4.95	72.3	46.8	38.3	14.9	47
	Santos (SP)	44.6/ 47 (26-62)	66.7	6.1	54.6	6.1	267.7/273	4.95/4.45	27.3	9.1	33.3	6.1	33
S	Itajaí (SC)	37.0/ 35 (25-63)	64.5	80.6	48.4	12.9	251.6/260	5.19/4.76	16.1	25.8	32.3	6.5	31
	Porto Alegre (RS)	40.3/41 (23-65)	64.4	80.0	44.4	8.9	242.0/261	5.20/4.63	15.6	2.2	55.5	24.4	45
Brasil		39.0/ 39 (18-76)	69.7	42.7	62.0	14.8	237.6/256	5.03/4.70	32.9	23.2	38.7	18.8	297

Legenda: A tabela acima refere a média/med idade=média e mediana de idade em anos, (max-mín=idade máxima e mínima), Masc.=gênero masculino(%), Brancos=etnia branca (%), Escol. =escolaridade igual ou superior a 8 anos (%), Viagem ext.=viagem ao exterior (%); HSH=homens que fazem sexo com homens; UDI=usuário de drogas injetáveis; Parc HIV+= paciente mantém relacionamento com parceiro(a) HIV positivo; Parc TARV=paciente mantém relacionamento com parceiro(a) HIV+ em terapia ARV; Média/Med=média/mediana; N=Norte; NE=Nordeste; CO=Centro-oeste; SE=Sudeste; S=Sul; UF=unidade Federativa; AM=Amazonas; Ba=Bahia; DF=Distrito Federal RJ=Rio de Janeiro; SP=São Paulo; SC=Santa Catarina; RS=Rio Grande do Sul; n=número; % =porcentagem; ARV=antirretroviral.

O nível de escolaridade foi estratificado na faixa de oito anos ou mais de estudo, com os seguintes resultados: 89,4% dos pacientes do Rio de Janeiro, 78,7% em Manaus; 63,8% em Brasília; 54,6% em Santos; 54,5% em Salvador e as cidades da região sul apresentaram as prevalências de 48,4% Itajaí (SC) e 44,4% Porto Alegre (RS). A média nacional de escolaridade igual ou superior a oito anos foi de 62,0% (Tabela 5.1).

O questionamento de viagens ao exterior foi realizado como parâmetro cultural. A maior prevalência de viagens ao exterior (34,0%), ocorreu nos pacientes do Rio de Janeiro (RJ), nos demais pacientes dos sítios analisados obtivemos índices percentuais abaixo de 15,0% (Tabela 5.1).

A prevalência nacional da média de CD4 foi de 237,6 células/mm³ e a mediana resultou em 256 cel/mm³. Avaliamos a média e mediana de CV no Brasil, que ficou em 5,03 log₁₀ e 4,70 log₁₀, respectivamente. (Tabela 5.1).

Os dados comportamentais em relação ao HIV foram tabulados por HSH, UDI, parceiro HIV positivo e desses se estavam sob esquema de TARV. A prevalência de HSH resultou em: 72,3% no Rio de Janeiro, 38,3 % Brasília; 29,8% Salvador; 27,3% Santos; 23,4% Manaus e os menores índices percentuais foram observados na região sul, com 16,1% e 15,6%, respectivamente, em Itajaí e Porto Alegre. A média nacional de HSH no estudo foi de 32,9%.

Quanto aos resultados de prevalência de pacientes UDI, observou-se: 46,8% no Rio de Janeiro (RJ), 40,4% em Manaus (AM); 25,8% Itajaí (SC); 19,1% Brasília (DF); 14,9% Salvador (BA); 9,1% Santos (SP) e 2,2% em Porto Alegre (RS). A prevalência nacional resultou em 23,2% de UDI na população estudada (Tabela 5.1).

Outro dado pesquisado no questionário da ficha de investigação individual do paciente foi em relação ao parceiro (a) sabidamente HIV+, independente do gênero masculino ou feminino analisado. Este inquérito foi realizado para observarmos qual o

grau de informação de risco comportamental da população alvo. Para maior entendimento desse tópico citamos a seguir, os resultados numéricos do gênero masculino e do feminino, apresentados após a prevalência. (não apresentados na tabela 5.1) A maior prevalência de pacientes que mantinham relacionamento com parceiros HIV+ ocorreu com 55,5% (17M/8F) em Porto Alegre (RS); 51,0% (11M/13F) em Manaus (AM); 38,3% (16M/2F) no Rio de Janeiro (RJ); 36,2% (9M/8F) em Salvador (BA); 33,3% (7M/4F) em Santos (SP); 32,3% (3M/7F) em Itajaí e 23,4% (4M/7F) em Brasília (DF). A prevalência nacional atingiu 38,7% dos indivíduos matinham relacionamento com parceiros HIV positivos (Tabela 5.1).

Aos pacientes que se relacionavam com parceiros sabidamente HIV+, questionou-se se esses parceiros estavam em TARV. Os resultados foram: 29,8% no norte; 17,1% no sul (6,5% em Itajaí e 24,4% em Porto Alegre); 17,0% no nordeste; 14,9% no centro-oeste; 11,3% no sudeste (14,9% no Rio de Janeiro e 6,1% em Santos). O estudo nacional de pacientes com parceiros HIV+ em TARV na população avaliada foi de 18,8% (Tabela 5.1).

5.2 ANÁLISES DOS SUBTIPOS E MUTAÇÕES TDR DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A análise dos subtipos do HIV-1 e sua distribuição por regiões do Brasil está representada na tabela 5.2. Os dados da construção e análise da árvore filogenética não foram apresentados no atual trabalho.

As regiões sudeste e sul que foram representadas por duas cidades, respectivamente Rio de Janeiro (RJ) e Santos (SP), Itajaí (SC) e Porto Alegre (RS) receberam estudo individual na mesma tabela com a finalidade de definirmos as diferenças entre cidades da mesma região.

Tabela 5.2 Subtipos do HIV-1 na população estudada por região do Brasil.

Regiões do Brasil	Subtipos do HIV-1 %						n
	B	C	D	F	BF	BC	
Norte	87.3	2.1		6.4	4.3		47
Nordeste	80.8	4.3		10.6	4.3		47
Centro-oeste	87.2	6.4		6.4			47
Sudeste	85.0	1.2	1.2	6.3	5.0	1.2	80
<i>Santos (SP)</i>	81.8	3.0		3.0	12.2		33
<i>Rio de Janeiro (RJ)</i>	87.3		2.1	8.5		2.1	47
Sul	29.0	51.3		3.9	5.3	10.5	76
<i>Itajaí (SC)</i>	16.1	71.0			3.2	9.7	31
<i>Porto Alegre (RS)</i>	37.8	37.8		6.7	6.7	11.0	45
BRASIL	70.8	15.5	0.3	6.4	4.0	3.0	297

Legenda: n=número total de indivíduos analisados; %= porcentagem de subtipos encontrados

O estudo da prevalência dos subtipos do HIV-1 no Brasil resultou em: 70,8% de subtipo B do HIV-1, 15,5% C, 0,3% D, 6,4% F, 4,0% BF e 3,0% BC (Tabela 5.2).

As características dos subtipos do HIV-1 foram estudadas por região e apresentadas em ordem decrescente de prevalência, na região norte: 87,3% B, maior proporção deste subtipo em relação a todas as regiões; 6,4% F, 4,2% BF, 2,1% C; região

nordeste: 80,8% B; 10,6% F e 4,3% de cada um dos subtipos C e BF; a região centro-oeste apresentou os resultados: 87,2% B, 6,4% de cada subtipo C e F; sudeste: 85,0% B, 6,3% F, 5,0% BF e 1,2% de cada um dos subtipos C, D e BC. Na região sul os subtipos foram: 51,3% C; 29,0% B; 10,5% BC; 5,3% BF e 3,9% F (Tabela 5.2).

As formas recombinantes circulantes do HIV-1 , CRF_BC e CRF_BF tiveram baixas prevalências nas regiões norte, nordeste, sudeste e sul e na região centro-oeste, sem nenhum CRF observado (Tabela 5.2).

Tabela 5.3 TDR (mutações) e subtipos, por região brasileira e cidade pesquisada.

BRASIL		HIV-1	MUTAÇÕES TDR (Bennett <i>et al</i> , 2009; WHO,2009)		
Região	Cidade	Subtipo	Transcriptase Reversa		Protease
			ITRN	ITRNN	IP
SE	STOS-5	B	-	K103N	-
SE	STOS-26	B	T69D	-	-
SE	STOS-27	B	T69D	-	-
SE	STOS-47	B	-	K103N	I54T
SE	RJ-5	B	-	K103N	-
SE	RJ-18	B	D67G	-	-
SE	RJ-19	B	D67N	-	-
SE	RJ-24	B	V75M, F77L	P225H	-
SE	RJ-36	B	M41L, L210W, T215S	Y188L	-
SE	RJ-52	B	-	K101E, K103N, G190A	-
NE	BA-1	B	-	-	I54T
NE	BA-4	B	M41L	L100I, K103N	-
NE	BA-6	B	M41L, D67N, L210W, T215D	-	-
NE	BA-8	B	M41L, T215CS	-	M46I, L90M
NE	BA-12	B	K219N	-	-
NE	BA-48	B	-	-	D30N, M46I
NE	BA-53	B	-	-	D30N, M46I
NE	BA-54	FB	-	K103N	-
NE	BA-57	B	T215S	-	-
N	MA-12	B	-	V106A	-
N	MA-13	B	-	-	D30N, M46I
N	MA-27	F	M41L, T215E	-	D30N, N88D
N	MA-29	B	M184V	-	-
CO	DF-6	B	T215S	-	-
CO	DF-12	B	T215D	Y181C	-
CO	DF-13	B	T215S	-	-
CO	DF-16	B	-	-	G73S
CO	DF-21	B	M41L, L210W, T215D	-	L24I, M46L, V82A
S	ITA-8	BC	K219N	-	-
S	ITA-18	C	K65R	-	-
S	ITA-21	C	-	-	L90M
S	POA-16	C	M41L, L210W, T215FS	K101E, V106M, G190A	-
S	POA-25	C	-	-	L76V
S	POA-52	BC	-	-	G73S
S	POA-53	B	-	-	M46I
S	POA-54	BC	-	K103N	-

Legenda: N=Norte.; NE=Nordeste; CO=Centro Oeste; SE=Sudeste; S=Sul; ; MA=Manaus; BA=Salvador; DF=Distrito Federal; RJ=Rio de Janeiro; STOS=Santos; ITA=Itajaí; POA=Porto Alegre. Em negrito=subtipos não B.

A presença de cepas portadoras de mutações TDR foi observada em 36 pacientes distribuídos nas 5 regiões brasileiras (Tabela 5.3).

Todas as mutações de resistência dessa população foram comparadas à Lista de Mutações de TDR aos ARV pelo HIV-1 (Bennett *et al*, 2009), publicada como referência pela Organização Mundial de Saúde em 2009 e consideradas aquelas relacionadas no estudo de Bennett e colaboradores, 2009. Foi utilizada também a análise filogenética das amostras dos portadores de TDR para a identificação dos subtipos do HIV-1 nas frações RT e protease do gene *pol* (Tabela 5.3).

A análise resultou em 69 mutações TDR nos 36 pacientes das 7 cidades pesquisadas, sendo 20 pacientes TDR com 32 mutações para ITRN (55,5 %), sendo detectadas uma única mutação por paciente: K65R, D67G, V75M, F77L, T215F/S, T215C/S, T215E, M184V; ocorreram duas vezes as seguintes mutações: D67N, T69D, K219N; 3 vezes a mutação T215D; quatro vezes a mutação L210W; 7 vezes a M41L e 4 vezes a T215S. As 17 mutações para ITRNN foram detectadas em 12/36 pacientes com TDR (33,3%), e observadas uma única vez as seguintes mutações: L100I, V106A, V106M, P225H, Y181C, Y188L; 2 vezes: K101E, G190A; 7 vezes a K103N. Para os IP foram observadas 20 mutações em 13 pacientes TDR (36,1%) e detectadas uma única vez as seguintes mutações: L24I, M46L, V82A, L76V e N88D; 2 vezes as mutações: I54T, G73S e L90M; 4 vezes a D30N e 5 vezes a M46I (Tabela 5.3)

Em relação aos ARV, por categoria e resistência transmitida, 27/36 (75,0%) representaram os pacientes com mutação (ões) TDR a uma única classe de ARV (12/36 aos ITRN, 6/36 aos ITRNN e 9/36 aos IP). Os outros 9/36 pacientes (25,0%) apresentaram mutações a mais de uma classe de ARV. A prevalência nacional foi mutações a uma classe de medicamentos resultou em: 4,1% TDR aos ITRN, 2,0% aos

ITRNN e 3,0% aos IP; a duas classes de medicamentos: 1,7 % para ITRN e ITRNN (TR), seguida por 1,0% a ITRN e IP, um único evento para ITRNN e IP (0,3%) em uma amostra de Santos. A prevalência de mutações TDR no Brasil foi de 9,1% de mutações TDR a uma classe de ARV e 3,0% a duas classes de ARV (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 TDR, de acordo com o número de classes de ARV envolvido.

