



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

MARCIO DE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA
TRANSMITIDA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 EM SALVADOR- BAHIA**

**Salvador - BA
2014**

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA
TRANSMITIDA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HIV-1 EM SALVADOR- BAHIA**

MARCIO DE OLIVEIRA SILVA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Joana Paixão Monteiro Cunha

Salvador - BA
2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S586a Silva, Marcio de Oliveira
Avaliação da prevalência de resistência transmitida aos antirretrovirais em indivíduos infectados pelo HIV-1 em Salvador- Bahia [manuscrito] / Marcio de Oliveira Silva. - 2014.
65 f.: il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.
Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

1. HIV-1. 2. Resistência. 3. População. 4. Filogenética. 5. Transmissão.
I.Título.

CDU 616.98(813.8)

"AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HIV - 1 EM SALVADOR - BAHIA."

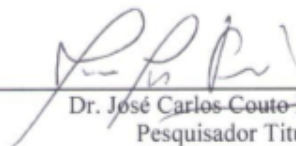
MÁRCIO OLIVEIRA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Túlio de Paiva Nazareth Andrade de Oliveira
Pesquisador
Uni. Kwazulu Natal



Dr. José Carlos Couto Fernandez
Pesquisador Titular
IOC/FIOCRUZ



Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Professor Adjunto IV
UFBA

Dedico este trabalho à Deus e a minha família, Ceceu, Jorge, Lu, Mari, Mila, Rafa e Snow.

Dedico as pessoas que realmente se felicitam com as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus.

Agradeço e peço desculpas as pessoas que amo pelos momentos que me ausentei.

A equipe que brilhantemente me ajudou na realização do projeto.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara, pela oportunidade ofertada e pela orientação única.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou;
Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar;
Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar;
Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar;
Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora;
Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar;
Tempo de amar, e tempo de odiar; tempo de guerra, e tempo de paz.”

Eclesiastes 3:1-8.

SILVA, Marcio Oliveira da. Avaliação da prevalência de resistência transmitida aos antirretrovirais em indivíduos infectados pelo HIV-1 em Salvador- Bahia. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

Avaliar a prevalência de resistência transmitida aos antirretrovirais em indivíduos infectados pelo HIV-1 em acompanhamento clínico e laboratorial na cidade de Salvador-Bahia. Estudo descritivo de corte transversal com amostragem de conveniência composto por 121 pacientes infectados pelo HIV-1, com 18 anos de idade ou mais, virgens de tratamento antirretroviral e que fazem coletas de exame para quantificação das Subpopulações Linfocitárias e da carga viral sérica do HIV-1 no Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Professor Edgard Santos ou no Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP). Os pacientes foram entrevistados para preenchimento de um questionário epidemiológico e consentiram na utilização do excedente de sangue para realização do sequenciamento do gene *pol* do HIV-1 contendo parte da Transcriptase e da Protease para análise das mutações de resistência aos antirretrovirais e a caracterização genotípica, análise de recombinações e estudo da história evolutiva viral. Entre os 103 pacientes 66% são do sexo masculino, a mediana de idade e do tempo estimado do diagnóstico do HIV-1 são respectivamente de 35 anos e 29 meses. A principal categoria de exposição relatada foi a sexual com 88,3%, seguida por 3% com acidentes com perfurocortantes e 1% uso de drogas intravenosas. A mediana da contagem dos Linfócitos TCD4+ foi de 438 cel/mm³ e de 4,4 log₁₀. Na análise de Mutações de Resistência à Fármacos (DRM) através da ferramenta de Calibração da População com Resistência (CPR) observamos uma prevalência global de 6,8%, 3 (2,9%) amostras com DRM aos Inibidores da Transcriptase não-análogos aos nucleos(t)ídeos (ITRNN), 2 (1,9%) aos Inibidores da Transcriptase análogos aos nucleos(t)ídeos (ITRN) e 2 (1,9%) aos IP. Entre as 104 sequências, cinco foram excluídas da análise de filogenética devido a problemas na qualidade. A prevalência dos subtipos seguiram as seguintes distribuições: 71,8% subtipo B, 15,1% F, 9,1% formas recombinantes e 4% C. Entre as amostras classificadas como recombinantes uma não foi possível classificar e todas as demais apresentaram padrões de recombinação do tipo BF sendo 5 semelhantes à CRF28/29_BF, 2 à CRF12_BF e 1 à CRF39_BF. O presente estudo evidencia valores intermediários de DRM na cidade de Salvador segundo a metodologia CPR. Os achados filogenéticos assemelham-se aos previamente descritos na literatura em Salvador.

Palavras-chave: HIV-1. Resistência Transmitida. Calibração da População com Resistência . Filogenética. Stanford.

SILVA, Marcio Oliveira da. Prevalence of transmitted resistance to antiretroviral drugs in patients infected with HIV-1 in Salvador, Bahia. 59 f . Thesis (Master) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

To evaluate the prevalence of transmitted resistance to antiretroviral drugs in patients infected with HIV- 1 assisted in the city of Salvador, Bahia. A descriptive cross-sectional study with 121 patients with 18 years of age or older, chronic or recent diagnosis of HIV -1, antirretrovial naïve and make collections for examination and quantification of lymphocyte subpopulations serum viral load of HIV -1 in the Retrovirus Laboratory, Hospital Universitário Professor Edgard Santos or in Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP). Patients were interviewed to fill an epidemiological questionnaire and consented to the use of drawn blood to be sequenced of the transcriptase and protease region of the pol gene of HIV - 1 for analysis of antiretroviral resistance mutations and subtype viral. Of the 121 patients, 104 sequences for phylogenetic analysis and transmitted resistance were obtained, 18 individuals were excluded due quality or amplification problems. Among 103 patients 66% were male, the median age and the estimated time of diagnosis of HIV -1 were respectively 35 and 29 months. The main category of reported exposure was sexual with 88.3%, followed by 3% with Occupational Exposure and 1% use of Intravenous Drugs. The median CD4 + lymphocyte count was 438 cells/mm³ and 4.4 log₁₀. The analysis of Drug Resistance Mutation (DRM) by Calibrating Population Resistance tool (CPR) has a global prevalence of 6.8%, distributed: 2.9% for Non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NNRTIs), 1.9% Nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitors (NRTIs) and 1.9% to Protease Inhibitors. Among the 104 sequences, five were excluded from the phylogenetic analysis due to quality problems. The prevalence of subtypes followed these distributions: 71.8% subtype B, 15.1% F, 9.1% recombinant forms and 4% C. Among the samples classified as recombinant, one was not possible to classify and all others showed the BF patterns of recombination, 5 CRF28/29_BF likes, 2 CRF12_BF likes and 1 CRF39_BF likes. The prevalence of subtypes was very similar from previously described in Salvador.

Keywords: HIV-1. Transmitted resistance. Calibration of Population Resistance. Phylogenetics. Stanford.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Abacavir
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
CEDAP	Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa
CPR	Calibração da População com Resistência
CRF	Forma Recombinante Circulante
DDI	Didanosina
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DNAc	Ácido Desoxiribonucleico Circular
DRV	Darunavir
DRM	Mutação de Resistência à Fármacos
D4T	Estavudina
EFZ	Efavirenz
ETV	Etravirina
FPV	Fosamprenavir
gp	Glicoproteínas
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homem que faz Sexo com Homem
HR2	Região Terminal Heptavalente 2
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IE	Inibidores da Entrada
IN	Integrase
IIN	Inibidores da Integrase
IP	Inibidores da Protease
ITRN	Inibidores da Transcriptase análogos aos nucleos(t)ídeos
ITRNN	Inibidores da Transcriptase não-análogos aos nucleos(t)ídeos
LPV	Lopinavir
LTR	Área longa de repetição terminal (<i>Long terminal repeat</i>)

ML	Máxima Chance (<i>Maximum Likelihood</i>)
NJ	Agrupamento por vizinhança (<i>Neighbor - Joining</i>)
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PR	Protease
RAL	Raltegravir
RNA	Ácido Ribonucléico
Rpm	Rotações por minuto
RTV	Ritonavir
SDRM	Mutações para vigilância de resistência transmitida
SEMAE	Serviço Municipal de Atendimento Especializado
SIV	Vírus da Imunodeficiência dos Primatas
SQV	Saquinavir
TDF	Tenofovir
tMRCA	Tempo do ancestral comum mais recente
TPV	Tipranavir
TR	Transcriptase Reversa
UDI	Usuários de Drogas Intravenosa
URF	Forma Única Circulante
3TC	Lamivudina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	2
1.1	ESTRUTURA GENÉTICA E CICLO REPLICATIVO DO HIV-1	4
1.2	ORIGEM DO HIV	8
1.3	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV	9
1.4	TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	12
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS	20
3.1	GERAL	20
3.2	ESPECÍFICOS	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	21
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	21
4.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	21
4.3.1	Extração de DNA.....	21
4.3.2	Amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase	22
4.3.3	Eletroforese em gel de agarose 1% e purificação do produto da PCR.....	23
4.3.4	Sequenciamento das regiões amplificadas e análises do Cromatogramas.....	23
4.3.5	Análise Filogenética e de Recombinações	24
4.3.6	Análise de Mutações de Resistência	26
4.3.7	Análise Estatística	26
5	RESULTADOS	28
5.1	ANÁLISE DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA.....	30
5.2	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	33
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) foi primeiramente reportada em 1981, após o relato de 5 pacientes com pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, e teve em 1983 identificado o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) como o seu agente causal. A Aids permanece sendo nesses trinta e três anos como um dos problemas de saúde mais desafiadores mundialmente e com dimensões sem precedentes (BARRE-SINOUSI et al.,1983; GOTTLIEB et al.,1981; HEMELAAR, 2012; UNAIDS, 2012).

Segundo a UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids) em 2011 havia 34 milhões (31,4 – 35,9 milhões) de pessoas vivendo com o HIV-1 (Figura 1). Estima-se que em todo o mundo 0,8% dos adultos entre 15-49 anos sejam portadores desse vírus. A África Subsaariana permanece como a região mundial mais gravemente afetada pela epidemia do HIV com aproximadamente 69% das pessoas vivendo com HIV/Aids e 71% das novas infecções no mundo.

Apesar da contínua tendência mundial em redução do diagnóstico de novos casos, 20% menor do que em 2001, ainda foi estimado em 2011, dois milhões e quinhentos mil pessoas recentemente infectadas (Figura 2). Diferentemente da África Subsaariana que apresenta uma redução de 21% de novos casos desde 2001, nas regiões do Meio Leste e Norte da África, Europa Oriental e Ásia Central houve um aumento de até 35% nos últimos 10 anos (UNAIDS, 2012).