Mutações TDR	ITRN (%)	ITRNN (%)	IP (%)	Total
A uma classe	4.1	2.0	3.0	9,1%
A duas classes	ITRN + ITRNN 1.70	ITRNN + IP 0.3	ITRN + IP 1.0	3,0%

Legenda: Os dados acima se referem a 36 pacientes com mutações de resistência de 297 investigados. ITRN=Inibidor de Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo; ITRNN= Inibidor de Transcriptase Reversa Não-análogo de Nucleosídeo; IP= Inibidor de Protease.

A prevalência de pacientes com e sem mutações TDR no Brasil estudadas por regiões e respectivos subtipos do HIV estão representadas na tabela 5.5. A seguir são apresentados os resultados: 8,5% dos pacientes com mutações TDR na região norte apresentaram os subtipos B (6,4%) e F (2,1%); 19,1% de pacientes com mutações TDR no nordeste, com a presença do subtipo B (17,1%) e BF (2,1%); 10,6% no centro-oeste, todos do subtipo B; 12,5% no sudeste, todos subtipo B; 10,5% no sul, com 1,3% do subtipo B, 5,3% C e 4,0% BC.

No Brasil, a prevalência de pacientes HIV positivos crônicos pré-terapia com mutações TDR foi de 12,1%.

Tabela 5.5 Estudo comparativo de pacientes com e sem mutações TDR e prevalência de subtipos por região no Brasil.

Regiões do Brasil							
	Subtipos do HIV-1 (%)						Total
Norte	B	C	D	F	BF	BC	%
TDR (n= 4)	6.4			2.1			8.5
NTDR	80.9	2.1		4.2	4.2		
n (47)	87.3	2.1		6.4	4.2		
Nordeste							
TDR (n= 9)	17.0				2.1		19.1
NTDR	63.8	4.3		10.6	2.1		
n (47)	80.8	4.3		10.6	4.3		
Centro-oeste							
TDR (n= 5)	10.6						10.6
NTDR	76.6	6.4		6.4			
n (47)	87.2	6.4		6.4			
Sudeste							
TDR (n= 10)	12.5						12.5
NTDR	72.5	1.2	1.2	6.3	5.0	1.2	
n (80)	85.0	1.2	1.2	6.3	5.0	1.2	
Região Sul							
TDR (n= 8)	1.3	5.3				4.0	10.5
NTDR	27.6	46.0		3.9	5.3	6.6	
n (76)	29.0	51.3		3.9	5.3	10.5	
BRASIL	70.8	15.5	0.3	6.4	4.0	3.0	12.1

Legenda: TDR=pacientes portadores de mutações de resistência transmitida aos antirretrovirais pelo HIV-1; NTDR=pacientes não portadores de mutações de resistência transmitidas aos antirretrovirais pelo HIV-1; n=número..

CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO

CAPÍTULO 6. DISCUSSÃO

A introdução da HAART levou a diminuição da morbidade e mortalidade dos indivíduos infectados pelo HIV-1. No entanto, um grande obstáculo foi o surgimento das cepas virais resistentes, impedindo que os esquemas de tratamento sejam bem sucedidos. Outra ameaça potencial ao sucesso do HAART é a resistência transmitida, onde um indivíduo é infectado por uma cepa do HIV-1 já resistente a um ou mais medicamentos.

O incremento do uso de ARV em países desenvolvidos e em desenvolvimento levou a um aumento da incidência de resistência aos medicamentos e, posteriormente, um *pool* diversificado de vírus resistentes que poderiam estabelecer novas infecções.

A transmissão de vírus resistentes aos medicamentos ocorre independentemente da via de infecção (Erice *et al*, 1993; Boden *et al*, 1999). No entanto, ao avaliar a epidemiologia da resistência transmitida, deve-se ter o cuidado de excluir a possibilidade de exposição prévia aos ARV não revelada pelo paciente, particularmente em indivíduos sem registros médicos anteriores.

Deve-se lembrar que as diferenças práticas de tratamento também podem influenciar na taxa de resistência aos medicamentos na população não tratada (De Mendoza *et al*, 2005). Portanto, a eficácia e estratégias de tratamento em pacientes infectados pelo HIV-1 determinam a probabilidade de transmissão do vírus e o perfil mutacional da resistência transmissível.

A atual pesquisa baseou-se no estudo dos pacientes das principais cidades representativas por região brasileira e duas cidades adicionais consideradas de suma importância na epidemiologia do HIV pela alta incidência de aids foram Santos e Itajaí

(www.aids.gov.br). Contamos com a participação de coinvestigadores regionais e para reduzir as dificuldades na manutenção da qualidade das amostras e logística de transporte, utilizamos a aplicação de sangue total em papel-filtro (por punção digital) e o transporte dos DBS via correios até o Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP.

Considera-se difícil comparar as estimativas nacionais, regionais e locais de resistência transmitida pelo HIV por causa das diferenças no desenho dos estudos e porque as estimativas foram baseadas em listas diferentes de mutações de resistência. Para tal uma lista padrão de mutações para caracterizar a epidemiologia da resistência transmitida foi desenvolvida (Shafer *et al*, 2007; Bennett *et al*, 2009; WHO, 2009).

A avaliação da presença de cepas transmitidas com resistência aos ARV em portadores crônicos HIV+ ainda virgens de tratamento é uma dinâmica adotada em países desenvolvidos. O atual estudo visa caracterizar a distribuição desta epidemia “secundária” no Brasil, ou seja, a transmissão silenciosa de vírus resistentes aos ARV na população alvo do estudo. Os dados epidemiológicos brasileiros resultantes da pesquisa pretendem contribuir com a definição de estratégias para realização de testes de resistência no período pré início de terapia.

O estudo sociodemográfico populacional revelou prevalência nacional de média e mediana de idade de 39 anos/ 39 anos. Estudo realizado, na cidade de São Paulo, com 123 pacientes HIV-1+ crônicos e sem terapia ARV, apresentou a média de 37 anos no grupo avaliado (Gonzalez *et al*, 2007).

A prevalência populacional do gênero masculino na atual pesquisa foi de 69,7%, ou seja, 207 homens em 297 pacientes. Gonzalez *et al*, 2007, observaram que 73% dos pacientes crônicos e não tratados eram do gênero masculino, ou 89 homens dos 123 pesquisados.

As prevalências de subtipos do HIV-1 nas diversas regiões foram estabelecidas com: 70,8% B, 15,5% C; 6,4% F e os demais subtipos abaixo de 5,0%. Apesar da prevalência brasileira ser do subtipo B, na região sul verificou-se a prevalência do subtipo C (51,3%) e a presença do subtipo BC (10,5%). A prevalência do subtipo B no Brasil é semelhante ao que acontece em toda a América Latina, Europa Ocidental, e Estados Unidos (Pinto *et al*, 2007).

Os pacientes que apresentaram mutações TDR aos ARV no Brasil representam 12,1%.da população estudada As regiões norte (8,5%), centro-oeste (10,6%), sudeste (12,5%) e sul (10,5%) mantiveram níveis intermediários (5% a 15%), enquanto a região nordeste apresentou 19,1% ou alta prevalência.

Recentemente, Arruda *et al*, 2010, observaram 9,5% de pacientes com mutação TDR em uma população de 74 pacientes de Fortaleza, Ceará (27% eram pacientes sintomáticos e 6.8% haviam sido recentemente infectados por detecção do teste *BED*). Referiram a prevalência de 50% de homens e desses, 27.0% eram HSH. Comparando os dados com a atual pesquisa realizada na mesma região, porém representada pela cidade de Salvador (BA),que apresentou prevalência de 63,8% de homens e 29,8% de HSH.

Cardoso *et al* (2009) estudaram 103 pacientes virgens de tratamento na cidade de Goiânia (GO), entre 2007 e 2008, e observaram a prevalência de 10% de mutações de TDR (calculada por *Stanford Surveillance Drug Resistance Mutation* ou SDRM). No atual trabalho observamos 10,6% para a mesma região, porém na cidade de Brasília.

Taxas comparativamente elevadas de transmissão de resistência foram observadas em Madrid de 1997 a 1999 e em 2002 (Grant 2003, Wensing 2003a, De Mendoza, 2003). Numa avaliação multicentrica em 40 cidades dos Estados Unidos da América, 14% de 371 isolados de pacientes que nunca receberam TARV e tinham pelo menos uma mutação de resistência (Ross, 2004). Apesar da referência ser de uma

pesquisa fora do país e em tempo remoto, a prevalência e o número de pacientes avaliados, se aproxima dos da atual pesquisa.

Em 2003, foram publicados os primeiros resultados do Estudo CATCH (que mais tarde se transferiu para o estudo Europeu SPREAD). Foram avaliados dados de mais de 1600 novos pacientes diagnosticados com HIV de 17 países Europeus. Desde 1996 até 2002, a prevalência de mutações TDR foi de 10% (Wensing 2003b). Estes dados foram confirmados pelo estudo SPREAD, que reuniu dados de 2008 pacientes (Estratégia para controlar a disseminação da resistência aos fármacos do HIV) (http://hivmedicine.aidsportugal.com/html/09_Resistance.html). O objectivo do estudo SPREAD foi de monitorizar as mutações TDR em pacientes recentemente infectados pelo HIV , sem tratamento e as suas implicações clínicas. Enquanto a proporção de mutações ITRN, que era de 13% no início do estudo, diminuiu cerca de metade ao longo do tempo, a frequência de mutações de resistência aos ITRNN aumentou de 2,3 para 9,8%. A frequência de resistência aos IP permaneceu estável em 3,0%-4,0%. De 1996 a 2002, a presença de TDR foi observada principalmente em infecções do subtipo B. As mutações de resistência estavam presentes em 12,9% dos pacientes com infecção do subtipo B comparando com apenas 4,8% em subtipos não-B. Contudo, um aumento ao longo do tempo foi também observado em subtipos não-B (de 2,0% em 1996-1998 a 8,2% em 2000-2001).

Inocêncio *et al*, 2009, publicaram um estudo com a prevalência estimada de 5% a 15% em grandes cidades (São Paulo, Rio de Janeiro, Belém/Brasília) e abaixo de 5% em outras cidades como Salvador e Porto Alegre). Esta informação deve ser reavaliada com continuidade, como referido no estudo de Maslin e colaboradores, 2005, que cita a existência de altas prevalências de TDR em outros países.

As TDR presentes no atual estudo, revelaram que a única cidade que não apresentou pacientes TDR aos IP foi o Rio de Janeiro (RJ), na região sudeste. Todas as demais cidades pesquisadas tiveram pacientes com mutações TDR aos IP.

Soares *et al*, em 2004, avaliaram 41 pacientes que ainda não haviam iniciado TARV, em diferentes períodos e regiões distintas do Rio de Janeiro. Todas as amostras eram do subtipo B (1987-1994, 1998, 2001, 2000-2002). Comparado ao atual estudo, 87,3% eram subtipo B, 8,5% F, 2,1% D e 2,1% BC, porém todos os pacientes com mutações TDR foram do subtipo B na cidade do Rio de Janeiro.

Em relação ao número de mutações TDR por classe de ARV e pacientes TDR, a mais prevalente ocorreu em 20 pacientes com 32 mutações TDR para a classe dos ITRN, seguida de 12 pacientes com 17 mutações TDR para a classe de ITRNN e 13 com 20 mutações TDR para IP, observado o fato de que 9 pacientes apresentaram mutações a duas classes de ARV. Não foi observado nenhum paciente com mutações TDR às três classes de ARV na população estudada das cinco regiões do Brasil.

As regiões sudeste e centro oeste tiveram representatividade de pacientes TDR apenas do subtipo B do HIV-1. Nas demais regiões foram observados, além dos subtipos B, 9 pacientes com mutações TDR com subtipos não-B, como descritos a seguir: um subtipo CRF_12 FB no nordeste, um subtipo F1 no norte e 4 subtipos C e 3 CRF_31 BC na região sul.

Varella *et al*, 2007, no estado do Rio de Janeiro, estudaram 71 amostras de pacientes HIV+, virgens de tratamento ARV, observou após análise genotípica, 20 pacientes recém-diagnosticados, subtipo B, sem nenhuma resistência a drogas ARV. Nos outros 51 crônicos, 40 (78,4%) apresentavam o subtipo B; 7 (13,7%) subtipo F e 2 (3,9%) subtipo C. Somente uma mutação de resistência foi encontrada (1,4%) na posição M184V, demonstrando alta presença de polimorfismo, com relação as baixas

resistências transmitidas aos ARV nesse grupo. Comparados com os dados da atual pesquisa, não foi observada a mutação M184V nos pacientes crônicos imediatamente antes de iniciar terapia, do Rio de Janeiro.

Sá-Ferreira *et al* (2007) estudaram 74 amostras de pacientes do Estado do Rio de Janeiro, 21,6% eram amostras de candidatos a doadores de sangue recém diagnosticados e verificaram 83,8% de subtipo B, 2,7% de F e 11% de CRF_BF. Apenas uma amostra evidenciou mutações com alto nível de resistência para ITRN (M41L e T215S). Para os ITRNN e IP, nenhuma mutação de resistência foi encontrada.

Medeiros *et al* (2006), pesquisaram em Pernambuco (NE), 84 pacientes virgens de tratamento e observaram a ocorrência de 3 mutações de resistência para os ITRN, 2 (2,4%) M41L e 1(1,2%) K219E. Não houve mutação de resistência para ITRNN e IP. Nesse grupo foram encontrados para todos os pacientes e na mesma região, porém em Salvador: 61 subtipos B (72,6%), 19 F (22,6%), 1 subtipo C (1,2%) e três recombinações entre os subtipos B/F (3,6%).