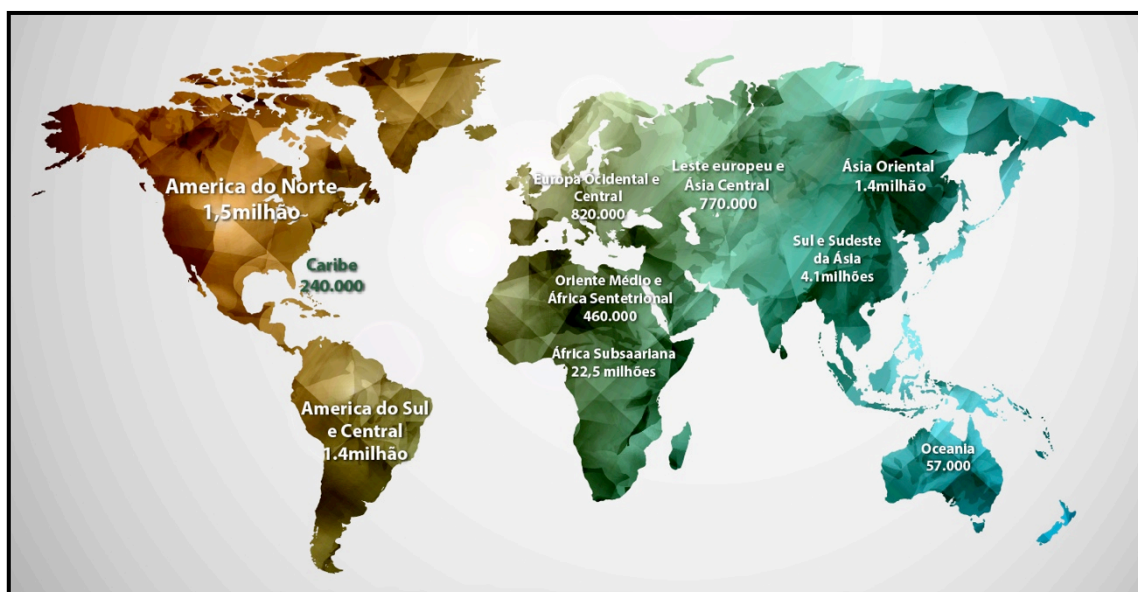


Figura 1 - Estimativa de pessoas infectadas pelo HIV-1 vivendo no mundo em 2011. Adaptado de UNAIDS, 2012.

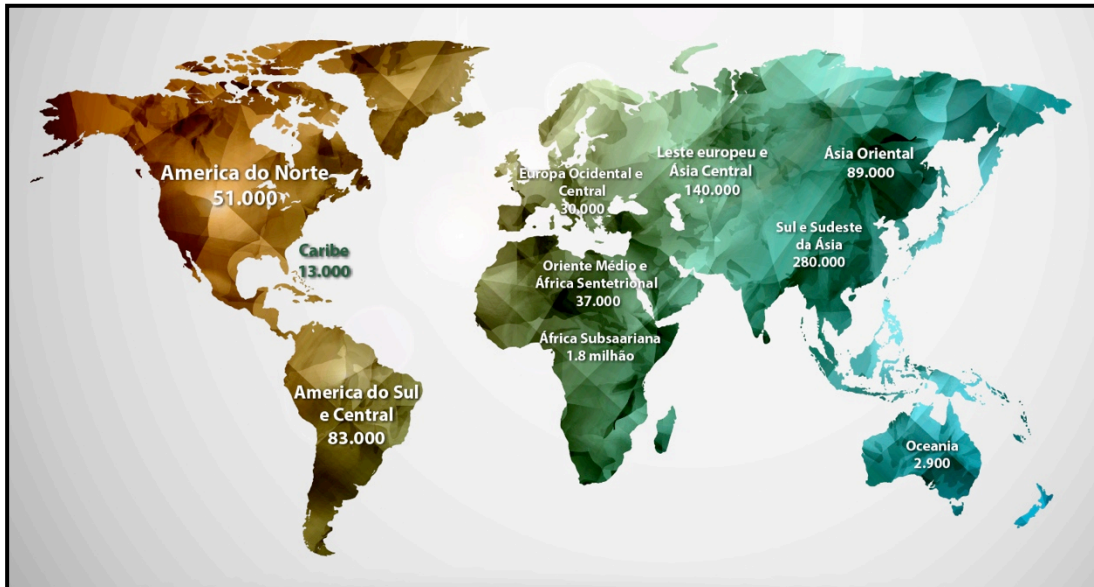


Figura 2 - Incidência de infecções pelo HIV-1 no mundo em 2011.
Adaptado de UNAIDS, 2012.

Após o advento, na década de 90, da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART) que alterou a história da epidemia de Aids, reduzindo em 60-80% na morbidade e em 40-70% na mortalidade associada à infecção pelo HIV, seus benefícios foram potencializados devido ao progressivo incremento, desde 2003, no acesso aos medicamentos pela população vivendo em regiões economicamente subdesenvolvidas e em desenvolvimento. Sabe-se que em 2011, 54% dos pacientes em regiões com baixa ou média renda, que apresentavam indicação de início terapêutico estavam em uso da HAART (LUNDGREN, 2006; MOCROFT et al., 2003; PALELLA et al., 2006; UNAIDS, 2012). Em 2011 ocorreram 1,7 milhões de óbitos no mundo por causas relacionadas à Aids, o que representa uma redução em 24% em relação aos eventos computados em 2005. Essa redução na mortalidade foi mais pronunciada no Caribe, com 48%, seguido pela Oceania com 41% e 32% na África Subsaariana. De forma contrária, ocorreu um aumento de 21% na Europa Oriental e Ásia Central e de 17% no Meio Leste e Norte da África. A epidemia de HIV/Aids na América Latina mantém-se estável com 1,5 milhão de novos casos em 2010. Apesar dos notórios avanços globais em relação à qualidade de vida, longevidade e prevenção da transmissão, as características da epidemia apresentam ampla variação entre países e regiões, que podem ser parcialmente explicadas devido a sua complexa interação com fatores históricos, geográficos, culturais, sociais, religiosos e econômicos (UNAIDS, 2012).

A lei 9.313 de 13 de novembro de 1996 e a Portaria nº 346, de 25 de março de 1993, estabelecem a obrigatoriedade do Estado brasileiro de disponibilizar assistência à saúde multidisciplinar para todos os pacientes com HIV/Aids (Portaria nº 346, de 25 de março de 1993; lei nº 9.313 de 13 de novembro de 1996). Segundo dados da UNAIDS, em 2011 havia 490.000 (430.000 - 570.000) pessoas vivendo com HIV/Aids no Brasil, sendo estimado que das que possuíam indicação terapêutica 71% tiveram acesso a HAART, o que correspondia a aproximadamente 215.700 pessoas. Estimava-se uma taxa de prevalência de 0,30% (0,30 - 0,40%) na população de 15-49 anos e 15.000 (12.000 - 20.000) mortes por causas relacionadas a Aids (UNAIDS, 2012). Segundo o Boletim Epidemiológico, Ano IX- nº 1 de 2012 foram notificados 656.701 casos de Aids entre o período de 1980 a junho de 2011, com uma taxa nacional de incidência de 20,2 por 100.000 habitantes. A epidemia se distribui geograficamente na seguinte ordem de prevalência: Região Sudeste com 367.540 (55%) dos casos notificados, na Região Sul 130.942 (19%), no Nordeste 88.830 (13,5%), no Centro-Oeste 37.244 (5,7%) e no Norte 32.140 (4,9%). Foram notificados 253.706 óbitos por causas relacionadas à Aids com um coeficiente de mortalidade por 100.000 habitantes de 6,3 (BRASIL, 2012).

O estado da Bahia é considerado um dos mais importantes economicamente na Região Nordeste, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2010 apresentava uma população de 14.016.98 habitantes, sendo a capital, Salvador, residida por 2.675.656 pessoas (IBGE, 2010). Analisando em relação à epidemia de Aids nacional, o estado da Bahia apresentou 21.259 casos notificados no período de 1980-2011, com uma incidência de 12,6 por 100.000 habitantes. A cidade de Salvador situa-se na décima segunda posição entre as capitais nacionais e a terceira entre as nordestinas com uma incidência de 28,5 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2012).

1.1 ESTRUTURA GENÉTICA E CICLO REPLICATIVO DO HIV-1

O HIV-1, do gênero *Lentivirus*, possui formato icosaédrico com 100-120 nm de diâmetro, apresentando em sua camada externa um envelope viral constituído de uma bicamada lipídica, derivada da membrana celular do hospedeiro, e por duas glicoproteínas (gp) denominadas 120 e 41 que são oriundas da digestão proteolítica do precursor 160 Env. Sob o envelope encontra-se a matriz viral, composta pela

proteína p17 associada ao Ácido Mirístico, que envolve o capsídeo, estrutura com formato cônico, composto pela proteína p24. Internamente ao capsídeo localiza-se o nucleocapsídeo, composto pelas proteínas p7 e p9 e o genoma viral, caracterizado por ser pseudodiplóide, composto por duas fitas simples e idênticas de ácido ribonucleico (RNA) com 9,2 kilobases e as enzimas virais necessárias para sua replicação: Transcriptase reversa (TR, p66/51), Protease (PR, p11) e a Integrase (IN, p31) (BARRE-SINOUSSE et al., 1996; CHAN et al., 1998) Figura 3).

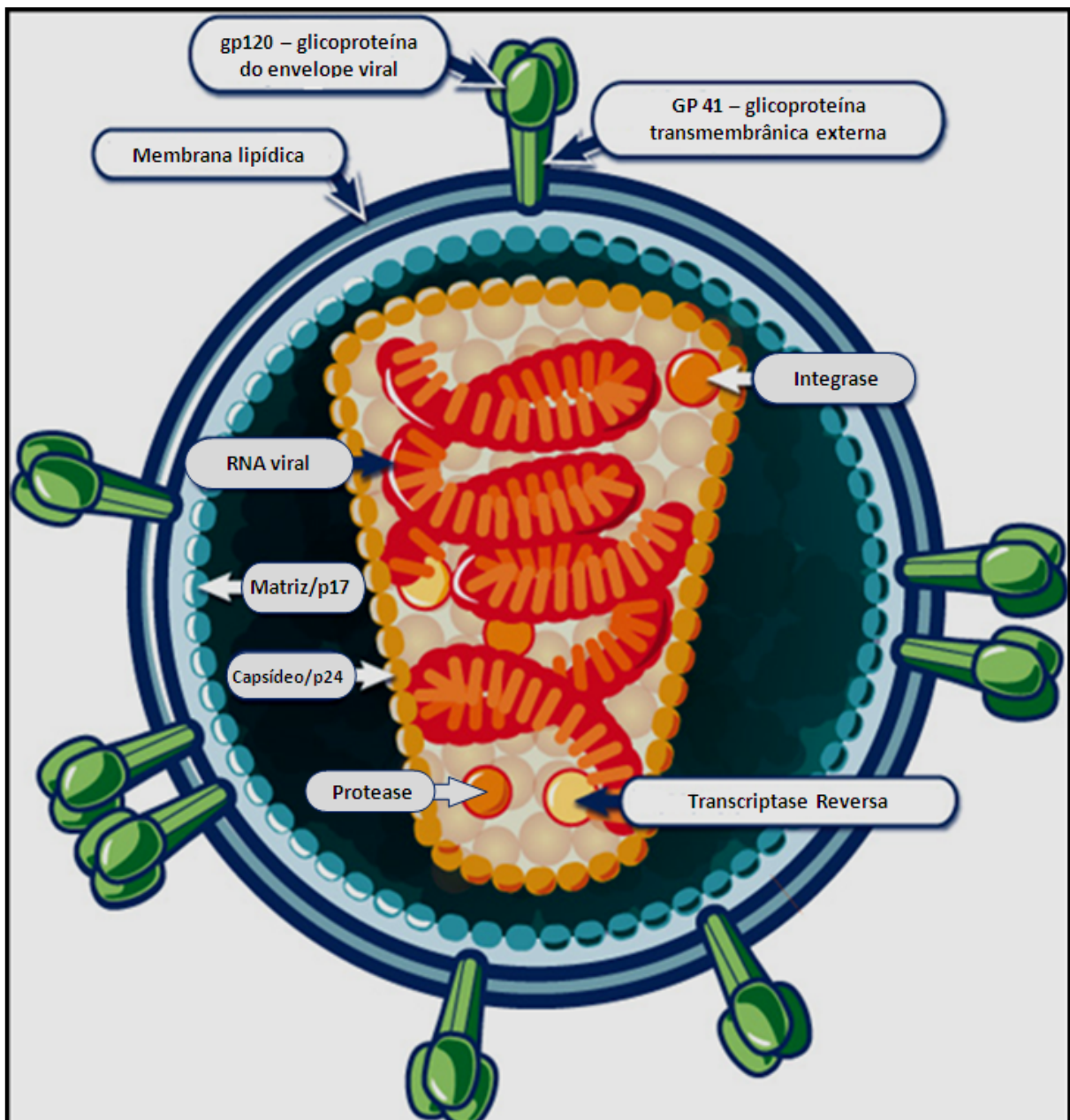


Figura 3 - Esquema representativo da estrutura do HIV- 1. Adaptada de web-books. Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/Pages/hivVirionLargeImage.aspx>
Acesso em 24 mar. 2013