Soares *et al* (2005), avaliaram 85 pacientes HIV positivos procedentes do Rio Grande do Sul, e verificaram o aumento do subtipo C naquele estado: 38 (45%) eram subtipo C e 35 (42%) subtipo B; com uma mutação de resistência caracterizada. Comparados com os resultados da atual pesquisa em Porto Alegre obtivemos: 37,8% de subtipo B; 37,8% C; 6,7% F; 6,7% BF e 11,0% BC.

A pesquisa realizada em São Paulo com doadores de sangue avaliou 341 amostras, 21 tinham uma ou mais mutações associadas com resistência aos ARV. Destas, 12 amostras apresentaram um mutação que confere resistência aos ITRN, 3 a ITRNN e 4 a inibidores de protease. Duas amostras continham isolados com resistência a duas classes de ARV (uma a ITRN/ITRNN e outra a ITRNN/IP) (Barreto *et al*, 2006).

Um estudo que foi conduzido com 100 pacientes com infecção recente (IR) pelo HIV-1 na cidade de Santos revelou prevalência de 22% de resistência aos ITRN, 15% aos ITRNN e 13% aos IP, com índice de resistência cumulativa de 36% (Sucupira *et al*, 2007). Pode-se comentar que a prevalência de mutações transmitidas aos ARV em pacientes cronicamente infectados e pré-terapia pode ser inferior, se comparada aos pacientes que apresentam infecção recente. Pode-se avaliar, conservando as proporcionalidades de 100 com IR (Sucupira *et al*, 2007) e 33 pré-terapia (PT) resultante da atual pesquisa, respectivamente os seguintes dados para Santos: 7,3% IR/6,1% PT para ITRN; 5,0% IR/6,1% PT para ITRNN e 4,2% IR/3,0% PT para IP.

Gagliani *et al*, 2011 realizaram estudo comparativo de pacientes na cidade de Santos (SP), analisando amostras pré início da primeira TARV entre 43 pacientes com falha virológica ao HAART (48% com TDR) e outro grupo de 37 pacientes com sucesso virológico após 6 meses do início do tratamento (16,2% com TDR), demonstrando nítida associação entre falha virológica e presença de TDR. O estudo atual apresentou os seguintes resultados em pacientes TDR de Santos: mutações a uma classe de ARV: 6,1% aos ITRN, 3,0% aos ITRNN. Apenas um paciente apresentou mutações TDR a mais de uma classe de ARV (3,0%) (ITRNN e IP). Santos apresentou prevalência de 12,1% para pacientes com presença de TDR.

Estudos realizados recentemente no Brasil, demonstraram a importância da avaliação da presença de mutações TDR aos ARV pelo HIV-1 em pacientes com infecção IR, como o realizado por Inocencio *et al* (2009). Nessa publicação, o grupo de pesquisadores cita que um número superior a 200.000 indivíduos portadores do HIV-1 no nosso país que ainda não iniciou TARV no Brasil. Observou, também, que em capitais de maior população, como São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Salvador

(BA), Porto Alegre (RS), Brasília (DF)/ Belém (PA) havia a presença de 5% a 15% da população com presença de mutações TDR nos pacientes com IR. Os dados são semelhantes aos resultados de pacientes crônicos com mutações TDR observados na atual pesquisa, apenas se diferenciando nos pacientes de Salvador, que foi de 19,1% (alta prevalência). De fato, um estudo que avaliou mutações TDR em adultos e crianças na cidade portuária de Salvador apontou taxas preocupantes (22%) (Pedroso *et al.* 2007).

Locateli *et al*, 2007, em Santa Catarina, verificaram que a prevalência do subtipo C tem aumentado no Brasil. Em Santa Catarina há uma das mais altas incidências desse subtipo no país. Este estudo revelou que 48% foram classificados como subtipo C e 23% subtipo B. Possíveis formas recombinantes foram caracterizadas para BC (23%) e BF (6%). Comparando com o atual estudo podemos citar que a prevalência observada no mesmo estado, representado pela cidade de Itajaí, resultou em: 71,0% de subtipo C; 16,1% B; 9,7% CRF_BC e 3,2% CRF_BF. Acredita-se que os pacientes considerados no estudo, provavelmente foram infectados pelo HIV-1 a um tempo mais remoto, podem traduzir as modificações da epidemia ao longo do tempo.

A prevalência de mutações TDR na população do atual estudo revelou-se maior do que a estimada no trabalho de Inocêncio *et al*, 2009 em relação às cidades de Salvador (entre 5% e 15%) e Porto Alegre (menor de 5%).

As mutações TDR podem persistir durante muito tempo. Num estudo espanhol de seroconversores, 10 pacientes com mutações TDR foram acompanhados por um período médio de 41 meses. Foram detectadas as seguintes mutações: T215Y em três isolados, T215N/S/C em quatro, M41L em seis, L74V em um, I54V em um, V82S/A em dois, e L90M em dois isolados. Em apenas três dos 10 casos observou-se

reversão (parcial) (do T215Y). Os revertentes T215Y (T215S) foram detectados em dois pacientes (De Mendoza *et al* , 2005).

A relevância clínica das mutações TDR foi comprovada em vários estudos realizados ao longo do tempo. As mutações transmitidas podem limitar as opções terapêuticas futuras e reduzir as taxas de resposta terapêutica (Harzic, 2002; Little *et al*, 2002; Riva *et al*, 2002; Hanna *et al*, 2001; Balotta *et al*, 2000), situação tema de estudos a mais de uma década. Um estudo retrospectivo com 202 doentes mostrou que quando se inicia a TARV sem informação de resistências preexistentes, os doentes com estas mutações TDR apresentam uma resposta ao tratamento mais lenta e apresentam um maior risco de insucesso terapêutico. (Little *et al*, 2002). No entanto, uma cuidadosa consideração de qualquer resistência preexistente torna frequentemente possível o sucesso no primeiro tratamento (Gagliani *et al*, 2010; Oette *et al*, 2005; Little *et al* , 2002; Hanna *et al*, 2001).

As mutações TDR representam alterações genotípicas que possuem algumas peculiaridades. Por exemplo, a M184V, provoca resistência a alguns medicamentos que atuam nos ITRN e é uma mutação conhecida por conferir redução de *fitness* viral, enquanto que as mutações K103N e Y181C conferem resistência aos ITRNN e são conhecidas por terem pouco impacto no *fitness* viral (Nicastri *et al*, 2002). Em particular, foi demonstrado que mutações que foram transmitidas, como M41L, T69N, K103N e algumas T215 variantes apresentam pequena reversão ao tipo selvagem ao longo do tempo (Leigh Brown *et al*, 2003).

Dados recentes indicam que a transmissão de mutantes resistentes aos ARV podem persistir por muitos meses ou anos, na ausência de pressão seletiva de ARV (Jain *et al*, 2011; Barbour *et al*, 2004; Pao *et al*, 2004 e Leigh Brown *et al*, 2003).

Deve-se refletir sobre o estabelecimento da infecção com uma homogênea quasipécies de vírus resistentes aos medicamentos. Neste cenário, o surgimento de vírus do tipo selvagem requer a reversão de cada mutação de resistência aos medicamentos. Cuidados devem ser tomados ao avaliar o significado das mutações reversas. Por exemplo, na ausência de pressão seletiva do uso de medicamentos, as mutações dos análogos da timidina T215Y/F são muitas vezes substituídos por variantes T215C/D/N/S, que tem pouco impacto sobre a resistência fenotípica aos ITRN. Esse fenômeno tem sido observado após a infecção com T215Y e, portanto a presença de 215 revertentes deve ser vista como um marcador de TDR (Gandhi *et al*, 2003).

Métodos e genotipagem de rotina só são capazes de detectar mutantes resistentes dentro das quasipécies dominantes e só tem uma sensibilidade de aproximadamente 20%. Portanto, a detecção dessa população TDR pode ter deixado de detectar os vírus da população viral minoritária, presentes em frequências mais baixas, que muitas vezes não são detectadas usando o padrão dos métodos de diagnóstico. No entanto, os mutantes TDR podem ser detectados usando técnicas mais sensíveis, como PCR em tempo real e único sequenciamento do genoma, para identificar populações minoritárias com uma sensibilidade para detecção dessa população de 0,1% - 0,2% (Garcia-Lema *et al*, 2005; Mellors *et al*, 2004). Estas técnicas foram usadas com sucesso para detectar TDR entre os pacientes sem evidência de resistência por genotipagem padrão. Outra técnica adotada na atualidade é a análise por *ultra-deep sequencing*.

Um estudo mostrou que, em uma população já conhecida por apresentar TDR pelos métodos convencionais, populações minoritárias presentes podem ser encontradas usando PCR real time seguida de sequenciamento clonal (Johnson *et al*,

2005). As quasispécies em minoria poderão tornar-se, em breve, a população dominante devido a pressão seletiva no momento da introdução da TARV. Novas evidências sugerem que, pelo menos para os ITRNN, as quasispécies minoritárias podem reduzir a resposta virológica à TARV (Gagliani *et al*, 2010; Bae *et al*, 2004).

Retomando a discussão sobre a relação da reversão da mutação T215 (computamos 10 mutações no códon 215, apenas uma T215F/S ou seja, houve a modificação de ACT/C (T) para TTT/C(F) e T215S (TCT/C) que pode resultar da mutação revertente de qualquer TAT/C (Y) ou TTT/C (F).

O códon 215 da TR pode apresentar mutações de resistência aos ITRN, com T215Y/F evoluindo a partir de T pela aquisição de duas mutações: ACT/C (T) para TAT/C (Y) ou TTT/C (F). Pacientes infectados com cepas principalmente contendo T215Y/F, freqüentemente desenvolvem vírus com mutações de reversão parcial nesta posição (Godsmith *et al*, 1996; Yerly *et al*, 1998; De Ronde *et al*, 2001). T215C/D é resultado da mutação revertente da TAT/C (Y) para TGT/C (C) ou GAT/C (D). Da mesma forma, a mutação T215I/V é resultado da mutação revertente de TTT/C (F) para a ATT/C (I) ou GTT/C(V). T215E (GAA/G) exige duas trocas de T215Y (TAT/C) ou uma substituição ocorrendo no comum revertente T215D (GAT/C).

A maioria das mutações revertentes no códon 215 não reduzem a susceptibilidade aos ITRN (dados para T215I/V não estão disponíveis), e parece surgir devido à vantagem de *fitness* em comparação as mutações T215Y ou T215F, mas sua presença pode sugerir que os mutantes T215Y ou T215F estiveram presentes na quasispecie viral infectando estes indivíduos. (Violin *et al*, 2004).

Os revertentes T215 também estão entre as mutações mais comuns observadas em vírus de pessoas previamente não tratadas, ocorrendo em cerca de 3% dos

pacientes (Oette *et al*, 2006; Cane *et al*, 2005; Wensing *et al* , 2005; Little *et al*, 2002; Garcia-Lema *et al*, 2001). Vale ressaltar que as 10 mutações observadas na população estudada no atual trabalho de pesquisa perfazem 3,4% de todos os 297 pacientes virgens de tratamento e analisados pré-terapia, o que confirma a citação dos autores acima.

Foi observada uma única mutação TDR no códon 184, a M184V em um paciente de Manaus, e ausente nos outros 35 pacientes com mutações TDR, resultado, fato que contrasta com o resultado de pesquisas brasileiras e mundiais que revelam maior prevalência dessa mutação em estudos de TDR em pacientes recém-infectados ou em fase aguda.

Além das 10 mutações TDR em ITRN nos revertentes 215, observamos maior prevalência das mutações da M41L (2,4%), seguida da L210W (1,3%) e as demais prevalentes em 1,0% ou menos. Para outras NAM (mutações análogas de nucleosídeos), a prevalência foi baixa, com a T69D (0,67%) mutações únicas em 2 pacientes de Santos, e 0,34% para cada uma das outras mutações presentes.

A prevalência das mutações TDR para os ITRNN foi maior no códon 103, com a presença da mutação K103N (2,4%) e inferior a 1,% nas demais mutações para essa classe de ARV. Considerando os IP, foram observadas as seguintes prevalências: M46I (1,7%) e D30N (1,3%), seguidas de menos de 1% para as demais mutações para essa classe ARV.

As maiores prevalências de mutações TDR por classe de medicamentos para a fração TR e PR foi avaliada por região do Brasil. Os pacientes com mutações TDR aos ITRN resultaram em: sudeste (2,0% ou 6/297), nordeste (1,7% ou 5/297) e centro oeste (1,3% ou 4/297), nas demais regiões ficaram em 1,0% ou menos. Para as mutações TDR aos ITRNN, a maior prevalência foi verificada na região sudeste

(2,0% ou 6/297) e em menos de 1,0% para as outras regiões. No sul e nordeste verificou-se a maior prevalência de mutações TDR para os IP (1,3% por região ou 4/297), e menos de 1,0% nas demais. Vale ressaltar que nesses dados apresentados consideramos mutações em relação a cada uma das classes de ARV, 9 pacientes com TDR a duas classes de medicamentos foram incluídos nesses dados.