O genoma do HIV-1 possui 10 mil nucleotídeos sendo constituído por nove genes que são flanqueados por regiões LTR (*Long terminal repeat*). Essas regiões possuem a função de integração entre o genoma viral e o humano. O genoma do HIV-1 é dividido em genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), acessórios (*tat* e *rev*) e reguladores (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*). O gene *env* codifica a gp160 que origina as glicoproteínas de superfície e transmembrana gp120 e gp41 que são responsáveis pela fusão entre as membranas viral e do hospedeiro. O gene *gag* codifica a poliproteína p55 que originará as proteínas p17 da matriz, p24 do capsídeo e p7/p9 do nucleocapsídeo. O gene *pol* codifica as enzimas PR, TR e IN que são responsáveis respectivamente por: maturação e tradução das proteínas virais, transcrição reversa do RNA viral em Ácido Desoxirribonucleico circular (DNAc) e integração desse ao DNA do hospedeiro (BARRE-SINOUSSE et al., 1996; LI et al. 1994; VAISHNAV, 1991) (Figura 4).

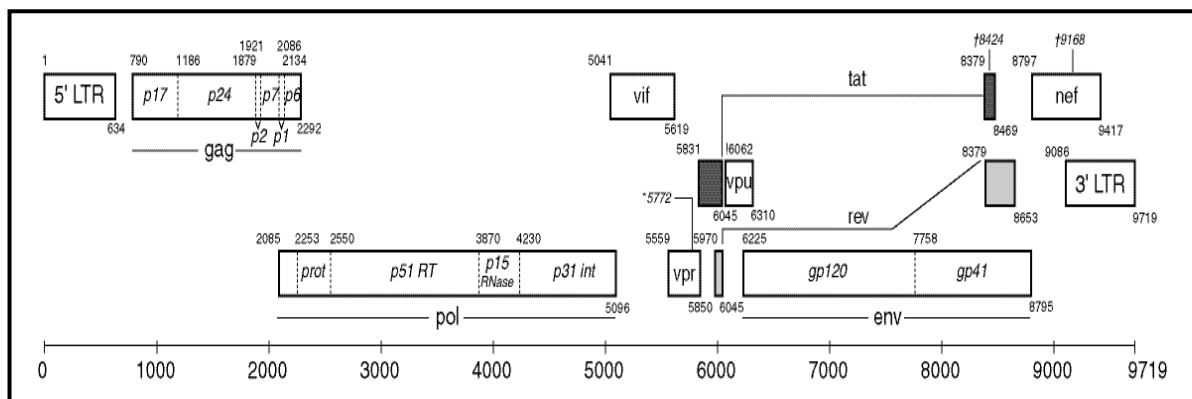


Figura 4 - Organização genômica do HIV-1. Adaptada de web-books. Disponível em: <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>
Acesso em 24 mar. 2013

O ciclo replicativo do HIV-1 inicia-se com a ligação da gp120 com a molécula da membrana celular denominada CD4 encontrada em linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e microglia (HOFFMAN et al., 1999). Essa ligação induz uma alteração conformacional na alça V3 da gp120 possibilitando sua ligação com coreceptores CCR5 ou CXCR4 que possibilita a fusão da gp41 na bicamada lipídica do hospedeiro e conseqüentemente a liberação do RNA e enzimas virais no citoplasma. A TR sintetiza, a partir do RNA viral, uma molécula de DNAc que será transportado até o núcleo celular e integrado ao DNA do hospedeiro através da IN e da proteína *vpr*. O vírus pode permanecer latente e o DNA viral não ser transcrito em RNA mensageiro viral, contudo quando a célula com provírus for ativada ocorrerá à transcrição do DNA viral e a formação de novos vírions pela RNA polimerase da

célula infectada (BARRE-SINOUSI et al., 1996; CONNOR, 1992; DENG et al., 1996; DORANZ et al., 1996). O vírion imaturo é composto pelo RNA viral genômico, poliproteínas e um envelope glicoproteico oriundo da membrana plasmática. Essas poliproteínas, oriundas da tradução do RNA mensageiro viral, serão clivadas pela PR promovendo o processo de maturação que culminará no brotamento de vírions maduros que destruirão a célula hospedeira e estarão prontos para reiniciar o ciclo replicativo (FREED, 2001; TURNER, 1999) (Figura 5).

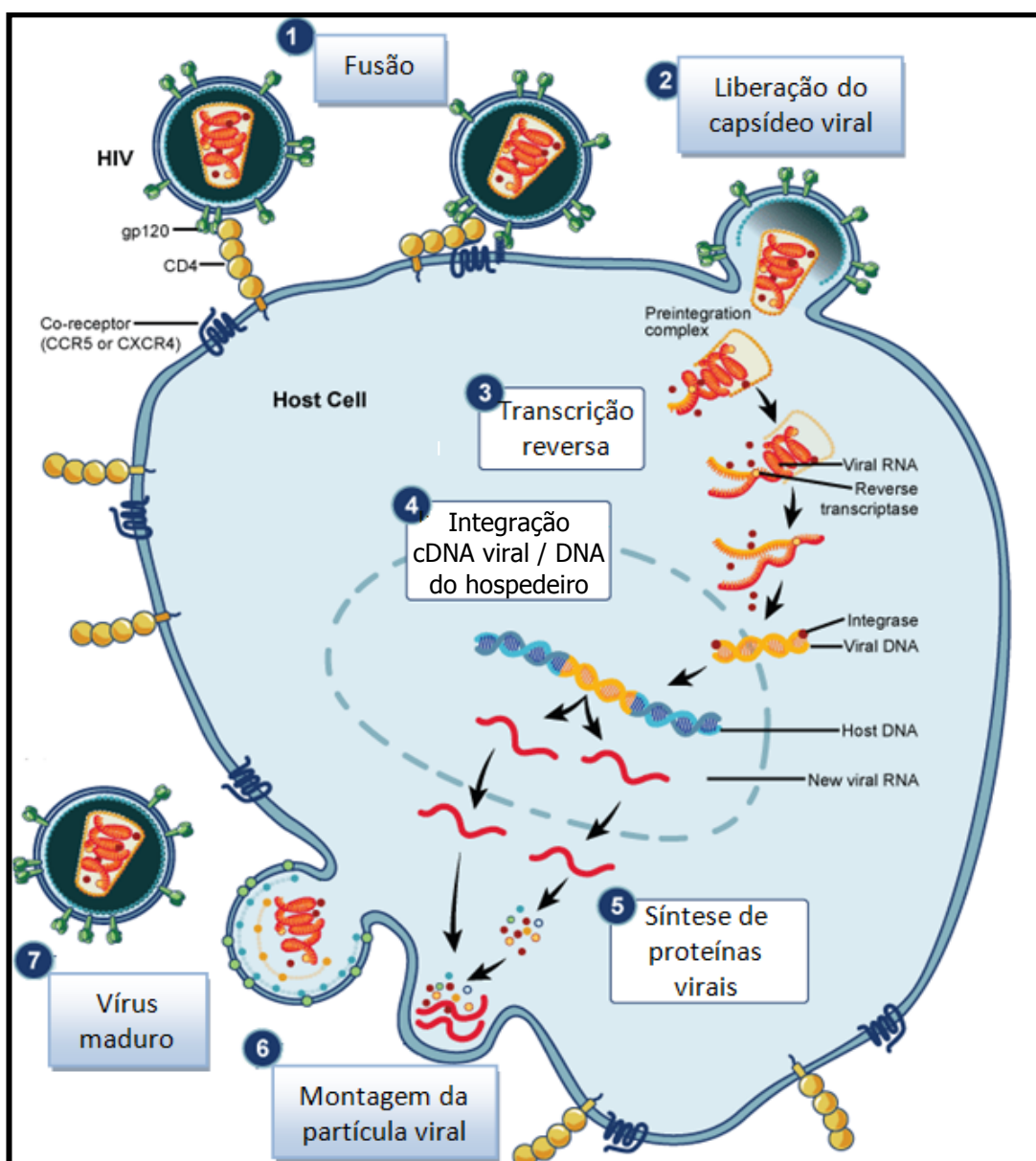


Figura 5 - Ciclo de replicação do HIV-1. Adaptada de web-books. Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Understanding/Biology/pages/hivreplicationcycle.aspx>
Acesso em 24 mar. 2013.

1.2 ORIGEM DO HIV

A origem do HIV ocorreu após múltiplas transmissões do Vírus da Imunodeficiência do Símio (SIV), entre primatas não-humanos para humanos na região Oeste e Central da África, após o contato entre essas espécies no processo de caça, uso de animal selvagem como alimento, captura, comércio ou criação como animal de estimação doméstico. Há conhecimento de mais de 40 espécies diferentes de primatas não humanos que são hospedeiros do SIV e que são específicos para cada espécie. Essa grande variação de SIV e as múltiplas e independentes transmissões entre primatas não-humanos e humanos originaram as diferentes linhagens do HIV do tipo 1 e do tipo 2 (Figura 6) (HEMELAAR, 2012; SHARP, 2011; WOROBEY et al., 2008; TEBIT, 2011; VIDAL et al., 2000).

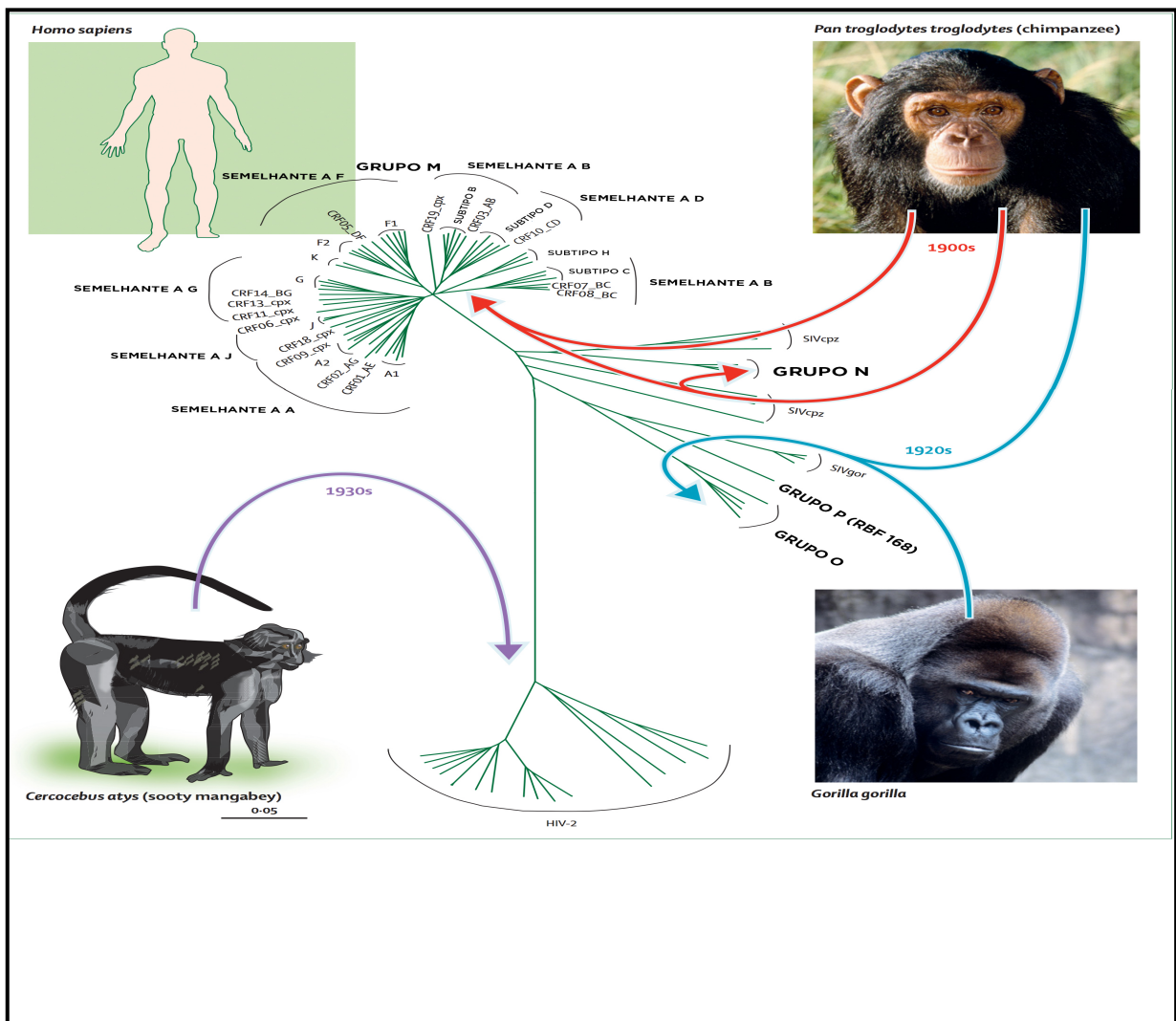


Figura 6 - Transmissão entre espécies do SIV originando os diversos grupos do HIV. Na figura as setas exemplificam a origem do HIV- 1 e 2, que possui como hospedeiro a espécie humana o *Homo sapiens*, tendo como procedência os diferentes tipos de SIV e as respectivas espécies de primatas que os albergam. Adaptado de TEBIT, 2011.

1.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HIV

O HIV é um retrovírus da família *Retroviridae* que caracteriza-se por apresentar imensa variabilidade genética, resultado da taxa de erro da sua transcriptase reversa (3 x 100.000 mutações por nucleotídeo a cada ciclo de replicação) associado a sua grande capacidade replicativa: formação de até 10.300.000.000 partículas virais por dia (MANSKY, 1996, PERELSON et al., 1996, RAMBAUT et al., 2004). Devido a essa grandiosa diversidade foi necessário classificá-lo filogeneticamente, em 1986, em HIV-1 e HIV-2 e subsequentemente em grupos, sendo o HIV-1 mais patogênico e responsável pela imensa maioria dos casos de infecção em todo mundo (CLAVEL et al., 1986; COFFIN et al., 1986, ROBERTSON et al., 2000). O HIV- 2 é encontrado principalmente no Senegal e Guiné-Bissau estando as taxas de infecção em franca redução. O HIV-2 é subdividido nos grupos de A-H sendo os grupos A e B com maior significância epidemiológica. O seu progenitor SIV origina-se do *Cercocebus atys* (*Sooty Mangabeys*) e através de técnicas de bioinformática (Relógio Molecular), estima-se que o tempo do ancestral comum mais recente (tMRCA- estimativa de tempo em anos da sequência mais antiga nas quais as sequências em análise são descendentes diretas) do HIV-2 ocorreu em 1932 (1906-1955) e do grupo B em 1935 (1907-1961) (HEMELAAR, 2012; SHARP, 2011; TEBIT, 2011).

O HIV-1 é subdividido em quatro grupos: o principal denominado M (main - principal), N (Não-M e não-O), O (*Outlier*- atípico) e P. Sabe-se que o grupo M é responsável por aproximadamente 33 milhões de infecções no mundo, desta forma, o mais relevante clínica e epidemiologicamente; o grupo O infecta milhares de pessoas especialmente no Centro-Oeste Africano; o N alguns indivíduos em Camarões e recentemente foi identificado duas pessoas com o grupo P. Sabe-se que há um progenitor comum entre os grupos M e N, o SIV oriundo do chimpanzé (*Pan troglodytes troglodytes*) e entre os grupos O e P, o SIV oriundo do gorila (*Gorilla gorilla gorilla*). O HIV-1 grupo M é subdividido em A-D, F-H e J-K e por 48 formas recombinantes circulantes (CRF), sendo considerado a linhagem viral mais antiga com tMRCA estimado em 1908 (1884-1924) (HEMELAAR, 2012; KORBER, et al., 2000; ROBERTSON et al., 2000; SHARP, 2011; TEBIT, 2011).

A distribuição mundial do grupo M segue padrões distintos, tendo como possível explicação a interação multifatorial entre o efeito de introdução viral,

crescimento populacional, urbanização, fatores culturais e sexuais, migração, meios de transporte e propriedades biológicas do HIV-1 e do hospedeiro (GILBERT et al., 2007; GRAY et al., 2009; WOROBEY et al., 2008). Avaliando a distribuição filogeográfica mundial os subtipos mais prevalentes são: A e D na África Central; B na Europa, Estados Unidos, Austrália e Tailândia; C na África do Sul, Etiópia e Índia; CRF01_AE na Sudeste Asiático e 50% das cepas na China e Japão são formas recombinantes BC, sendo o subtipo C o mais prevalente com 48% dos casos (Figura 7) (BRENNAN et al., 2006, ESSEX et al., 1999, HEMELAAR, 2012; JUNQUEIRA et al., 2011, KANDATHIL et al., 2005, KATO et al., 2003, KUIKEN et al., 2000, SANABINI et al., 2011).

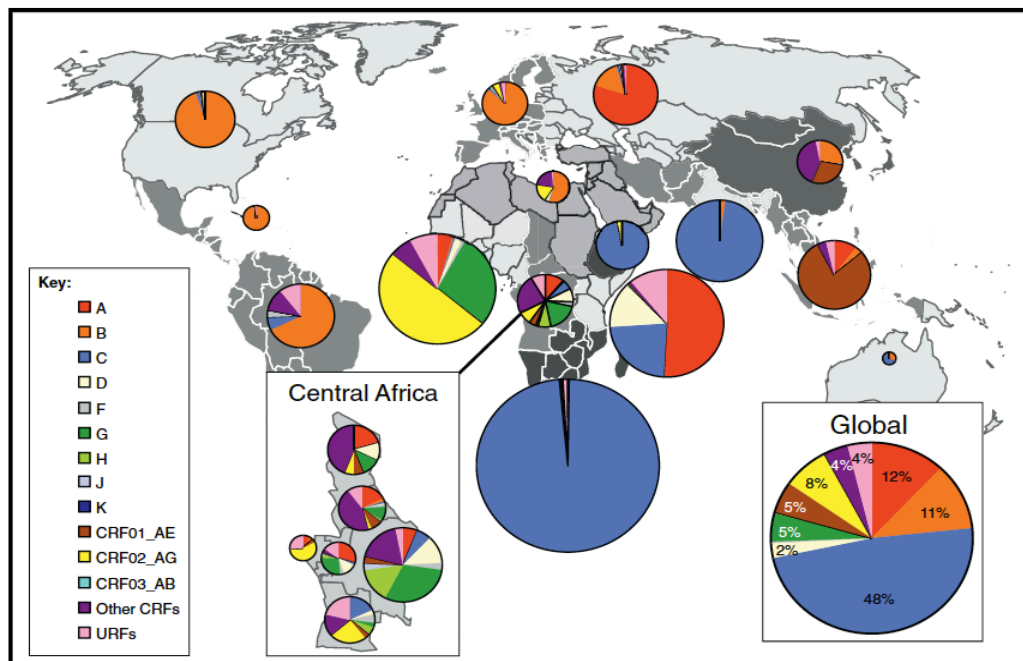


Figura 7 - Epidemiologia molecular do HIV-1. Adaptado de HEMELAAR, 2012.

Nota: CRFs: Formas Recombinantes Circulantes; URFs: Formas Únicas Circulantes.

Avaliando a distribuição geral no Brasil, os subtipos mais prevalentes são: 85% subtipo B, 10 – 15% F, seguidos pelo C, CRF BF e CRF BC. Estima-se que o início da epidemia ocorreu entre 1960 – 1970 para o subtipo B e início dos anos 80 e 90 para F e C respectivamente (MORGADO et al., 2002, BELLO et al., 2007). Devido as dimensões continentais do Brasil e as características peculiares da epidemia em cada região, novos estudos foram realizados: Eyer-Silva e colaboradores em 2007 avaliando amostras do estado do Rio de Janeiro demonstraram prevalência de 83,9% do subtipo B, 8% F1; 5,7% URF BF1 e 2,3% D (EYER-SILVA et al., 2007); Gräf e colaboradores demonstraram que na região Sul o subtipo mais prevalente é o C com 65,8%, mosaico do BC 18,3%, B 13,4% (Figura

8) (GRAF et al., 2011). Na Bahia, desde 2007, os estudos demonstraram predomínio do subtipo B seguidos por formas Recombinantes BF (BRENNAN et al., 2007; MONTEIRO et al. , 2009; SANTOS et al., 2011).



Figura 8 - Epidemiologia molecular no Brasil. Adaptado de MORGADO et al., 2002.

1.4 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Em 1986 com a descoberta da Zidovudina, primeira droga antirretroviral, foi criada grande expectativa na possibilidade de controle da infecção pelo HIV-1. Contudo, rapidamente as evidências demonstraram a ineficácia da monoterapia devido a rápida seleção de cepas resistentes e consequente não alteração da sobrevida. Com a descoberta de novas drogas e do conceito de terapia dupla, foi demonstrado um discreto aumento na sobrevida dos pacientes. Em 1996, com o advento da HAART, uso de no mínimo 03 drogas antiretrovirais, a epidemia HIV/AIDS sofreu a sua mais importante transformação, reduzindo significativamente a morbidade (de 60 a 80%) e mortalidade (de 40 a 70%), aumento na qualidade de vida dos pacientes e assumindo características de doença crônica. Essa mudança ocorre através da supressão viral e consequente manutenção e/ou restabelecimento do sistema imunológico com elevação dos linfócitos T CD4+ (Figura 9) (MARINS et al., 2003, MOCROFT, et al. 2003, PALELLA, et al, 1998; PALELLA et al., 2003; PALELLA et al., 2006; POMERANTZ, 2003; SEPKOWITZ, 2001).