A prevalência nacional de pacientes com mutações TDR a uma classe de ARV, na atual pesquisa, resultou em: 4,1% aos ITRN, 3,0% aos IP e 2,0% aos ITRNN. As mutações TDR a duas classes de ARV apresentaram as seguintes prevalências: 1,7% aos ITRN mais ITRNN, 1,0% aos ITRN mais IP e 0,3% aos ITRNN mais IP. Em nenhum paciente do estudo foi relatada a presença de mutações TDR às três classes de ARV.

O uso de amostras em DBS pode ter seus resultados com possível interferência na detecção de material genético em relação ao uso de plasma para a mesma finalidade, sendo considerado um ponto frágil do estudo.

Em adicional, a prevalência de amostras com subtipos não B do HIV-1 parece interferir na qualidade de amplificação do material genético viral. É concebível que amostras não B podem ter influenciado nas dificuldades encontradas na amplificação das amostras, provavelmente pela utilização de primers desenhados para o subtipo B.

A caracterização da ocorrência de insucesso na amplificação das 28/35 amostras (80%) representadas por 16 amostras de Itajaí (SC) e 12 de Porto Alegre (RS), parece estar relacionada à prevalência de subtipos não B do HIV-1 na epidemia regional no sul do país.

O fato da observação de prevalência de mutações TDR na população de algumas cidades representativas das regiões demográficas do Brasil, não pode definir a uma realidade para todo o país.

A busca do perfil exigido nos critérios de inclusão e no momento imediatamente pré-terapia fez com que não fosse atingido o número mínimo estabelecido nas cidades escolhidas, principalmente as de menor número populacional (Santos e Itajaí).

A parte interessante do estudo, surgiu como um desafio de se poder trabalhar em uma pesquisa multicêntrica nacional prospectiva, que abrangia locais tão distantes e distintos, com a proposta inovadora de transporte das coletas em DBS em uma população pouco investigada, os pacientes HIV+ em fase de iniciar terapia no Brasil. A dinâmica da pesquisa foi se revelando com os primeiros resultados e conseguimos atingir os objetivos propostos com o desenvolvimento adequado do estudo e a participação de toda a equipe de coinvestigadores das cinco regiões do Brasil.

Acredita-se também que o presente trabalho contribuiu com os pacientes que se dispuseram a aderir à pesquisa, os quais tiveram a divulgação dos resultados de genotipagem e subtipagem aos coinvestigadores e/ou médico(a) de referência.

CAPÍTULO 7. CONCLUSÃO

CAPÍTULO 7. CONCLUSÃO

A prevalência de resistência transmitida nos pacientes cronicamente infectados pelo HIV-1, virgens de tratamento e indicados para início imediato de TARV ficou entre intermediário e alto. Essa informação sugere ser custo efetivo a realização de teste de genotipagem pré-início de tratamento.

A variabilidade genética do HIV-1, representada por seus subtipos, está presente em todas as regiões do Brasil.

A análise das características sociodemográficas, laboratoriais e dos dados comportamentais dos indivíduos HIV positivos, infectados há um tempo remoto, define o perfil dessa população indicada a iniciar terapia no Brasil.

O uso de amostras em DBS foi eficaz demonstrando potencial principalmente em regiões distantes e/ou isoladas e de difícil acesso. Podemos considerar a utilização de DBS no monitoramento do estudo de resistência antirretroviral como um fator que leva a redução de custo e complexidade na coleta e transporte de amostras para este fim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrams,DI, Lewis BJ, Beckstead JH, Casavant CA, Drew WL. Persistent diffuse lymphadenopathy in homosexual men: endpoint or prodrome? Ann Intern Med. 1984 Jun; 100(6):801-8.
- Accetturi CA, Pardini R, Pinto GHN, Turcato G, Lewi DS, Diaz RS. Effects of CCR5 genetic polymorphism and HIV-1 subtype in antiretroviral response in Brazilian HIV-1 infected patients. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology, 2000; 24 (04): 399-400.
- Adamson CS, Freed EO. Novel approaches to inhibiting HIV-1 replication. Twenty-five Years of Antiretroviral Drug Development: Progress and Prospects. Antiviral Research. Volume 85, Issue 1, January 2010; p 119-141.
- Adamson CS, Freed EO. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly, Release, and Maturation. HIV-1: Molecular Biology and Pathogenesis Viral Mechanisms, Second Edition. Advances in Pharmacology, 2007; vol55, p.347-387.
- Aleixo AW, Martins A, Tanuri A, *et al.* Drug resistance mutation (DRM) profile and accumulation kinetics in HIV+ individuals infected with subtype B and F failing highly active antiretroviral therapy (HAART) is influenced by different viral codon usage. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. nov 2008.
- Aleixo AW. Análise de polimorfismo do gene pol em isolados de HIV-1 de pacientes residentes no estado de Minas Gerais e em falha terapêutica no período de 2002 a 2004. Tese de doutoramento defendida na Universidade Federal do Rio de Janeiro – CCS – Instituto de Biologia em 2006.

Algoritmo Brasileiro – Interpretação – Genotipagem do HIV-1 do Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais da Secretaria de Vigilância em Saúde (versão 10 – outubro de 2009) – Ministério da Saúde (BR). Capturado entre os anos de 2009 a 2011 para a realização da pesquisa pelos sites <http://forrest.ime.usp.br:3001/resistencia> e <http://algoritmo.aids.gov.br/resistencia.html>

Algorithms in Bioinformatics. Disponível em <<http://www.splitstree.org>>. Capturado em 18 09. 2010.

Bae A, Waters J, Margot N. et al. Pre-existing L74V is a risk factor for virological non-response and development of K65R in patients taking tenofovir DF (TDF). *Antivir Ther.* 2004; 9:S174.

Barbour JD, Hecht FM, Wrin T, Liegler TJ, Ramstead CA, Busch MP, Segal MR, Petropoulos CJ, Grant RM. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS.* 2004 Aug 20; 18(12):1683-9.

Barcellos C, Acosta LMW, Lisboa EP *et al.* Estimativa da prevalência de HIV em gestantes por análise espacial, Porto Alegre, RS. *Rev. Saúde Pública* [online]. 2006, v.40, n.5, pp. 928-930.

Barlett JA, Fath MJ, Demasi R, Hermes A, Quinn J, Mondou E, Rousseau F. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-infected adults. *AIDS.* 2006; 20(16):2051-64.

Barreto CC, Nishya A, Araújo LV *et al.* Trends in Antiretroviral Drug Resistance and Clade Distributions Among HIV-1–Infected Blood Donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:338Y341.

- Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther.* 2008; 13 Suppl 2:1-13.
- Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, Kuritzkes DR, Fleury H, Kiuchi M, Heneine W, Kantor R, Jordan MR, Schapiro JM, Vandamme A-M, Sandstrom P, Boucher C A B, van de Vijver D, Rhee S, Liu T, Pillay D, Shafer RW. Drug Resistance Mutations for Surveillance of Transmitted HIV-1 Drug-Resistance: 2009 Update. *PLoS ONE* | www.plosone.org, 2009 March; 4 (3):4724.
- Bertagnolio S, Sutherland D. *World Health Organization*, HIV Department, Geneva, Switzerland. *AIDS*, 2005 March 19; (12):1329-40.
- BioAfrica - REGA HIV-1 & 2 Automated Subtyping Tool (Version 2.0) <http://jose.med.kuleuven.be/genotypetool/html/subtypinghiv.html>
- Boden D, Hurley A, Zhang L et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *Jama* 1999; 282: 1135-1141.
- Boletim Epidemiológico Aids.DST (versão preliminar – Brasília 2010) Ano VII- nº1. Disponível em <<http://www.portal.saude.gov.br>>
- Bongertz V, Bou-Habib DC, Brigido LF, *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.* 2000; 23, p.184-193.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM *et al.* (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 March; 28(3): 495-503
- Borroto-Esoda K, Harris J, Waters J, Hinkle J, Shaw A, Quinn J, and Rousseau F. Baseline Genotype as a Predictor of Virological Failure in Patients Receiving Emtricitabine Once Daily or Stavudine Twice Daily in Combination with

- Didanosine and Efavirenz. The 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, USA, 2004. *Abstracts*, n° 672.
- Blower S, Bondine E, Kahn J, McFarland W. The antiretroviral rollout and drug-resistant HIV in Africa: insights from empirical data and theoretical models. *AIDS*. 2005; 19:1-14.
- Brambilla D, Jennings C, Aldrovandi G, et al. Multicenter evaluation of use of dried blood spot and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(5):1888-1893.
- Brenner B, Turner D, Oliveira M, Moisi D, Detorio M, Carobene M, Marlink RG, Schapiro J, Roger M, Wainberg MA. A V106M mutation in HIV-1 clade C viruses exposed to efavirenz confers cross-resistance to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *AIDS*, 2003 Jan 3; 17(1):F1-5.
- Brenner BG, Routy JP, Petrella M, *et al.* Persistence and fitness of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 acquired in primary infection. *J Virol* 2002; 76:1753-1761.
- Brenner B, Wainberg MA, 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* 2000; 16: 429-434.
- Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IV, Brigido L, Dantas MC. Brazilian Network for HIV Resistance Surveillance (HIV-BresNet): a survey of chronically infected individual. *AIDS* 2003; 17:1063–1069.
- Brindeiro RM, Vanderbotght B, Caride E, *et a* . Sequence diversity of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 from untreated Brazilian individuals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43, 1674-1680.

- Briones C, Domingo E, Molina-París C. Memory in retroviral quasispecies: experimental evidence and theoretical model for human immunodeficiency virus. *J Mol Biol* 2003; 331: 213-229.
- Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. HIV-1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. *J Virol* 2007; 81(19): 10209-10219.
- Calazans A, Brindeiro R, Brindeiro P, Verli H, Arruda MB, Gonzalez LM, Guimaraes JA, Diaz RS, Antunes OA, Tanuri A. Low Accumulation of L90M in Protease from Subtype F HIV-1 with Resistance to Protease Inhibitors Is Caused by the L89M Polymorphism. *J Infect Dis.* 2005 Jun 1; 191(11):1961-70.
- Cane P, Chrystie I, Dunn D, Evans B, Geretti AM, Green H, et al. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study. *BMJ.* 2005; 331:1368. [PMC free article] [PubMed]
- Cardoso LP, Queiroz BB, Stefani MM. HIV-1 *pol* phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *J Clin Virol.* 2009 Oct; 46(2):134-9.
- Carr JK, Avila M, Gomez Carrillo M et al. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of HIV-1 into South America. *AIDS* 2001; 15: 41-47.
- Caseiro MM, Sa-Filho DJ, Soares MS. HIV type 1 *pol* gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. *AIDS Res Human Retroviruses.* 2008; v 24, number 3.
- Casseb J, Hong MA, Gonzalez C *et al.* Two variants of HIV-1 B serotype are transmitted heterosexually in São Paulo, Brazil. *Bras J Med Biol Res* 1998; 31, p.1243-1246.

- Cavalcanti AMS, Lacerda HR, Brito AM, Pereira S, Medeiros D, Oliveira S. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type-1 in the Northeast Region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 2007; v.102 (7): 785-792.
- Cerqueira DM, Amorim RMS, Silva RR, Câmara GNL, Brígido MM, Martins CRF. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99 (8): 877-882.
- Chakraborty H, Sena PK, Helmsa RW, Vernazzab PL, Fiscus SA, Erond JJ, Pattersone BK, Coombsf RW, Kriegerg JN, Cohend MS. Viral burden in genital secretions determines male-to-female sexual transmission of HIV-1: a probabilistic empiric model. *AIDS* 2001; 15:621-627.
- CDC (Center for Disease Control). Possible transfusion associated acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR*. 1982; 31:652-4.
- CDC (Center for Disease Control). Immunodeficiency among female sexual partners of male with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *MMWR*, 1983, 31:697-8.
- CDC (Center for Disease Control). Public Health Service Task Force recommendations for the use of antiretroviral drugs in pregnant women infected with HIV-1 for maternal health and for reducing perinatal HIV-1 transmission in the United States. *MMWR*, 1998; 47 (RR-02):1-30.
- Coffin JM. Retroviridae: the viruses and their replication. In *Virology* (Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B & Straus SE, eds). 1996. 3rd edit., pp. 1767–1847, Lippincott-Raven Publishers, New York.