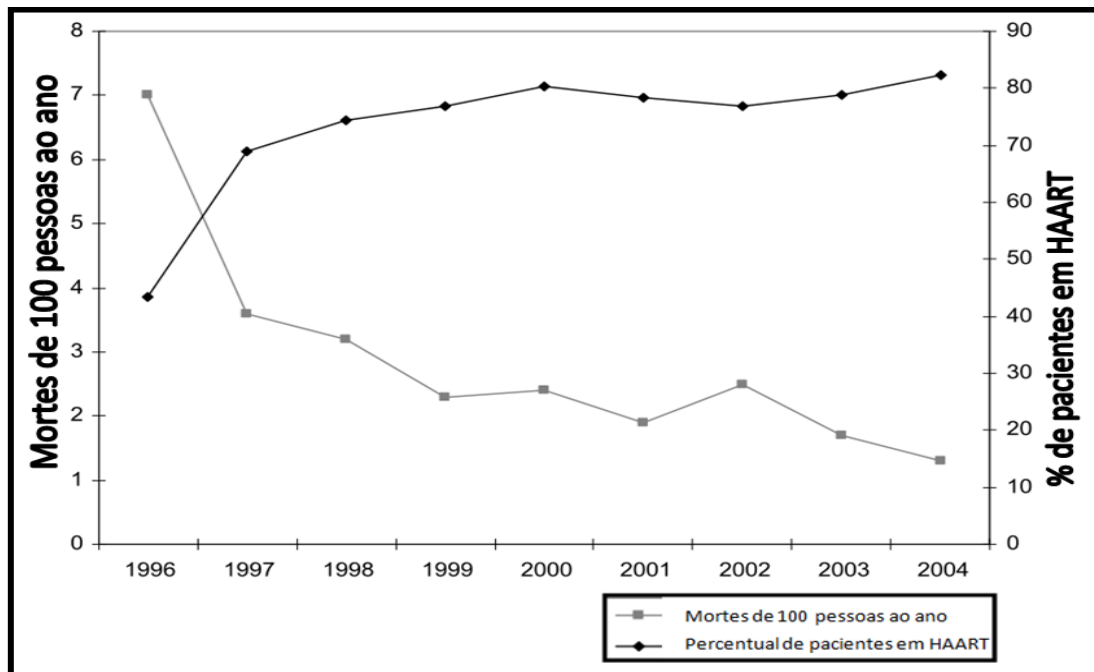


Figura 9 - Mortalidade por Aids entre 1996-2001 após advento da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa HAART). Adaptado de PALELLA et. al, 2003

O atual arsenal medicamentoso é composto por 5 classes de antirretrovirais sendo classificados em: inibidores da transcriptase reversa análogos aos nucleos(t)ídeos (ITRN), inibidores da transcriptase não-análogos aos nucleos(t)ídeos

(ITRNN), inibidores da protease (IP), inibidores da integrase (IIN) e inibidores da entrada (IE) (BRASIL, 2013).

Os ITRN são pró-drogas que se tornam ativas após a trifosforilação intracelular. Seu mecanismo de ação é através da competição com desoxinucleotídeos trifosfato intracelulares agindo como falsos substratos para formação da cadeia de DNA viral, desta forma, uma vez que o ITRN é incorporado a síntese do DNA viral é bloqueada (MEYER et al., 1998). No Brasil, entre os ITRN, é disponível seis antirretrovirais para uso clínico: zidovudina (AZT), lamivudina (3TC), estavudina (D4T), abacavir (ABC), didanosina (DDI) e tenofovir (TDF) (BRASIL, 2013).

O mecanismo de ação dos ITRNN consiste na ligação direta, não competitiva, à enzima transcriptase reversa próximo ao sítio alostérico, originando uma alteração conformacional no sítio ativa dessa enzima, tornando-a menos apta à incorporação de nucleosídeos e uma consequente lentificação na polimerização do DNA. No Brasil, o efavirenz (EFZ), nevirapina (NVP) e etravirina (ETV) são as drogas disponíveis entre os ITRNN (BRASIL, 2013; SHEN et al., 2003).

Os IP representados no programa de HIV/Aids do Brasil pelo saquinavir (SQV), ritonavir (RTV), fosamprenavir (FOS), lopinavir (LPV), atazanavir (ATV), tipranavir (TPV) e darunavir (DRV) agem inibindo a ação da protease viral, através da ligação ao sítio ativo, impedindo assim a clivagem das poliproteínas, o que origina partículas virais imaturas e não infecciosas, sendo todos usados com reforço de Ritonavir (BRASIL, 2013; ERON, 2000).

O raltegravir (RAL), único representante dos IIN no programa nacional, age impossibilitando a ligação do DNA viral ao domínio catalítico da enzima integrase, o que impede a formação do complexo de pré-integração (BRASIL, 2013; HAZUDA, 2013).

Os IE diferem das demais classes, pois, impedem a penetração do HIV-1 na célula alvo, evitando assim a infecção. São representados por duas subclasses que apresentam mecanismos de ação distintos, a enfuvirtida que é um peptídeo sintético que assemelha-se ao domínio C terminal da HR2 da gp 41, desta forma liga-se competitivamente ao HR1 impedindo a sua alteração conformacional e consequentemente a fusão entre o HIV-1 e a membrana celular do hospedeiro. O maraviroque, inibidor de CCR5, agindo dessa forma como única droga que tem como alvo um co-receptor da célula humana (ABEL, et al., 2009; BRASIL, 2013).

A introdução da HAART tem como objetivo o controle da replicação viral e a consequente redução da morbimortalidade e do risco de transmissão. Em 2013, a versão preliminar do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Adultos vivendo com HIV/Aids do Ministério da Saúde do Brasil recomendou a introdução da terapia medicamentosa antirretroviral em todos os indivíduos assintomáticos que apresentassem níveis séricos de Linfócitos TCD4+ menor ou igual a 500 células/ml e manteve as indicações para os que apresentassem sintomas de Aids (Figura 10) e ou doenças não definidoras associados ao HIV (BRASIL, 2013)(Figura 11).

Manifestações de imunodeficiência avançada¹ (doenças definidoras de aids)
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome consumptiva associada ao HIV (perda involuntária de mais de 10% do peso habitual) associada à diarreia crônica (dois ou mais episódios por dia com duração ≥ 1 mês) ou fadiga crônica e febre ≥ 1 mês • Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> • Pneumonia bacteriana recorrente (dois ou mais episódios em um ano) • Herpes simples com úlceras mucocutâneas (duração > 1 mês) ou visceral em qualquer localização • Candidíase esofágica ou de traqueia, brônquios ou pulmões • Tuberculose extrapulmonar • Sarcoma de Kaposi • Doença por Citomegalovírus (retinite ou outros órgãos, exceto fígado, baço ou linfonodos) • Neurotoxoplasmose • Encefalopatia pelo HIV • Criptococose extrapulmonar • Infecção disseminada por micobactérias não <i>M. tuberculosis</i> • Leucoencefalopatia multifocal progressiva • Criptosporidiose intestinal crônica (duração > 1 mês) • Isosporíase intestinal crônica (duração > 1 mês) • Micoses disseminadas (histoplasmose, coccidiomicose) • Septicemia recorrente por <i>Salmonella não thyphi</i> • Linfoma não-Hodgkin de células B ou primário do sistema nervoso central • Carcinoma cervical invasivo • Reativação de doença de Chagas (meningoencefalite e/ou miocardite) • Leishmaniose atípica disseminada • Nefropatia ou cardiomiopatia sintomática associada ao HIV
Manifestações de imunodeficiência moderada²
<ul style="list-style-type: none"> • Perda de peso inexplicada (> 10% do peso) • Diarreia crônica por mais de um mês • Febre persistente inexplicada por mais de um mês (> 37,6°C, intermitente ou constante) • Candidíase oral persistente • Candidíase vulvovaginal persistente, frequente ou não responsiva à terapia • Leucoplasia pilosa oral • Tuberculose pulmonar • Infecções bacterianas graves (por ex.: pneumonia, empiema, meningite, piomiosite, infecções osteoarticulares, bacteremia, doença inflamatória pélvica grave) • Estomatite, gengivite ou periodontite aguda necrosante • Anemia inexplicada (< 8 g/dL), neutropenia (< 500 células/μL) e/ou trombocitopenia crônica (< 50.000 células/μL) • Angiomatose bacilar • Displasia cervical (moderada ou grave)/carcinoma cervical <i>in situ</i> • Herpes zoster (\geq 2 episódios ou \geq 2 dermatomas) • Listeriose • Neuropatia periférica • Púrpura trombocitopênica idiopática

Figura 10 - Manifestações de Imunodeficiência. Adaptado de BRASIL, 2013.

Todas as PVHA, independentemente da contagem de CD4	
Estimular início imediato da TARV, na perspectiva de redução da transmissibilidade do HIV, considerando a motivação da PVHA.	
Sintomáticos (incluindo tuberculose ativa), independentemente da contagem de CD4	
Iniciar TARV	
Assintomáticos	
CD4 ≤ 500 células/mm ³	Iniciar TARV
CD4 > 500 células/mm ³	Iniciar TARV na coinfeção HIV-HBV com indicação de tratamento para hepatite B Considerar TARV nas seguintes situações: <ul style="list-style-type: none"> • neoplasias não definidoras de aids com indicação de quimioterapia ou radioterapia • doença cardiovascular estabelecida ou risco cardiovascular elevado (acima de 20%, segundo escore de Framingham) • coinfeção HIV-HCV • carga viral do HIV acima de 100.000 cópias/mL
Sem contagem de LT-CD4+ disponível	Na impossibilidade de se obter contagem de CD4, não se deve adiar o início do tratamento
Gestantes	
Iniciar TARV	

Figura 11 - Critérios de início de Terapia Antirretroviral em pacientes com HIV/Aids. Adaptado de BRASIL, 2013. LT-CD4+ (Linfócitos TCD4+), PVHA - Pessoas vivendo com HIV/Aids e TARV - Terapia Antirretroviral.

A indetecção da carga viral em pacientes em uso de HAART ocorre em média em 84% dos pacientes (MARKOWITZ et al., 2009). Define-se como falha virológica a detecção da carga viral seis meses após a introdução do esquema ou em qualquer momento do tratamento após prévia indetecção, uma vez excluída outras causas de viremia detectável como flutuações nos níveis da carga viral (*blips*) ou transativação heteróloga (BRASIL, 2013). A falha virológica apresenta etiologia complexa: fatores relacionados ao esquema antirretroviral como potência, complexidade, tolerabilidade, interações farmacológicas, barreira genética, metabolismo e penetração tecidual. Fatores do hospedeiro como adesão inadequada e fatores virais como capacidade replicativa e a presença de mutações que conferem alteração na eficácia dos antirretrovirais (VANDAMME et al., 2011). A falha virológica é o principal parâmetro da falha à terapia antirretroviral, essa tem como manifestação tardia a falha imune e posteriormente a clínica que caracterizam-se respectivamente pela redução dos níveis de Linfócitos TCD4+ e o desenvolvimento de doenças oportunistas, elevando assim o risco de morte. A identificação da falha viral leva a necessidade de uma abordagem multifatorial, com a finalidade de aumento nas possibilidades da troca do esquema não eficaz por outro que possibilite a indetecção viral. É necessário a conscientização do paciente em aderir corretamente à terapia, a identificação de esquemas mais adequados à realidade

socioeconômica, cultural e das comorbidades do usuário; análise de possíveis interações com outros medicamentos e a escolha racional baseado em análises genotípicas do perfil mutacional do HIV-1.

O estudo de genotipagem determina através do sequenciamento genômico das proteínas Transcriptase Reversa, Protease e Integrase do gene *pol* e gp 41 e V3 de *env*, que sofrem pressão seletiva devido ao uso dos antirretrovirais, mutações que é sabido conferirem resistência fenotípica aos medicamentos. A interpretação dessa informação propicia a escolha de esquema composto por medicamentos que mantenham atividade antirretroviral, evitando assim custo, toxicidade e dificuldade posológica pelo uso de drogas desnecessárias e desta forma aumentando as possibilidades de supressão viral (BRASIL, 2013; HAUBRICH, 2001). As diretrizes nacionais recomendam que todos os pacientes em uso de terapia há pelo menos seis meses e que estejam em falha virológica, com carga viral do HIV maior ou igual a 1.000 cópias/ml, sejam submetidos a estudo de genotipagem (BRASIL, 2013).

A resistência viral aos antirretrovirais pode ser classificada como transmitida ou Mutações de Resistência à Fármacos (DRM) e secundária. Define-se como secundária a alteração na sensibilidade aos antirretrovirais selecionadas pela pressão seletiva exercida durante o uso dos mesmos, o que difere da DRM que ocorre em pacientes que nunca foram expostos a nenhum antirretroviral e a sua origem é explicada pela aquisição de cepas já possuem mutações de resistência (HIRSCH, et al., 2008; VANDAMME et al. , 2011). Sabe-se desde a década de 90 sobre relatos de casos de pacientes com DRM, sendo primeiramente descrito à zidovudina e posteriormente a outras drogas, conforme disponibilização das mesmas (CONLON, et al., 1994; CONWAY, et al., 1999; de RONDE, et al., 1996; ERICE, et al., 1993; GARCIA-LERMA, et al., 2001; HECHT, et al., 1998; IMRIE, et al., 1997; JOHNSON, et al., 2001; QUIGG, et al., 1997; RUBIO, et al., 1997). Para ocorrer essa transmissão é necessário que um portador do HIV-1, em uso irregular de HAART e que já selecionara mutações secundárias de resistência, não tenha seguido as medidas preconizadas para prevenção. Kozal e Cols descreveram a não adesão ao sexo protegido em 23% de um grupo de pacientes soropositivos com cepas com mutações de resistência (KOZAL et al., 2006). A prevalência de DRM varia amplamente em relação à localização geográfica, forma de transmissão, tempo e amplitude de cobertura da HAART em uma população, estágio da infecção (aguda, recente ou crônica) e na escolha da lista de mutações de resistência. A Organização

Mundial da Saúde (OMS) categorizou a DRM em três níveis: baixa prevalência se $< 5\%$, intermediária se entre 5 e 15% e elevada se $> 15\%$ (HIRSCH et al., 2008; VANDAMME et al., 2011). Era questionado o impacto da DRM na resposta ao primeiro esquema antirretroviral. Publicações recentes, evidenciaram um risco aumentado em até treze vezes de falha terapêutica e na mortalidade em pacientes com DRM, no qual as mutações conferiam alteração de sensibilidade ao esquema em uso, em comparação ao grupo sem alterações. Desta forma, as diretrizes de condutas da sociedade norte-americana e europeia para tratamento de pacientes com HIV/Aids preconizam a realização de genotipagens anteriormente ao início de HAART em todos os pacientes, diferentemente da diretriz nacional que apenas preconiza em crianças e gestantes apesar das evidências da custo-efetividade em regiões com prevalência superior a 5% (BRASIL, 2013; CAMBIANO et al., 2013; GAGLIANI et al., 2011; GUPTA et al., 2012; HIRSCH et al., 2008; VANDAMME et al., 2011; WITTKOP et al., 2011).

A determinação periódica da prevalência de DRM em diferentes localidades é de extrema importância para o monitoramento da epidemiologia molecular do HIV-1, e, conseqüentemente, no auxílio na definição de políticas de saúde como a definição do esquema preferencial na organização dos fluxogramas terapêuticos e laboratoriais e na vigilância da disseminação da resistência antirretroviral (FRENTZ, et al., 2012; GUPTA et al., 2012). Há uma grande variabilidade metodológica entre os estudos o que torna difícil comparar os valores de prevalência de DRM. Estima-se nos Estados Unidos valores entre 2-35% de DRM. Em 2009 um estudo envolvendo pacientes com infecção aguda e recente, na cidade de São Francisco, demonstrou uma prevalência global de 16%, sendo 11% para os ITRN, 8% para os ITRNN e 6% aos IP (JAIN et al., 2010; LITTLE et al., 1999; VERBIERT et al., 2001). Na Europa, a prevalência média é de 10,6% com 7,4% aos ITRN, 3,4% aos ITRNN e 2,9% aos IP apresentando uma tendência de redução nos últimos 10 anos (FOX et al., 2007; FRENTZ et al., 2012; KARLSSON et al., 2012). No continente africano diferentemente da América do Norte e Europa, a prevalência está em ascensão com uma duplicação entre 2001 a 2003 (2,8% para 5,3%) sendo de 3% entre os ITRN, 2,5% aos ITRNN e 0,9% para os IP. Na América Latina, apesar do acesso universal à terapia, a prevalência de DRM mantém-se em níveis intermediários com 6,3% no total; 2,8% aos ITRN; 2,7% aos ITRNN e de 2,7% aos IP (FRENTZ et al., 2012; MANASE et al., 2012). Na Ásia, estudos publicados em 2008 na Coreia do Sul e

2012 em Pequim, na China, evidenciaram respectivamente: 5,3 e 6% no total; 0 e 4,3% entre os ITRN; 2,6 e 5,3% entre os IP e não foi evidenciada mutações aos ITRNN (BANG et al., 2008; LI et al., 2012). Os dados na literatura para DRM entre os inibidores de integrase ainda são escassos, poucos relatos de casos evidenciaram cepas do HIV-1 com mutações transmitidas. (GUTIERREZ et al., 2013; MANTOVANI et al., 2012; MONLEAU et al., 2012; PASSAES et al., 2009; RANGEL et al., 2010).

O Brasil, com suas dimensões continentais e as grandes diversidades regionais, apresenta taxas de DRM com características bem peculiares. Estudos multicêntricos como os publicados em 2009 por Inocêncio e Sprinz demonstraram respectivamente valores de DRM em 7 e 8,1% no total; 1,3 e 2,3% para os ITRN; 4,3 e 4,4% para os ITRNN e 1,1 e 1,9% para os IP (INOCENCIO et al., 2009; SPRINZ et al., 2009). Análises regionais como na região Sul nos estado de Porto Alegre e Santa Catarina em 2011, evidenciaram respectivamente, 11 e 8,1 % no total; 3 e 5% para os ITRN; 3 e 3,6% para os ITRNN; 2 e 2,4 % para os IP e em Santa Catarina foi encontrada 1,2% de DRM para os Inibidores da integrase (GRAF et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011). Na Região Norte, no estado de Tocantins, 11,5% apresentaram algum tipo de DRM e dessas 3,8; 5,7 e 1,9% para os ITRN; ITRNN e IP respectivamente (CARVALHO et al., 2011). Na região Sudeste, com maior número de pacientes vivendo com HIV/Aids no país, os valores são entre 7,6 a 36% no total e de 4,9 a 6,2% para os ITRN; 1,2 a 7,8% para os ITRNN; de 1,2 a 4,7% para os IP e ainda não foram evidenciadas mutações primárias aos inibidores de integrase (FERREIRA et al., 2013; PFRIMER et al., 2013; SUCUPIRA et al., 2007; TUPINAMBÁS et al., 2013). No Nordeste, em especial no Estado da Bahia, foi encontrado em 2007 por Pedroso e Cols. encontraram altos valores de DRM com prevalência global de 18,9% (ARRUDA et al., 2011; PEDROSO et al., 2007;).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos esplêndidos resultados oriundos da HAART, a seleção de cepas com mutações de resistência e sua disseminação para pacientes ainda sem experimentação terapêutica contribui negativamente na qualidade de vida desses e acarreta em um risco aumentado de até 3 vezes de não obtenção da indetecção viral. As diretrizes norte-americanas e de países europeus sugerem a realização de teste de genotipagem prévio à introdução dos antirretrovirais em regiões com prevalência de DRM superior à 5%. Essa recomendação, apesar de embasada em estudo de custo-efetividade e na impactante redução do risco de falha ao primeiro esquema, não foi incorporada até o momento pelas diretrizes brasileiras (BRASIL, 2013; VANDAMME et al. 2011; WITTKOP et al. 2011).

Em 2009, a Organização Mundial da Saúde preconizou a utilização de uma lista de monitoramento epidemiológico com a finalidade de standardização metodológica entre os estudos de prevalência de DRM. Essa lista baseia-se na definição de mutações que sejam comuns aos mais relevantes subtipos do HIV-1, não sejam polimorfismos ou muito raras e que sejam bem caracterizadas entre os principais algoritmos de resistência do mundo com uma mutação que altera a sensibilidade aos medicamentos (SHAFER et al., 2007; BENNET et al., 2009). Este projeto atualizará os dados sobre a prevalência de DRM na cidade de Salvador utilizando a lista de mutações de monitoramento epidemiológico preconizada pela Organização Mundial da Saúde, uma vez que o último estudo com características semelhantes fora conduzido nos anos de 2007-2008 com tamanho amostral de 34 pacientes (INOCENCIO et al., 2009). Desta forma, possibilitará a atualização das taxas de DRM locais e permitirá a análise comparativa com os dados mais recentes da literatura mundial. Esse resultado poderá auxiliar na tomada de decisões nas políticas de saúde, como recomendação na realização de genotipagem em todos os pacientes que iniciarão terapia e na orientação terapêutica do esquema inicial com maiores probabilidades de sucesso na supressão viral. A caracterização da epidemiologia molecular é de extrema importância. Através da reconstrução filogenética é possível o entendimento dos processos dinâmicos de propagação dessa epidemia e a identificação desses padrões regionais pode permitir o desenvolvimento de medidas de controle específicas para as características moleculares de cada localidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a prevalência de resistência transmitida aos antirretrovirais em indivíduos infectados pelo HIV-1 em acompanhamento clínico e laboratorial na cidade de Salvador- Bahia.

3.2 Específicos

- 1 Caracterizar as mutações de resistência transmitida e analisar o impacto na sensibilidade aos antirretrovirais segundo o algoritmo de Stanford.

- 2 Comparar a diferença entre as taxas de prevalência de resistência transmitida obtidas através da lista de monitoramento epidemiológico preconizada pela Organização Mundial da Saúde em 2009 e o algoritmo de Stanford.

- 3 Caracterizar a epidemiologia molecular do HIV-1 em Salvador através de estudos evolutivos.