- Conlon CP, Klenerman P, Larder BA, Phillips RE. Herosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants associated with zidovudine resistance. *J Infect Dis.* 1994; 169:411-5.
- Conway B, Montessori V, Rosleau D, Montaner JS, O'Shaughnessy MV, Frasen S, Shillington A, Weislow O, Mayers DL. Primary lamuvudine resistance in acute/early human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 1999 Apr; 28(4):910-1.
- Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, *et al.* High frequency of the GWG (Pro Trp) envelop variant of HIV-1 in Southeast of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Retrovirol.* 1998 sept 1; 19 (1), p.74-99.
- Clark S, Calef C, Mellors J. Mutations in Retroviral Genes Associated with Drug Resistance p.58-158 in *HIV Sequence Compendium 2006/2007*. Edited by: Thomas Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors J, Wolinsky S, Korber B. Published by: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. LA-UR 07-4826.
- Clavel F, Hance AJ. HIV Drug Resistance. *New Engl J Med.* 2004; 350:1023-1035.
- Clavel F, Guyader M, Guetard D *et al.* Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature.* 1986; 324, p 691 - 695 (18 December 1986).
- Couto-Fernandez JC *et al.* Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individual failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2005; Vol. 100(1): 73-78.
- CRF A/B do HIV-2. Acessado em 27/04/2011
<www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CFRs/CRFs.html>

- Daar ES, Richman DD. Confronting the emergence of drug-resistant HIV type 1: impact of antiretroviral therapy on individual and population resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21:343–357. [PubMed: 15929696]
- Deeks SG, Wrin T, Liegler T, et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N Engl J Med* 2001; 344:472-80.
- Deeks SG. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 26 suppl.1.p.S25-33, 2001.
- De Mendoza C, Rodriguez C, Eiros JM *et al* (2005). Antiretroviral recommendations may influence the rate of transmission of drug-resistant HIV type 1. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:227-232.
- De Ronde A, van Dooren M, van Der Hoek L, *et al*. Establishment of new transmissible and drug-sensitive human immunodeficiency virus type 1 wild types due to transmission of nucleoside analogue-resistant virus. *J Virol*. 2001; 75:595-602.
- De Ronde A, Schuurman R, Goudsmit J *et al*. First case of new infection with zidovudine-resistant HIV-1 among prospectively studied intravenous drug users and homosexual men in Amsterdam, The Netherlands. *AIDS*. 1996; 10:231-232.
- De Sá-Filho DJ, Soares MS, Candido V *et al*. HIV Type 1 pol Gene Diversity and Antiretroviral Drug Resistance Mutations in Santos, Brazil. *AIDS research and Human Retroviruses*. 2008; v 24, n 3; 347-353.
- De Sá Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM, Sabino EC, Diaz RS, Janini LM. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 Jan; 22(1):1-13.

- De Sá-Filho DJ, Sanabani S, Diaz RS et al. Analysis of Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome Reveals a Variable Spectrum of Subtypes B and F Recombinants in São Paulo, Brazil. *Mary Ann Liebert Inc.* 2005; vol.21, n 2, pp. 145-151.
- Delaugerre C, Morand-Joubert L, Chaix ML, Picard O, Marcelin AG, Schneider V, Krivine A, Compagnucci A, Katlama C, Girard PM, Calvez V. Persistence of multidrug-resistant HIV-1 without antiretroviral treatment 2 years after sexual transmission. *Antivir Ther.* 2004 Jun; 9(3):415-21.
- Devereux HL, Emery VC, Johnson MA *et al* (2001). Replicative fitness in vivo of HIV-1 variants with multiple drug resistance-associated mutations. *J Med Virol.* 2001; 65:218-224.
- Dias CF, Nunes CC, Freitas IO, Lamego IS, Oliveira IM, Gilli S, Rodrigues R, Brigido LF. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naïve patients in Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009 Jul-Aug; 51(4):191-6.
- Diaz RS. Guia para o manuseio de testes deresistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV-1. Abbott Laboratórios do Brasil, 2004.
- Doms RW. Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology.* 2000 Oct 25;276(2):229-37.
- Domingo E, Baranowsky E, Ruiz-Jarajb C, Martin-Hernandez AM, Saiz JC, Escarnis C. Quasispecies structure and persistance of RNA viruses. *Emergingi Infections Diseases.* 1998; 4(4): 521-527.

- Eien, M. On the nature of virus quasispecies. *Trends Microbiol.* 1996; 4; 216–218.
- Erice A, Mayers DL, Strike DG, Sannerud KJ, McCutchan FE, Henry K, Balfour HH Jr. Brief report: primary infection with lamivudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med.* 1993 Apr 22; 328(16):1163-5.
- Eyer-Silva W & Morgado M. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 2007 november, v. 102(7),p. 809-815.
- Fauci AS. 25 Years of HIV/AIDS Scienc: reaching the poor with research advances. *Cell.* 2007; 2; 429-432.
- Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV- induced disease. *Nature*, London. 1996; v.384, p.529-534.
- Fauci AS. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) Infection. *Ann Intern Med.* 1991; 114, p.783-791.
- Fiscus SA, Brambilla D, Grosso L, *et al.* Quantitation of human immunodeficiency virus type1 RNA in plasma by using blood dried on filter paper. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(1):258-260
- Fisher A, Lejczak C, Lambert C, Simple DNA extraction method for dried blood spot and comparison of two PCR assays for diagnosis of vertical human immunodeficiency virus type 1 transmission in Rwanda. *J Clin Microbiol.* 2004 Aug; 42(1):16-20.
- Fraser C, Hollingsworth TD, Chapman R *et a* . Variation in HIV-1 set-point viral load: epidemiological analysis and evolutionary hypothesis. *PNAS* 2007; 44(104): 17441-46.

- .Frenkel LM, Wagner II LE, Atwood SM, Cummins TJ, Dewhurst S. Specific, sensitive, and rapid assay for human immunodeficiency virus type 1 pol mutations associated with resistance to zidovudine and didanosine. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33; 342–47.
- Gadelha SR, Shindo N, Cruz JNM, Morgado MG, Galvão-Castro B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceará, Northeast, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* .2003; 98 (4): 461-4.
- Gagliani LH, Alkmim Maia WT, Sá-Filho D, Janini LM, Sucupira MC, Caseiro MM, Diaz RS. The association between primary antiretroviral resistance and HAART virologic failure in a developing set. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011 Mar; 27(3):251-6.
- Gaines H, Von Sidor MAE, Von Stedingk LV *et al.* Immunobiological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS*. 1990; v.4, p.995.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immunodeficiency syndrome (Aids). *Science*. 1983; 220: 865-7.
- Gallo RC (2002). The Early Years of HIV/AIDS. *Science* .29 November 2002; v. 298, n. 5599, p. 1728-1730.
- Gandhi RT, Wurcel A, Rosenberg ES, *et al.* Progressive reversion of human immunodeficiency virus type 1 resistance mutations in vivo after transmission of a multiply drug-resistant virus. *Clin Infect Dis*. 2003; 37:1693-1698.
- Gao F, Bailes E, Robertson DL, *et al.* Origin of HIV in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 1999; 397:436-441.
- Garcia-Lerma JG, Nidha S, Blumoff K, Weinstock H, Heine W. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naïve persons. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98:13907-12.

- Gasparoto CT. Análise de prevalência de resistência primária genotípica do HIV aos anti-retrovirais em gestantes na cidade de São Paulo. Tese (Mestrado). 2005. Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina.
- Gisselquist, D. Emergence of the HIV Type 1 Epidemic in the Twentieth Century: Comparing Hypotheses to Evidence. *AIDS Research and Human Retroviruses*. December 2003; 19(12): 1071-1078 (on line). Published in Volume: 19 Issue 12: July 5, 2004.
- Goepfert PA, Kilby JM, Saag MS, Delwart EL, Busch MP, Cohen MS, Montefiori DC, Haynes BF, Gaschen B, Athreya GS, Lee HY, Wood N, Seoighe C, Perelson AS, Bhattacharya T, Korber BT, Hahn BH, Shaw GM (2008). Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 27; 105(21):7552-57.
- Gonsalez CR, Alcalde R, Nishiya A *et al*. Drug resistance among chronic HIV-1-infected patients naïve for use of anti-retroviral therapy in Sao Paulo city. *Virus Research*. 2007; v.129; 2:87-90.
- Gottlieb M, Schorroof R. Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. *Pneumocystis carinni* pneumonia and mucosal candidiase in previous health homosexual men. *N Engl J Med*. 1981; 305:1426-31.
- Goudsmit J, de Ronde A, Ho DD, Perelson AS. Human immunodeficiency virus fitness in vivo: calculations based on a single zidovudine resistance mutation at codon 215 of reverse transcriptase. *J Virol*. 1996; 70:5662–5664. [PMC free article] [PubMed]
- Grant RM, Hecht FM, Warmerdam M, Liu L, Liegler T, Petropoulos CJ, Hellmann NS, Chesney M, Busch MP, Kahn JO. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. *JAMA*. 2002 Jul 10; 288(2):181-8.

- Guimarães ML, Ever-Silva WA, Couto-Fernandez JC, Morgado MG. Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS*. 2008; 22 (3) 433-5.
- Guyader M, Emerman, M, Sonigo, P; Clavel, F, Montagnier, L, Alizon, M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*. 1987; 326 (6114): 662-669.
- Grant AD, Cock KMD (2001). ABC of AIDS – HIV infection and AIDS in the developing world. *BMJ*. 2001; 322; 145-1478.
- Greco DB, Simão M. Brazilian policy of universal access to AIDS treatment: sustainability, challenges and perspectives. *AIDS*. 2007; 21:34-35.
- Hallal R, Ravasi G, Kuchenbecker R, Greco D, Simão M. O acesso universal ao tratamento antirretroviral no Brasil. Depto de DST/Aids e Hepatites Virais, Ministério da Saúde. *Revista Tempus Actas em Saúde Coletiva*, 2010.
- Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implicatios. *Science*. 2000; 287: 607-614.
- Hammer SM, Saag MS, Schechter M, Montaner JSG, Schooley RT, Jacobsen DM, Thompson MA, Carpenter CCJ, Fischl MA, Gazzard BG, Gatell JM, Hirsch MS, Katzeinstein DA, Richman DD, Vella S, Yeni PG, Volderbing PA(2006). Treatment for Adult HIV infection. 2006 .*JAMA*. 2006; 7:827-43.
- Hart JD, Signori P. *AIDS*, Editora Saúde, 1998.
- Hecht FM, Grant RM. Resistance testing in drug-naive HIV-infected patients: is it time? *Clin Infect Dis*. 2005 Nov 1; 41(9):1324-5.
- Hecht FM, Grant RM, Petropoulos CJ, Dillon B, Chesney MA, Tian H, Hellman NS, Brandapalli NI, Digilo L, Branson B, Kahn JO. Sexual transmission of an HIV-1

- variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitor. *N Engl J Med* .1998 Jul 30; 339(5): 307-11.
- Hemelaar J, Osmanov SA *et al*. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*. 2006; 20: p.13–23.
- Holguín A, Pena MJ, Troncoso F, Soriano V. Introduction of non-B subtypes among Spaniards newly diagnosed with HIV subtype 1 in the Canary Islands. *AIDS Res Hum Retrovirus*. 2007; 4:498-502.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12; 373(6510):123-6.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2006)– Disponível em <<http://mapas.ibge.gov.br>>. Acesso em 09/12/ 2006.
- Imrie A, Beveridge A, Genn W, Vizzard J, Cooper DA. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 resistant to nevirapine and zidovudine. Sydney Primary HIV Infection Study Group. *J Infect Dis* .1997; 175: 1502-6.
- Inocencio LA, Pereira AA, Sucupira MC, Fernandez JC, Jorge CP, Souza DF, Fink HT, Diaz RS, Becker IM, Suffert TA, Arruda MB, Macedo O, Simão MB, Tanuri A (2009). Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc*. 2009 Sep 18; 12(1):20.
- Integrase. HIV Slidset Download Library. Disponível em <http://clicoptions.com>
- Jaggy C, von Overbeck J, Ledergerber B, *et al*. Mortality in the Swiss HIV Cohort Study (SHCS) and the Swiss general population. *Lancet*. 2003 Sep 13; 362(9387):877-8.

- Jain V, Sucupira MC, Bacchetti P, Hartogensis W, Diaz RS, Kallas EG, Janini LM, Liegler T, Pilcher CD, Grant RM, Cortes R, Deeks SG, Hecht FM. Differential Persistence of Transmitted HIV-1 Drug Resistance Mutation Classes. *JID J Infect Dis*. 2011 Apr; 203(8):1174-81.
- Janini LM, Pieniazek D, Peralta JM, Schechter M, Tanuri A, Vicente AC, dela Torre N, Pieniazek NJ, Luo CC, Kalish ML, Schochetman G, Rayfield MA. Identification of single and dual infections with distinct subtypes of human immunodeficiency virus type 1 by using restriction fragment length polymorphism analysis. *Virus Genes*. 1996; 13(1):69-81.
- Jegade O, Babu J, Di Santo R, McColl DJ, Weber J, Quiñones-Mateu M (2010). HIV type 1 integrase inhibitors: from basic research to clinical implications. *Antiviral Res*. 2010, January; 85(1): 119.
- Jegade O, Babu J, Di Santo R, McColl DJ, Weber J, Quiñones-Mateu M (2008). HIV type 1 integrase inhibitors: from basic research to clinical implications. *AIDS Rev*. 2008 Jul-Sep; 10(3):172-89.
- Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, Schapiro JM, Richman DD (2007). Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. *Top HIVMed*. 2007, 15 (4): 119-125.
- Johnson VA, Petropoulos CJ, Woods CR, Hazelwood JD, Parkin NT, Hamilton CD, Fiscus SA (2001). Vertical transmission of multidrug-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and continued evolution of drug resistance in an HIV-1-infected infant. *J Infect Dis*. 2001 Jun 1; 183(11):1688-93.
- Johnson JA, Li J-F, Brant A. et al. Multi-drug resistant HIV-1 are transmitted more frequently than current estimates. *Antivir Ther*. 2005; 10:S124.