4 METODOLOGIA

4.1 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Este é um estudo descritivo de corte transversal com amostragem de conveniência composto por 121 pacientes que consentiram em participar desse projeto através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1) e que possuíam as seguintes características: 18 anos de idade ou mais, diagnóstico recente ou crônico de infecção pelo HIV-1, virgens de tratamento antirretroviral e que fazem coletas de exame para quantificação das Subpopulações Linfocitárias e da carga viral sérica do HIV-1 no Laboratório de Retrovírus do Hospital Universitário Professor Edgard Santos ou no Centro Especializado em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa (CEDAP). Os pacientes foram entrevistados pela equipe do projeto, que foi previamente treinada para preenchimento dos dados epidemiológicos e laboratoriais presentes no questionário (Anexo 2) e consentiram na utilização do excedente de sangue, que seria desprezado após realização dos exames, para a realização de estudos de biologia molecular com intenção de caracterização do subtipo viral e dos perfis mutacionais de resistência aos antirretrovirais.

4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, com parecer final nº 257/2012 vigente de 03/08/2012 à 02/08/2014. A população do estudo foi obtida no período do dia 21/08/2012 à 11/10/2012.

4.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.3.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada seguindo as instruções contidas no kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen Inc.Valencia, CA, EUA). O DNA extraído foi armazenado em freezer à temperatura de -20C°.

4.3.2 Amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase

Através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com duas etapas de amplificação (nested PCR), o DNA foi amplificado para as análises das regiões da Transcriptase Reversa e Protease do gene pol do HIV-1. A *nested* PCR fundamenta-se na realização de duas etapas (*rounds*) sucessivas de PCR, utilizando em cada uma, um par de iniciadores diferentes, sendo que os iniciadores da segunda etapa hibridizam-se à região genômica contida dentro do fragmento amplificado na primeira etapa. O protocolo utilizado para o primeiro e segundo *rounds* foi: 100µl de Buffer Invitrogen 10x (tampão de reação); 70 µl de MgCl₂ 50 mM; 16 µl de dNTP 25 mM; 1,0 µl de cada um dos iniciadores direto e reverso a 200 pmoles/µl; 5,0 µl de Taq Platinum Invitrogen 5 units/ul 5 µl, 100 ng/µl de DNA e 807ul de H₂O bidestilada estéril. As condições de amplificação utilizadas no termociclador (Applied Biosystems) para o primeiro *round* foram: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e 30 segundos seguidos de 1 ciclo de 72°C por 7 minutos. No segundo *round* as condições do termociclador foram: 1 ciclo de 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos seguindo por 1 ciclo de 72°C por 5 minutos. Foram utilizados iniciadores específicos, previamente descritos (KOZAL, et al., 1996), conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Sequência dos Iniciadores de 5' → 3' utilizados para amplificação e sequenciamento do Gene pol do HIV-1."

Indicadores	Sequência 5' → 3'	Etapas	Posição relativa ao genoma do HXB2
POL 1	GGG AGT GGG GGG ACC CGG CCA TAA	primeiro <i>round</i>	1845 → 1865
INBO1-R	CCA CTC AGG AAT CCA GGT GG	primeiro <i>round</i>	3772 → 3788
K1	CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA	segundo <i>round</i>	2150 → 2166
K2	TTT CCC CAC TAA CTT CTG TAT GTC ATT GAC	segundo <i>round</i>	3309 → 3335
DP10:	CAA CTC CCT CTC AGA AGC AGG AGC CG	sequenciamento	2201 → 2223
DP16:	CCT CAA ATC ACT CTT TGG CAA C	sequenciamento	2256 → 2274
F1:	GTT GAC TCA GAT TGG TTG GAC	sequenciamento	2522 → 2539
F2:	GTA TGT CAT TGA CAG TCC AGC	sequenciamento	3301 → 3318

4.3.3 Eletroforese em gel de agarose 1% e purificação do produto da PCR

Para verificar o sucesso da amplificação, os produtos do segundo *round* da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%. Foi aplicada uma mistura de 4 µl de produto de PCR e 1 µl de azul de bromofenol puro (Gibco) ao gel e, paralelamente, 4 µl de uma mistura de padrão de peso molecular (100 bp Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e 1 µl de azul de bromofenol puro (Gibco). Este marcador de peso molecular consiste em uma mistura de fragmentos de 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pb contendo 200, 120, 80, 40, 20, e 10 ng de DNA, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (Horizon 11-14 e 25-25 Gel Electrophoresis Apparatus, Gibco-Life Technologies, USA) durante 1 h a 90 V, 400 mA em tampão TAE 1x. O gel foi analisado sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda para visualização de bandas fluorescentes.

O produto da PCR foi purificado utilizando-se o kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) conforme o protocolo do fabricante: 96 µl do produto amplificado da segunda etapa da *nested*-PCR foram adicionados a 480 µl de tampão com alta concentração de sais caotrópicos que modifica a estrutura da água e permite um pH ótimo para ligação eficiente de produtos de PCR de dupla fita e remove *primers*, sais, enzimas e nucleotídeos não incorporados. As amostras de produto de PCR purificadas foram armazenadas à temperatura de -20°C.

4.3.4 Sequenciamento das regiões amplificadas e análises do Cromatogramas

Os produtos da PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento automatizado utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, USA). Em placas de 96 poços (*Applied Biosystems Inc*, Foster City, CA, USA), foram adicionados: 2 µl de produto da PCR, 3 µl de tampão de sequenciamento 5x (*Applied Biosystems Inc*, Foster City, CA, USA), 4 µl de cada um dos 2 pares de *primers* (2,0 pmol/µl) separadamente (Tabela 1), 1 µl de DyeNamic ET Dye Terminator (GE Healthcare) e 5 µl de água ultra pura (Gibco). Para a reação de sequenciamento foi utilizado um termociclador automático com o seguinte programa de ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por

60 segundos. Os produtos sequenciados foram submetidos à precipitação com isopropanol e etanol para purificação do DNA, como se segue: 60 µl de isopropanol 65% (Merck) foram adicionados cada poço da placa contendo as amostras sequenciadas, seguidos de homogeneização em vórtex por 30 segundos e incubação por 20 min à temperatura ambiente protegida da luz. Seguiu-se uma centrifugação de 45 min a 2000 gravidades. Os sobrenadantes foram descartados por inversão das placas em papel absorvente por 2 min. Foram adicionados 250 µl de etanol 60% (Merck), seguidos por centrifugação por 10 min a 2000 g. Novamente, os sobrenadantes foram descartados e 100 µl de etanol 60% (Merck) foram adicionados, seguidos por centrifugação por 10 minutos a 2000 g. Os sobrenadantes foram descartados e a placa, invertida, foi centrifugada por 1 min a 500 rotações por minuto para sua completa secagem. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) para desnaturação da fita dupla de DNA, seguida por um período de incubação de 2 min a 95°C e choque térmico em gelo por 2 min. A leitura dos eletroferogramas foi realizada em sequenciador automático (ABI PRISM® 3100 ou 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

Após a obtenção dos cromatogramas, no intuito de obter a máxima qualidade das sequências consensos, essas foram editadas manualmente, através do *software* Geneious 6.1.6 (KEARSE et al., 2012), para verificar e corrigir possíveis erros na geração das sequências e, desta forma, definir as bases mais prováveis. As regiões analisadas foram da Transcriptase Reversa e Protease que se localizam nas regiões nucleotídicas 2316-3316 relativas a cepa HXB2. Todas as sequências geradas por edição manual foram submetidas a análises de controle de qualidade, para garantir ausência de possíveis contaminações entre as amostras (LEARN, et al., 1996), através do programa de bioinformática *HIV Quality Analysis Pipeline Tool* (<http://bioafrica.mrc.ac.za/tools/pppweb.html>), que analisa as sequências quanto à possibilidade de existência de contaminações, comparando-as com o banco de dados público do GenBank que armazena aproximadamente 500.000 sequências do HIV-1 publicadas. Os experimentos de Bioinformática envolvendo a edição das sequências e análises filogenéticas foram realizados pelo doutorando Filipe Ferreira de Almeida Rego.

4.3.5 Análise Filogenética e de Recombinações

As sequências consenso e de referência para todos os subtipos do Grupo M do HIV-1 oriundas do GenBank (Anexo C) foram alinhadas utilizando o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997). Esse alinhamento foi editado manualmente utilizando o programa Se-AL (Disponível em <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>). O alinhamento foi então submetido ao jModelTest (Darriba et al, 2012) para a escolha do melhor modelo evolutivo.

A determinação do subtipo foi realizada através das análises filogenéticas utilizando o PAUP* versão 4.0b10 (SWOFFORD, 1998). A reconstrução das árvores filogenéticas foi realizada utilizando-se os métodos de “*neighbor-joining*” (NJ) e de “*Maximum Likelihood*” (ML) através do programa PAUP* versão 4.0b10. A confiabilidade da árvore foi feita por análise de *bootstrap* com 1000 pseudorréplicas. Os valores de *bootstrap* acima de 70% foram considerados significativos. Para a árvore de ML, foi realizada uma busca heurística com o algoritmo “*subtree-pruning-regrafting branch swapping*” utilizando a árvore de NJ para iniciar a busca, incluindo seus parâmetros de otimização. O teste de razão de verossimilhança foi utilizado para calcular o suporte estatístico, expresso nos valores de p para os ramos. As árvores foram visualizadas no programa *FigTree* versão 1.3.1 (Disponível no site <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>).

A identificação de sequências recombinantes foi realizada pelo método de *Bootscreening* através do programa SIMPLOT 3.5.1 (SALEMI et al., 1995) e por análise filogenética utilizando o PAUP. Para a primeira análise, foi utilizado o método NJ com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros, uma janela de 350 pares de base e um passo de 20 pares de bases (KIMURA, 1980). Foram realizadas 100 réplicas para avaliar o suporte dos agrupamentos filogenéticos em cada fragmento. Para a análise filogenética utilizando o PAUP, sequências das CRF relacionadas aos subtipos parentais (B e F) e previamente reportadas na população brasileira foram obtidas através do banco de dados de *Los Alamos* e alinhadas com as sequências suspeitas de serem recombinantes utilizando o programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997). O alinhamento das sequências foi então editado manualmente utilizando o programa Se-AL e submetido ao jModelTest para a escolha do modelo evolutivo adequado para a análise filogenética (DARRIBA, et al., 2012). A reconstrução filogenética utilizou a mesma metodologia, acima citada, para

a análise de genotipagem. Os experimentos envolvendo análises de recombinação foram realizados pela pesquisadora Joana Paixão Monteiro Cunha.

4.3.6 Análise de Mutações de Resistência

A análise da prevalência mutações para vigilância de resistência transmitida (SDRM) foi realizada utilizando a lista de monitoramento epidemiológico, preconizada pela Organização Mundial da Saúde e atualizada em 2009, que apresenta como premissa quatro critérios: a mutação está presente em pelo menos três das cinco mais importantes listas de definição de mutações de resistência; não ser polimorfismo; observada nos genotipos mais comuns do HIV-1(A, B, C, D, F, G, H, J, K, CRF01_AE e CRF02_AG) e não ser mutação muito rara (SHAFER et al., 2007; BENNETT et al., 2009). Os valores encontrados foram então comparados às prevalências encontradas nos algoritmos de Stanford. Para essa análise, foi utilizada a ferramenta de bioinformática denominada Calibração da População com Resistência versão 6 (CPR) situada no Stanford HIV *Drug Resistance Database* (<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>).