- Kamkamidze G, Sullivan T, Charbonneau T (2001). Occurrence of HIV-1 reverse transcriptase gene mutation at codon 215 in HIV-infected infants. *J Clin Virol* 2001; 22:143-8.
- Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, *et al.* Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med.* 2005 Apr; 2(4):e112.
- Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 May 27; 105(21):7552-7.
- Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, *et al.* Comparative fitness of multidideoxynucleoside-resistant human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in an in vitro competitive HIV-1 replication assay. *J. Virol.* 1999; 73, 5356–5363.
- Kiessling AA, Fitzgerald LM, Zhang D. *et al.* Human immunodeficiency virus in semen arises from a genetically distinct virus reservoir. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1998; 14(suppl 1):S33–S41. [PubMed]
- Korber B, Gaschen B, Yusim K, Thakallapally R, Kesmir C, Detours V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull.* 2001; 58:19–42.
- Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fucini R, Merigan TC, Richman DD, Morris D, Hubbel E, Chee M, Gingeras T.R, 1996. Extensive polymorphism observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Med.* 1996; 2: 753–759.
- Kozal M, Amico R, Chiarelli J, Schreiber T, Cornman D, Fisher W, Fisher J, Friedland G. Continuing High-risk Sexual Behavior and Increasing Antiretroviral Resistance among HIV+ Patients in Care Helps Explain the Rising Prevalence of

- Resistance among New HIV Infections. In 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA, EUA. 2004: Abstrat n 35LB.
- Leigh Brown AJ, Frost SD, Mathews WC, *et al.* Transmission fitness of drug-resistant human immunodeficiency virus and the prevalence of resistance in the antiretroviral-treated population. *J Infect Dis.* 2003; 187: 683-686.
- Leigh Brown AJ, Frost SDW, Good B, *et al.* Genetic basis of hypersusceptibility to protease inhibitors and low replicate capacity of human immunodeficiency virus type 1 strains in primary infection. *J Virol.* 2004; 78:2242-2246.
- Leal E, Martins L, Janini M, Diaz, R. Evolutinary dynamics of HIV-1 BFD and CB recombinants in South America. In Abstrat Book of 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections- CROI, Boston, February 3-6, 2008.
- Lemey P, Pybus OG, Wang B *et al* (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *PNAS.* 2003 may 27; v.100.
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA *et al.* Isolation of Lymphocytophatic Retroviruses from San Franscisco Patients with AIDS. *Science*, 1984; 224:840-842.
- Levy JA. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiol*, 1993; 57: 183-289.
- Levy JA. Discovery and Nature of the HIV virion. IN: HIV and Pathogenesis of AIDS. Washington: ASM Press, 1994; 1-10.
- Levy JA. Infection by human immunodeficiency virus CD4 is not enough. *N. Engl J Med*, Boston, v.335, n.20, p.1528, 1996.
- Levy, JA. HIV and Pathogenesis of AIDS. Department of Medicine and Cancer Research Institute, University of California, School of Medicine. São Franscico, California. Second Edition. 1998.

- Li CC, Beck IA, Seidel KD, et al. Persistence of human immunodeficiency type 1 subtype B DNA in dried-blood samples on FTA filter paper. *J Clin Microbiol*. 2004 Aug; 42(8):3847-9.
- Little SJ, Frost SD, Wong JK, Smith DM, Pond SL, Ignacio CC, Parkin NT, Petropoulos CJ, Richman DD. Persistence of transmitted drug resistance among subjects with primary human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2008 Jun; 82(11):5510-8. Epub 2008 Mar 19.
- Little SJ, Koelsch KK, Ignacio CC, Wong JK, Lie Y, Frost SW, and Richman DD. Persistence of Transmitted Drug-resistant Virus among Subjects with Primary HIV Infection Deferring Antiretroviral Therapy. In: 11th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, San Francisco, CA EUA. 2004: Abstract n° 36LB.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Daar ES, Markowitz M, Collier AC, Koup RA, Mellors JW, Connick E, Conway B, Kilby M, Wang L, Whitcomb JM, Hellman NS, Richman DD. A antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med*. 2002a Aug 8; 347(6):385-94.
- Little SJ, Holte S, Routy JP, Connick E, Daar ES, Conway B, Wang L, Markowitz M, Collier AC, Dawson K, Hellman NS, Richman DD. Longitudinal analysis of transmitted drug resistance among recently HIV-infected subjects in North America. *Antivir Ther*. 2002 b, 7(Suppl1):S144.
- Little SJ, Daar ES, D'Aquila RT, Keiser PH, Connick E, Whitcomb JM, Hellman NS, Petropoulos CJ, Sutton L, Pitt JA, Rosenberg ES, Koup RA, Walker BD, Richman DD (1999). Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA*, 1999 Sep 22-29; 282(12):1177-9.
- Locatelli D, Stoco PH, de Queiroz AT, Alcântara LC, Ferreira LG, Zanetti CR, Rodrigues R, Grisard EC, Pinto AR. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa

Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. *J Med Virol.* 2007 Oct; 79(10):1455-63.

LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY HIV DATABASE. Disponível em <<http://hiv-web.lanl.gov>>. Acessado em 18.07.2010.

LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY HIV DATABASE (2007). Disponível em <<http://hiv-web.lanl.gov>>. Acessado em 18.05.2007

Machado DM, Delwart EL, Diaz RS, de Oliveira CF, Alves K, Rawal BD, Sullivan M, Gwinn M, Clark KA, Busch MP (2002). Use of the sensitive/less-sensitive (detuned) EIA strategy for targeting genetic analysis of HIV-1 to recently infected blood donors. *AIDS* 2002, Jan 4; 16(1):113-9.

Machado ES, Lambert JS, Afonso AO, Cunha SM, Oliveira RH, Tanuri A, Sill AM, Soares MA (2004). Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil (2004). *An. Acad. Bras. Ciênc.v.76 no.4.Rio de Janeiro Dec. 004.*

Markowitz M, Mohri H, Mehandru S, Shet A, Berry L, Kalyanaraman R, Kim A, Chung C, Jean-Pierre P, Horowitz A, La Mar M, Wrin T, Parkin N, Poles M, Petropoulos C, Mullen M, Boden D, Ho DD. Infection with multidrug resistant, dual-tropic HIV-1 and rapid progression to AIDS: a case report. *Lancet.* 2005 Mar 19-25; 365(9464):1031-8.

Martinez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB, Wainberg MA. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996–2008). *Journal of the International AIDS Society.* 2009; 12:11.

Maslin J, Rogier C, Caron M, Gradadam M, Kocck JL, Nicand E. Short Communication. Antiretroviral drug resistance among drug-naïve HIV-1 infected individuals in Djibouti (Horn of Africa). *Antivir Ther* 2005; 10(7): 855-9.

Masquelier B, Lemoigne E, Pellegrin I, et al. Primary infection with zidovudine-resistant HIV. *N Engl J Med*. 1993; 329:1123–4.

Matsumi, S., Kosalaraksa, P., Tsang, H., Kavlick, M.F., Harada, S., Mitsuya, H. Pathways for the emergence of multi-dideoxynucleoside-resistant HIV-1 variants. *AIDS*. 2003; 17, 1127–1137.

Medicina/Net

http://www.medicinanet.com.br/conteudos/biblioteca/2007/escolha_do_esquema_inicial_como_iniciar.htm. Acessado em 19/09/2008.

Melikyan GB. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology*. 2008 Dec 10; 5:111. Review.

Mellors JW. Review of Lago Maggiore resistance meeting. In: 12th World Conference, Geneva, Switzerland, 1998.

Mendonça JS, *et al* (1989). Infecção associada ao HIV: quadro clínico e laboratorial. *Ver Hosp Clin Fac Med São Paulo, Brasil*, 44, p.295, 1989.

Miller V, Sabin C, Hertogs K, et al. Virological and immunological effects of treatment interruptions in HIV-1 infected patients with treatment failure. *Aids* 2000; 14:2857-67.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Aids.DST (versão preliminar)- Brasília, 2010, ano VII-nº1. Disponível no site <http://www.portal.saude.gov.br>

Ministério da Saúde. Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos e Adolescentes Infectados pelo HIV, 2008. Disponível no site <<http://www.portal.saude.gov.br>>

Ministério da Saúde. Disponível em <<http://www.saude.gov.br>>. Acessado em 12/03/2007.

- Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*. 1981 Dec 24; 294(5843):770-1.
- Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I Jr, Veloso VG, *et al*. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1998; 18: 488-494.
- Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, *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 Retrovir*. 1994; 10, p.569-576.
- Myatt M, Bennett D E. A novel sequential sampling technique for the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antiviral Therapy*. 2008; 13 Suppl 2: 37-48.
- Nájera R, Delgado E, Pérez-Alvarez L, Thomson MM. Genetic Recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemics. *AIDS*. 2002; 16 (suppl):S3-S16.
- National Center for Biotechnology Information, 2006 <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>>. Acessado em 14/12/2006.
- Nicastri E, Sarmati L, d'Ettore G *et al* (2002). Replication capacity, biological phenotype, and drug resistance of HIV strains isolated from patients failing antiretroviral therapy. *J Med Virol*. 2002; 69:1-6.
- Oette M, Kaiser R, Daumer M, Petch R, Fatkenheuer G, Carls H, *et al*. (2006). Primary HIV drug resistance and efficacy of first-line antiretroviral therapy guided by resistance testing. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 41:573–581. [PubMed: 16652031]

Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010 <<http://www.oms.org>> . Acesso em 03/12/2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010 <<http://www.oms.org>>. Acessado em 03/12/2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS), 2010 <<http://www.oms.org>>. Acessado em 03/05/2011.

Palella FJ Jr, Katheen MD, Elaney MD *et al.* Declining Morbidity and Mortality among Patients with Advanced Human Immunodeficiency Virus Infection. N Engl J Med, v.338, march 26 1998; n.13.

Pao D, Andrady U, Clarke J *et al.* Long-term persistence of primary genotypic resistance after HIV-1 seroconversion. J Acquir Immune Defic Syndr. 2004; 37:1570-1573.

Paraskevis D & Hatzakis A. Molecular epidemiology of HIV-1 infection. AIDS Reviews. 1999; 1, 238-249.

Pedroso C , Queiroz A, Alcântara, LC, Drexler, JF, Diaz, RS,, Weyll N, Brites C. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: 1 June 2007; v 45 Issue 2 pp 251-253

Peeters M, Sharp PM (2000). Genetic Diversity of HIV-1. The Moving Target. AIDS 14(suppl3):S129-S140, 2000.

Peeters M, Gueye A, Mboup S. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. AIDS. 1997; 11, 493-498.

Perrin L, Kaiser L, Yerly S. Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. The Lancet Infect Diseases. 2003; vol 3, Issue 1, Pages 22-27

Peterlin BM, Trono D. Hide, Shield, Strike Back: How HIV-infected Cells Avoid Immune Eradication. *Nature Reviews, Immunology*. 2003 february; vol3.

Pieniazek D, Rayfield M, Hu DJ, Nkengasong J, Wiktor SZ, Downing R, *et al*. Protease sequences from HIV-1 group M subtypes A–H reveal distinct amino acid mutation patterns associated with protease resistance in protease inhibitor- naïve individuals worldwide. *AIDS* 2000; 14:1489–1495.

Pieniazek D, Peralta JM, Ferreira JA, Krebs JW, Owen SM, Sion FS, Filho CF, Sereno AB, de Sa CA, Weniger BG, *et al*. Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. *AIDS*. 1991; 5(11):1293/9.

Pillay D. Current patterns in the epidemiology of primary HIV drug resistance in North America and Europe. *Antivir Ther* 2004; 9:695–702. [PubMed: 15535406]

Pinto ME, Struchiner CJ (2006). A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 22 (3):473-484, mar, 2006.

Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, Damond F, Robertson DL, Simon F (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*. 2009 Aug; 15(8):871-2.

Proietti A, Barbosa DF, Silva J *et al* (1999). Genetic variability of HVI-1 isolates from Minas Gerais, Brazil. *Rev Microbiol* , v.30, p.2, São Paulo apr/jun 1999.

Programa Nacional de DST/AIDS (PN-DST/AIDS) – MANUAL DST, 2005. Disponível em <www.aids.gov.br>.

Programa Nacional de DST/AIDS (PN-DST/AIDS). Disponível em <www.aids.gov.br>. Acessado em 15.04.2007.

- Quigg M, Rebus S, France AJ, McMenamin J, Darby G, Leigh Brown AJ (1997). Mutations associated with zidovudine resistance in HIV-1 among recent seroconverters. *AIDS*. 1997; 11:835-6.
- 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*. 1999; 5: p 65-74.
- Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV: 2008/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. 7ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- Recommendations of the International AIDS Society- USA Panel. *JAMA*. 2006; 296:827-843.
- Relucio R, Holodny M. HIV-1 RNA and Viral Load. *Clin Lab Med*. 2002; 22:593-610.
- Richman DD, Morton SC, Wrin T, *et al*. The prevalence of antiretroviral drug resistance in the United States. *AIDS*: 2004 Jul 2; v.18 - Issue 10 p 1393-1401.
- Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al* (2000). HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*. 2000 April 7; 288, p.55-56.
- Rodrigues-Júnior AL, Castilho EA. A AIDS nas regiões de fronteira no Brasil de 1990 a 2003. *Rev Panam Salud Publica*. 2009; 25(1):31–8.
- Rodrigues R, Scherer LC, Oliveira CM, Franco HM, Sperhackle RD, Ferreira JL, Castro SM, Stella IM, Brígido LF. Low prevalence of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006, mar; 116 (1-2): 201-7. Epub 2005 Dec 5.
- Ross LL, Lim ML, Liao Q *et al*. (2007). Prevalence of Antiretroviral Drug Resistance and Resistance-Associated Mutations in Antiretroviral Therapy-Naïve HIV-Infected Individuals from 40 United States Cities. *HIV Clin Trials*. 2007; 8(1): –8.

- Ross LL, Lim ML, Liao Q, Wine B, Rodriguez AE, Weinberg W, Shaefer M. Prevalence of Antiretroviral Drug Resistance and Resistance Mutations in Antiretroviral Therapy (ART) Naive HIV Infected Individuals from 44 US Cities During 2003. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), 2004. Washington, DC, EUA, Poster Session 13 (H), Abstract H - 173.
- Rubio A, Leal M, Pineda JA, Caruz A, Luque F, Rey C, Sanchez-Quijano A, Lissen E. Increase in the frequency of mutation at códon 215 associated with zidovudine resistance in HIV-1-infected antiviral-naive patients from 1989 to 1996. *AIDS*. 1997 Jul 15; 11(9): 1184-6.
- Sá-Ferreira JÁ, Brindeiro PA, Chequer FS, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2007 Jan; 47 (1):97-102.
- Sá-Filho DJ, Soares MS, Candido V et al, (2008). HIV type 1pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. *AIDS Res Hum Retrov*. 2008; 24 (3).
- Sá-Filho DJ, Sucupira MC, Caseiro MM et al (2006). Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *Aids Res Hum Retrov*. 2006; 22(1): 1-13.
- Santos AF, Sousa TM, Soares EA, Sanabani S, Martinez AM, Sprinz E, Silveira J, Sabino EC, Tanuri A, Soares MA. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*, 2006 Oct 24; 20(16): 2011-9.
- Sabino EC, Diaz RS, Brigido LF, Learn GH, Mullins JI, Reingold AL, Duarte AJS, Mayer A, Bush MP. Distribution of HIV-1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo City, Brazil. *AIDS*. 1996; 10: 1579-1584.

- Sanabani SS, Pastena ER, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virol J*. 2010 Apr 16; 7:74.
- Sanabani SS, Kleine Neto W, Kalmar EMN, Diaz RS, Janini LM, Sabino EC. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from cohort of 14 patients in São Paulo, Brazil. *Infection Genetics and Evolution*. 2006; 6:368-377.
- Sanabani SS, Kleine Neto W, Sa-Filho DJ, Diaz RS, Munerato P, Janini LM, Sabino EC. Full length genomes analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22(2): 171-176.
- Sax PE, Islam R, Walensky RP, Losina E, Weinstein MC, Goldie SJ, Sadownik SN, Freedberg KA. Should resistance testing be performed for treatment-naïve HIV-infected patients? A cost-effectiveness analysis. *Clin Infect Dis*, 2005 Nov 1; 41(9):1316-23.
- Schwartz SA, Nair MPN. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, Washington, DC, 1999; v.6, n. 3, p.295-305.
- Segura M, Estani SS, Marone R, Bautista CT, Pando MA, Eyzaguirre L, Sánchez JL, Carr JK, Montano J, Weissenbacher M, and Ávila MM. Buenos Aires cohort of men who have sex with men: prevalence, incidence, risk factors, and molecular genotyping of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retrovirus*. 2007; 23 (11):1322-29.
- Serwadda D, Gray RH, Sewankambo NK, Wabwire-Mangen F, Chen MZ, Quinn TC, Lutalo T, Kiwanuka N, Kigozi G, Nalugoda F, Meehan MP, Ashley MR, Wawer MJ (2003). Human immunodeficiency virus acquisition associated with genital ulcer disease and herpes simplex virus type 2 infection: a nested case-control study in Rakai, Uganda. *J Infect Dis*. 2003; 188:1492-1497.

- Shafer RW, Rhee SY, Bennett DE. Consensus Drug Resistance Mutations for Epidemiological Surveillance: Basic Principles and Potencial Controversies. *Antiviral Therap.* 2008; 13 (2) 59-68.
- Shafer RW & Shapiro JM. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART. *AIDS rev.* 2008; 10: 67-84.
- Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, Kuritzkes DR and Bennett D (2007). HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS.* 2007; 21:215–223.
- Shafer RW (2005). Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PLoS Med.* 2005 Apr, 2(4):112. Comment in: *PLoS Med.* 2006 Dec; 3 (12):540.
- Shafer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 2002; 15: 247-77.
- Simon F, Mauciere P, Roques P *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat Med.* 1998; 4, p.1032-1037.
- Simon D, Béria JU, Tiezman DC, *et al.* Prevalência de subtipos do HIV-1 em amostras de pacientes de um centro urbano no sul do Brasil. *Rev Saúde Publ (J Public Health)*; 2010 dez; 44 (6):1094-1101.
- Soares MA, Soares AJM, Santos FA, *et al.* Differential Drug Resistance Acquisition in HIV-1 of Subtypes B and C. *Plosmed, PLoS ONE* www.plosone.org. August 2007; Issue 8: e730
- Soares MA, Brindeiro RM, Tanuri A. Primary HIV-1 drug resistance in Brazil. *AIDS.* 2004 Jun; 18(3) 9-13.

Soares EAJM, Martínez AMB, Souza TM et al (2005). HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS*. October 2005; v.19, issue, pS81-S86.

Soares EAJM, Santos PR, Pellegrini JA, Sprinz E, Tanuri A, Soares MA. Epidemiologic and molecular characterization of Human Immunodeficiency virus type 1 in Southern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34(5):520-526.

Soares MA, Oliveira T, Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Rodrigues R, Pires IL, Morgado MM, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Cassol S, Tanuri A, and the Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance (2003). Identification of a specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 in Brazil: implications of highly active antiretroviral treatment. *AIDS*. 2003 Jan 3; 17(1):11-21.

Soriano V, Maria Miro J, Guerrero A. Primary resistance to antiretroviral agents. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 2001; 19,p.22-25.

Stanford HIV Drug Resistance Database. Disponível em <http://hivdb.stanford.edu>. Acessado até 09/06/2011.

Stefani MMA, Pereira GAS, Martelli CMT *et al*. Evidence of HIV-1 Genetic Diversity Among Pregnant Women With AIDS or Infected With HIV-1 in Central Brazil. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2000 February 1; v. 23, Issue 2, p 205.

Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*. 2003; 9 (7): 853-860.

Sugamura, K, Hinuma, Y. Human Retroviruses: In: Howe M & Berg D. (Eds) *Mobile DNA*. Washington: *American Society For Microbiology*. 1989; 53-108.

Sutherland D, Bennett D (CDC/DHAP), Bertagnolio B, Myatt M. *Draft of Protocol for evaluation of transmitted HIV drug resistance using specimens from HIV sentinel serosurveys in resource-limited settings. *World Health Organization and WHO HIV ResNet* .

Sturmer M, Sthepan C, Gute P *et AL*. Comparison of Drug Resistance Scores for Tipranavir in PI-naïve HIV-1 Infected Patients with B and Non-B Subtypes. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Sep; 66; (9): 2099-2106. Epub 2011 Jun 28.

Sucupira, MCA, Tescarollo G, Janini M, Caseiro MM, Alves K, Sabino EC, Castelo-Filho A, Page-Shafer K, and Diaz RS. High Levels of Primary Antiretroviral Genotypic Resistance and B/F Recombinants in Santos SP, Brazil. *AIDS*. 2007 Jan 2; 21.

Schwartz SA, Nair MP. Current concepts in human immunodeficiency virus infection and AIDS. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 May; 6 (3):295-305.

Tamalet C, Fantini J, Tourres C, Yahi N (2003). Resistance of HIV-1 to multiple antiretroviral drugs in France: a 6-year survey (1997-2002) based on an analysis of over 7000 genotypes. *AIDS*. 2003 November 7; v. 17 - Issue 16 p 2383-88.

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

Tanuri A, Swanson P, Devare S *et al*. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1999b; 20 (1), p.60-66.

Taylor-Castillo L, Herrera-Martínez G, León-Bratti MP, Boza R, León-Rodríguez B, Luftig RB, Visoná K. Study of antiretroviral mutants in HIV patients with treatment failures and the effect of risk factors in the virological failures. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005 Nov-Dec; 47(6):327-31.

Tenofovir. Disponível no site <http://aids.about.com/od/hivaidslettern/g/nrt.htm>.

Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention Strategies. *AIDS*. 1991; v.5,p.1,1991.

- Tirado G, Jove G, Kumar R. et al. Differential virus evolution in blood and genital tract of HIV-infected females: evidence for the involvement of drug and non-drug resistance-associated mutations. *Virol.* 2004; 324: 577–586.
- Turner BG, Summers MF. Structural Biology of HIV. *J Mol Biol.* 1999; 285: 1-32.
- Tramuto F, Bonura F, Perna AM, Mancuso S, Firenze A, Romano N, and Vitale F For The Group For HIV-1 Antiretroviral Studies In Sicily. Genetic Diversity of HIV-1 Non-B Strains in Sicily: Evidence of Intersubtype Recombinants by Sequence Analysis of gag, pol, and env Genes. *AIDS Res Hum Retrovirus.* 2007; 23 (9): 1131-38.
- UNAIDS. Report on the global HIV/Aids epidemic 2007. Disponível em www.unaids.org. Acesso realizado em agosto de 2008.
- UNAIDS, the Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. AIDS Epidemic Update: 2010. Disponível em <http://www.unaids.org>. Acesso realizado em 01/02/2011.
- Vandamme A-M, Sonnerborg A, Ait-Khaled M, *et al* . Updated European recommendations for the clinical use of HIV drug resistance testing. *Antivir Ther.* 2004; 9: 829–848.
- Varella RB, Ferreira SB, Castro MB, Zalis MG, Tavares MD. Human immunodeficiency virus type 1 protease and reverse transcriptase mutation patterns among treatment-naïve patients in different stages of infection in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Virol.* 2007 Aug; 79 (8): 1033-9.
- Vercauteren J, Deforche K, Theys K et al. The incidence of multidrug and full class resistance in HIV-1 infected patients is decreasing over time (2001–2006) in Portugal. *Retrovirology* . 1 february 2008; 5:12.

- Vicente ACO, Otsuki K, Silva NB *et al* . The HIV epidemic in the Amazon basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. J AIDS. 2000; 23, p. 327-331.
- Violin M, Cozzi-Lepri A, Velleca R, Vincenti A, D'Elia S, Chiodo F, Ghinelli F, Bertoli A, d'Arminio Monforte A, Perno CF, Moroni M, Balotta C. Risk of failure in patients with 215 HIV-1 revertants starting their first thymidine analog-containing highly active antiretroviral therapy. AIDS. 2004; 18: 227-235.
- Wang Y, Brunzelle JS, Kovari A *et al* . The higher barrier of darunavir and tipranavir resistance for HIV-1 protease. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Aug 17 [Elsevier Full-text article].
- Wainberg MA, Brenner B, Routy JP, Spira B, Petrella M, Essebag V, Conway B, Sekaly RP. Effect of the M184V mutation in HIV Reverse Transcriptase (RT) on viral fitness in primary infection. In XIV International AIDS Conference, Barcelona - Spain, 2002 - Abstract TuPeB4590.
- Wawer MJ, Gray RH, Sewankambo NK, Serwadda D, Li X *et al* . Rates of HIV transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, Rakai, Uganda. J Infect Dis. 2005; 191:1403-1409.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS, Shaw GM. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature, 1995 Jan 12; 373(6510): 117-22.
- Weiss RA & Wrangham RW. The origin of HIV-1: from Pan pandemic. Nature. 1999; 397, p.385-386.
- Wensing AM, Boucher CA. Worldwide transmission of drug-resistant HIV. AIDS Rev. 2003; 5:140-155.

- Wensing AM, van de Vijver DA, Angarano G, *et al.* Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. *J Infect Dis.* 2005; 192:958-966.
- WHO (World Health Organization), HIV/AIDS Section, AIDS epidemic update, December 2010. Disponível em <<http://www.who.int/publications/en>>
- Wigg MD. Virus da imunodeficiência humana. In: Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à virologia humana. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2002; p.183-197.
- Wildum S, Schindler M, Munch J, *et al.* Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection. *J Virol.* 2006 August; 80 (16):8047-8059.
- Wrin T, Gamarnik A, Huang W, *et al.* Drug resistance is associated with impaired PR and RT function and reduced replication capacity: Characterization of recombinant viruses derived from 200 HIV-1 infected patients [Abstract 2116]. Abstracts of the *40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. September 2000; page 350.
- Yerly S, Kaiser L, Race E, *et al.* Transmission of antiretroviral-drug resistant HIV-1 variants. *Lancet.* 1999; 354: 729–733.
- Yerly S, Rakik A, De Loes SK, *et al.* Switch to unusual amino acids at codon 215 of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene in seroconvertors infected with zidovudine-resistant variants. *J Virol.* 1998; 72: 3520-3523. [PMC free article] [PubMed]



São Paulo, 6 de julho de 2007.
CEP 0863/07

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) CELINA MARIA PEREIRA DE MORAES SOARES

Co-Investigadores: Carlos Roberto Brites Alves; Marcos Montani Caseiro; José David Urbaz Brito; Ricardo da Silva de Souza; Gorki Grinberg; Ricardo Sobhie Diaz (orientador)

Disciplina/Departamento: Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: FAPESP.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Prevalência de resistência primária no Brasil pré-início de tratamento”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo clínico populacional - multicêntrico nacional.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: risco mínimo, desconforto leve com coleta de sangue.

OBJETIVOS: Determinar a prevalência de resistência primária do HIV-1 e sua diversidade genética em indivíduos em fase de pré-início de tratamento no Brasil.

RESUMO: Realizar estudo comparativo do HIV-1 e seus subtipos em pacientes na fase de pré-início de tratamento com um subgrupo de pacientes recém-infectados e determinar a prevalência das características demográficas das populações estudadas. Estudo multicêntrico nacional com perfil de avaliação transversal e embasado em informações oriundas das Clínicas das Macro-regiões do Brasil ou Centros Ambulatoriais de Acompanhamento DST/HIV/AIDS e dos Centros Especiais de Santos (SP) e Itajaí (SC). O mapeamento genotípico e subtipos do HIV-1 em pacientes em fase de pré-tratamento serão realizadas nas principais cidades das cinco regiões demográficas do Brasil. Os dados demográficos da população serão levantados e preenchidos pela equipe dos setores competentes selecionados, em questionário investigativo elaborado e encaminhado para o Laboratório de Retrovirologia da Unifesp, juntamente com a amostra de sangue. As amostras de sangue para o estudo do genótipo e subtipos do HIV serão coletadas em papel-filtro, estocadas à TA em envelopes próprios para transporte acondicionado com a mini bolsa com sílica gel para os procedimentos de seqüenciamento gênico do HIV. Amostras de plasma e papa leucocitária de cada paciente, serão enviadas refrigeradas acondicionadas em gelo reciclável para o Laboratório de Retrovirologia da Unifesp (centro referência) para realizar a identificação dos indivíduos com infecção recente (STARHS). Os resultados do estudo das amostras serão analisados conjuntamente com as variáveis sócio-demográficas da população alvo, através do estudo estatístico utilizando o programa Epi-Info 6.0 e os demais programas disponíveis no Laboratório de Retrovirologia da Unifesp.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: desenvolvimento de forma diagnóstica laboratorial e estudo de análise custo-benefício.

MATERIAL E MÉTODO: descritos os procedimentos que serão realizados por equipe especializada.



TCLE: adequado de acordo com a res 196/96.

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Fapesp.

CRONOGRAMA: 48 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **5/7/2008 e 5/7/2009.**

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

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Projeto de Pesquisa: Prevalência de Resistência Primária no Brasil pré-início de tratamento.

Pesquisadores e suas funções:

Dr. Ricardo Sohbie Diaz – Investigador Principal

Professor Livre Docente da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP),

Tel. (11) 579-8226

Setor: Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 781 16º andar – CEP: 04039-032.

Ms. Celina Maria Pereira de Moraes Soares – Doutoranda responsável pelo Projeto

Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP,

Tel. (11) 5579-8226.

Setor: Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 781 16º andar – CEP: 04039-032.

Dra. Tânia Regina Constant Vergara – Coordenadora Clínica

Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP,

Tel. (11) 5579-8226.

Setor: Laboratório de Retrovirologia da UNIFESP

Rua Pedro de Toledo, 781 16º andar – CEP: 04039-032.

Sub-investigadores:

- Dr. Carlos Roberto Brites Alves- **Bahia**
- Celina Maria Pereira de Moraes Soares- **São Paulo**
- Dr. Flávio Ribeiro- **Manaus**
- Dr. Gorki Grinberg- **Santa Catarina**
- Dr. José David Urbaez Brito- **Brasília**
- Dr. Marcos Montani Caseiro- **Santos**
- Dr. Ricardo da Silva de Souza- **Rio Grande do Sul**
- Dra. Tânia Regina Constant Vergara- **Rio de Janeiro**

Nome do (a) voluntário(a): _____

O(a) Sr(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de uma investigação científica conduzida pelo Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, com o objetivo de avaliar a presença de mutações de resistência no Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) que está infectando seu organismo.

Este documento procura fornecer ao (a) Sr(a) as informações necessárias sobre todos os procedimentos a serem adotados, bem como os exames e os benefícios.

O(a) Sr(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa ou, mesmo dela afastar-se em qualquer tempo, sem que este fato lhe venha causar constrangimento ou penalidade por parte da instituição onde recebe tratamento.

Os pesquisadores em momento algum estarão autorizados a revelar a identidade dos(as) voluntários(as), em qualquer publicação resultante deste estudo, garantindo o total anonimato dos participantes. A qualquer tempo, por razões técnicas e/ou médicas os pesquisadores poderão interromper a sua participação, quando, então, serão dadas as orientações pertinentes.

Antes de assinar este termo, o(a) Sr(a) deve informar-se plenamente, não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

1- Objetivo da investigação: Avaliar a presença de mutações de resistência aos medicamentos do coquetel anti-aids presentes no Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) que infecta seu organismo.

2- Mutações de resistência são alterações que podem ocorrer na estrutura do HIV que, por vezes, fazem com que este vírus não seja mais sensível a um ou mais medicamentos utilizados no tratamento da AIDS. Sabendo disso, se algum dia você for tratado com medicações do coquetel, o médico poderá escolher melhor os medicamentos ao qual o seu vírus seja sensível.

3-Todos os procedimentos que serão realizados serão previamente autorizados por você. Após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, será realizado o preenchimento de uma Ficha Individual de Investigação, quando você responderá a um questionário. Depois desta primeira etapa, serão realizadas coletas de amostra de cerca de 10 ml de sangue (equivalente a uma colher de sopa), por punção de polpa digital (da pontinha do dedo) ou, caso necessário, por punção da veia do seu braço.

4- O material coletado será submetido a teste de resistência, conforme explicado no item 2. As amostras serão armazenadas no Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo (LabRETRO/UNIFESP) e seu acesso será somente permitido aos responsáveis por esta técnica no laboratório. Se não tivermos resultados recentes de CD4 e carga viral, coletaremos sangue para tais exames também.

5- Benefícios: Ao participar de uma pesquisa, o(a) Sr(a), os resultados podem auxiliar estudos para formular melhores formas de tratamento para a doença e mesmo ajudarem na escolha do melhor medicamento para seu tratamento, caso haja resistência no vírus que está te infectando. Os resultados de seus exames, após o término da pesquisa, poderão ser disponibilizados para seu médico assistente, caso este solicite formalmente.

6- Riscos potenciais: Coleta de sangue - os riscos para o participante são mínimos, apenas os decorrentes da retirada de sangue por punção venosa ou de polpa digital, tais como o aparecimento de manchas arroxeadas no braço e/ou leve dor local.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste **Termo de Consentimento Livre Esclarecido**,
decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter
recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a
qualquer tempo. Declaro, pois, dar meu consentimento para participar desta investigação,
recebendo uma cópia do termo, estando ciente ainda de que uma outra cópia permanecerá
arquivada neste laboratório/clinica.

Assinatura: _____

RG: _____

Assinatura do investigador responsável: _____

Data: _____

Pessoa para contato em caso de necessidade: _____ tel:

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de qualquer esclarecimento sobre o estudo você
pode entrar em contato com os pesquisadores relacionados no cabeçalho deste termo. Você
pode mandar também as suas dúvidas e informações para a Dra Tânia Vergara, coordenadora
clínica deste estudo no e-mail taniavergarapesquisa@globbo.com ou ao COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA da UNIFESP/EPM Rua Botucatu, 572 - 1º andar cj 14
Fone: (11) 5571-1062 — Fone / fax: (11) 5539-7162

INVESTIGAÇÃO DOS DADOS INDIVIDUAIS DO PACIENTE

Prevalência de Resistência Primária no Brasil pré-início de tratamento.

1-Nº DO PRONTUÁRIO (001 A 100)	Sigla do tipo: Infecção recente/IR () Pré-tratamento/PT ()	2-Etiqueta
3-Unidade Clínica de atendimento: Código -		4- Mês e Ano do diagnóstico: ____/____
ATENÇÃO: Paciente sabidamente positivo, que já recebeu, ou está recebendo, por qualquer motivo, terapia anti-retroviral está EXCLUÍDO do estudo.		

VARIÁVEIS DEMOGRÁFICAS

5-Data de nascimento: ____/____/____	6-Sexo: () 1-Masculino 2-Feminino	7- Se Feminino: Gestante () 1-Sim 2-Não	8-Raça/Cor: () 1-Branca 2- Preta 3-Amarela 4- Parda 9-Ignorado	
9-Escolaridade (em anos de estudo concluídos): () 1 -Nenhum 2 - De 1 a 3 anos 3 - De 4 a 7 4 - De 8 a 11 5 - De 12 e mais	10-Município de residência : _____		Obs.:	11-UF: _____
12-Tempo de residência no município: () 1 -mais de 4 meses 2 -menos de 4 meses	13-Nome do município onde residia : _____		Obs.:	14-UF: _____
15-Viagem ao exterior nos últimos 4 meses: () 1 - Sim 2 - Não 9- Ignorado	16-Se sim, que país: _____		Obs.:	

TIPO DE EXPOSIÇÃO

17-Risco Relatado: ()* 01 - homossexual 02 - bissexual 04 - heterossexual 08 - uso de drogas 16 - transfusão/hemofílico 32 - acidente de trabalho 99 - não informado
--

TIPO DE EXPOSIÇÃO DO(a) PARCEIRO(a)
--

18-Relato de parceiro/a sexual usuário(a) de drogas injetáveis nos últimos 4 meses: ()

1 – Sim 2 – Não 9- Ignorado

19-Relações sexuais com indivíduo sabidamente HIV+/AIDS nos últimos 4 meses? ()

1 – Sim 2 – Não 9- Ignorado

20-Se sim, o(a) parceiro(a) está usando ou usou medicação anti-retroviral? ()

1 – Sim 2 – Não 9- Ignorado

21- Contagem de CD4: _____ cel/mm3; Data da última análise: ____/____/____

22- Carga viral : _____ cópias/ml; Data da última análise: ____/____/____

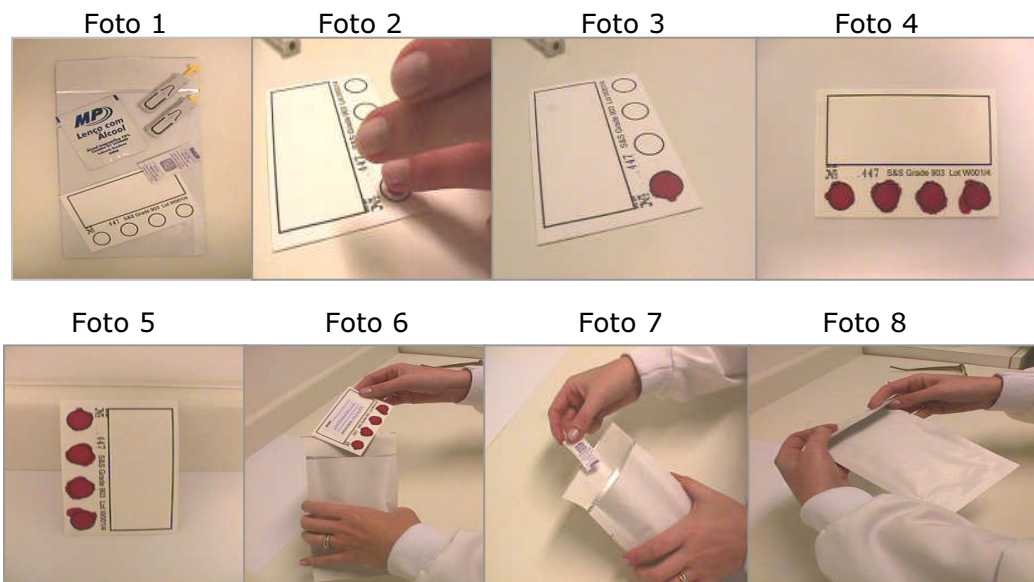
Obs: _____

Data da Coleta: ____/____/____

Responsável: _____

GUIA DE COLETA

A- Imagens do procedimento de coleta de sangue total em papel-filtro



B- Passos para a preparação e coleta do material:

1- Identificar o material com o nome completo do paciente e data da coleta, antes de proceder a punção (observe que o número do paciente e a região estão previamente anexados no kit).

2- Conforme as ilustrações, o material pode ser colhido por punção digital (coleta direta) ou por punção venosa, não interferindo no resultado da amostra. Neste último caso, a aplicação de uma gota de sangue será suficiente, diretamente do bisel da agulha de punção (em seringa), distribuídas uma em cada um dos cinco círculos. (Fotos de 1 a 4). Estamos encaminhando 2 jogos de papel-filtro para maior segurança na qualidade de aplicação da amostra e 2 lancetas.

3- O material deverá permanecer de 4 a 24 h., apoiado em V, até sua completa secagem

(o maior tempo permite que o sangue seque totalmente, disponibilizando uma condição ideal de trabalho no procedimento de análise). Locais com alta umidade ambiental podem determinar maior tempo de secagem.(Foto 5)

4- Decorrido o tempo de secagem ideal, acondicionar em envelope próprio (Foto 6), com uma embalagem de sílica-gel anti-umidade (Foto 7). Fechar a embalagem (envelope) com a remoção do protetor do colante (Foto 8)

5- Enviar em envelope próprio (SEDEX pré-tarifado) juntamente com o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) e a Ficha de Avaliação Individual do Paciente, via correio, endereço previamente anexa.