A presença de mutações relacionadas à resistência aos antirretrovirais foi avaliada através da ferramenta de bioinformática do programa da Universidade de Stanford versão 6.3.1 (*Stanford HIV Drug Resistance Database* - <http://hivdb.stanford.edu>) que define as mutações a partir de diferenças em relação à sequência consenso do subtipo B do HIV-1. Por análise de similaridade genética, as mutações virais encontradas nas sequências obtidas foram interpretadas e forneceram informação do perfil de resistência às drogas, classificando-as, conforme o impacto individual ou da associação dessas mutações, em suscetível, potencial resistência de baixo nível, baixo nível de resistência, intermediário e alto nível de resistência.

4.3.7 Análise Estatística

O banco de dados contendo todas as informações de cada paciente deste estudo foi analisado no programa “*Statistical Package for the Social Sciences*” (SPSS) para Windows versão 13.0 (Chicago, IL, USA), para realização dos cálculos

de frequência, mediana para as principais variáveis obtidas e Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

5 RESULTADOS

Cento de vinte e um pacientes consentiram participar do estudo. Foram obtidas 104 e 103 sequências, da região da Transcriptase e Protease do gene *pol*, para as análises de filogenética e resistência transmitida respectivamente. Sendo assim, 17 indivíduos (14%) foram excluídos do estudo devido a impossibilidade de amplificação do material genômico e uma amostra apresentou quantidade inferior de nucleotídeos exigida para análise de resistência utilizando a lista de monitoramento epidemiológico da Organização Mundial da Saúde (BENNETT et al., 2009).

As características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos pacientes que foram incluídos em ambas análises do estudo encontram-se na Tabela 1. Entre os 103 pacientes, 66 (64%) eram do sexo masculino. A idade dos indivíduos variou de 20 a 63 (mediana igual a 35 anos) e o tempo estimado do diagnóstico positivo para HIV-1 variou entre 14 e 168 meses (mediana de 29).

A principal categoria de exposição, relatada por 91 (88,3%) indivíduos foi a sexual, seguida por acidentes com perfurocortantes, responsável por 03 (3%) infecções e uso de Drogas Intravenosas, relatado como modo de transmissão por 01 (1%) pessoa. Oito pacientes reportaram que a infecção ocorreu por outras causas além das citadas sem informar, contudo, tal informação. A mediana de contagem dos Linfócitos TCD4+ foi de 438 cel/mm³ e de 4,4 log₁₀ para a contagem de carga viral.

Tabela 2 - Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos indivíduos incluídos neste estudo.

Características	n=103
Idade (anos)	
Mínima	20
Mediana	35
Média	36,8
Máxima	63
Sexo (%)	
Masculino	66 (64%)
Feminino	37 (36%)
Tempo estimado do diagnóstico da infecção pelo HIV-1 (meses)	
Mínima	14
Mediana	29
Média	46
Máxima	168
Categoria de exposição	
Heterossexual	43 (41,7%)
HSH	47 (45,6%)
UDI	01(1%)
Acidente com perfuro cortante	03(2,9%)
Outros	08(7,8%)
Bissexual	01(1%)
Contagem de linfócitos TCD4 (cel/mm³)	
Mínima	09
Mediana	438
Média	455
Máxima	1084
Contagem de carga viral (log₁₀)	
Mínima	2,0
Mediana	4,4
Média	4,38
Máxima	7
Local de atendimento clínico (%)	
CEDAP	61(59,2%)
SEMAE	8(7,8%)
HUPES	29(28,2%)
Outros	5(4,8%)

HSH: Homem que faz sexo com homem

UDI: Usuário de drogas intravenosas

CEDAP: Centro Estadual em Diagnóstico, Assistência e Pesquisa

SEMAE: Serviço Municipal de Assistência Especializada

HUPES: Hospital Universitário Professor Edgard Santos

5.1 ANÁLISE DE RESISTÊNCIA TRANSMITIDA

Entre as 103 amostras, foram evidenciadas, através da ferramenta CPR, sete que apresentavam mutações de SDRM. Isso corresponde a 6,8% (2,9 - 11,7% Intervalo de Confiança de 95%) da população em estudo sendo distribuído entre as classes de drogas da seguinte forma: 3 (2,9%) amostras com SDRM aos ITRNN, 2 (1,9%) aos ITRN e 2 (1,9%) aos IP. Apenas uma amostra apresentou duas mutações diferentes, sendo ambas aos IP. Dentre estas cepas virais, quatro foram classificadas como subtipo B (57,1%) e uma (14,3%) de cada genotipo: C, CRF28/29_BF e CRF 39_BF. Para estes pacientes apresentando mutações de SDRM, a mediana de idade, tempo estimado do diagnóstico, linfócitos TCD4+ e carga viral são respectivamente: 39 anos, 48 meses, 552 cel/mm³ e 4,55 log₁₀. Entre as duas amostras com SDRM aos ITRN, a mutação encontrada foi a T215D, que confere baixo nível de resistência à Zidovudina e Estavudina e potencial resistência de baixo nível ao Abacavir, Didanosina e Tenofovir. Entre os três indivíduos com mutações aos ITRNN as mutações encontradas foram: G190E, que atribui alto nível de resistência ao Efavirenz e à Nevirapina e resistência intermediária à Etravirina; G190A que confere alto nível de resistência à Nevirapina, resistência intermediária ao Efavirenz e potencial resistência de baixo nível à Etravirina e a K103N, que confere alto nível de resistência ao Efavirenz e à Nevirapina e mantém a Etravirina suscetível. Em relação aos IP, um paciente apresentou a mutação I84V, que confere potencial resistência de baixo nível ao Darunavir/Ritonavir, baixo nível de resistência ao Lopinavir/Ritonavir; resistência intermediária ao Atazanavir/Ritonavir e ao Tipranavir/Ritonavir e alto nível de resistência ao Saquinavir/Ritonavir e Fosamprenavir/Ritonavir. O outro paciente com SDRM aos IP apresentou duas mutações (M46I e V82T) que juntas atribuem baixo nível de resistência aos saquinavir/ritonavir e fosamprenavir/ritonavir; resistência intermediária ao atazanavir/ritonavir, lopinavir/ritonavir e ao tipranavir/ritonavir e suscetível apenas ao darunavir/ritonavir (Tabela 4).

Tabela 3 - Características dos pacientes com mutações para vigilância de resistência transmitida em *pol* (PR e TR) segundo metodologia mutações para vigilância de resistência transmitida (SDRM) e nível de resistência aos Antirretrovirais.

Amostra	Subtipo	DRM ITRN	DRM ITRNN	DRM IP	Perfil de Resistencia			
					Potencial	Baixo	Intermediário	Alto
BA43PIT	B	T215D			ABC	AZT		
					DDI	D4T		
					TDF			
BA69PNB	CRF28/29_BF	T215D			ABC	AZT		
					DDI	D4T		
					TDF			
BA19PRP	B		G190E			ETV	NVP EFZ	
BA111ITP	CRF39_BF		G190A			ETV	EFZ NVP	
BA25CSA	B		K103N				NVP EFZ	
BA51TRB	C			I84V	DRV/RTV	LPV/RTV	ATV/RTV TPV/RTV	SQV/RTV FPV/RTV
BA91CN	B			M46I		SQV/RTV	ATV/RTV	
				V82T		FPV/RTV	TPV/RTV LPV/RTV	

- ABC: Abacavir
- ATV: Atazanavir
- AZT: Zidovudina
- D4T: Estavudina
- DDI: Didanosina
- DRV: Darunavir
- EFZ: Efavirenz
- ETV: Etravirina
- FPV: Fosamprenavir

- IP: Inibidores da Protease
- ITRN: Inibidores da Transcriptase análogos aos nucleos(t)ídeos
- ITRNN: Inibidores da Transcriptase não-análogos aos nucleos(t)ídeos

- LPV: Lopinavir
- NVP: Nevirapina
- RTV: Ritonavir
- SQV: Saquinavir
- TDF: Tenofovir
- TPV: Tipranavir
- DRM: Mutação de Resistência à Fármacos

Na análise de prevalência de DRM utilizando o algoritmo de Stanford, foram analisadas 104 amostras, com 43 (41,3%) dessas possuindo pelo menos uma mutação associada à resistência antirretroviral. Destas, três (2,9%) apresentaram simultaneamente mutações aos ITRN e ITRNN; uma (1%) aos ITRN e IP e uma (1%) aos ITRNN e IP. Ao total, foram encontradas 25 (24%) amostras com mutações associadas aos IP, 18 (16,3%) aos ITRNN e 6 (5,8%) aos ITRN. O perfil mutacional mais prevalente dentro de cada classe de antirretrovirais foi: duas (33,3%) amostras com M184I e T215D associadas aos ITRN, sete (41,1%) e três (17,6%) amostras com E138A e V90I, respectivamente, associadas aos ITRNN e oito (32%) e seis (24%) amostras com L10V e A71T, respectivamente, associadas aos IP. Analisando apenas as mutações que conferem alguma alteração na sensibilidade aos antirretrovirais, foram evidenciadas a K65N, M184I e T215D associadas aos ITRN; K101H, K103N, V179D, G190A, G190E e M230L associadas aos ITRNN e L10F, M46I, Q58E, V82T e I84V associadas aos IP (Tabela 4).

Estratificando a prevalência de DRM, utilizando o algoritmo de Stanford, para o impacto causados pelas mutações aos antirretrovirais, foram encontradas as seguintes taxas: 13,5% para potencial resistência de baixo nível (4,8% NRTI; 6,7% NNRTI e 5,7% IP); 7,7% para baixo nível de resistência (4,8% NRTI; 2,8% NNRTI e 1,9% IP); 6,7% para intermediário (1,0% NRTI; 3,8% NNRTI e 1,9% IP) e 4,8% para alto nível de resistência (1,9% NRTI e NNRTI e 1,0% IP).

Tabela 4 - Características dos pacientes com mutações para vigilância de resistência transmitida em *pol* (PR e TR) segundo algoritmo de Stanford com alteração no nível de resistência aos Antirretrovirais.

Amostra	Subtipo	DRM ITRN	DRM ITRNN	DRM IP	Perfil de Resistencia			
					Potencial	Baixo	Intermediário	Alto
BA09ITP	B	M184I	M230I		DDI	ABC EFZ ETV	NVP	3TC
BA19PRP	B		G190E				ETV	NVP EFZ
BA25CSA	B		K103N	A71V				NVP EFZ
BA28JRG	B			L10F	FPV/RTV			
BA31BDM	B		G190R M230I			EFZ ETV	NVP	
BA43PIT	B	T215D		A71T	ABC DDI TDF	AZT D4T		
BA50PAL	B	M184I	M230I		DDI	ABC EFZ ETV	NVP	3TC
BA51TRB	C			I84V	DRV/RTV	LPV/RTV	ATV/RTV	FPV/RTV SQV/RTV
BA69PNB	CRF28/29_BF	T215D			ABC DDI TDF	AZT D4T		
BA77POR	B		V179D		NVP EFZ			
BA91CN	B			M46I V82T A71T		SQV/RTV	ATV/RTV FPV/RTV LPV/RTV TPV/RTV	
BA109LDF	B		V179D		NVP EFZ			
BA115ITP	B	K65N				3TC ABC	TDF D4T DDI	
BA119MDD	B			L10V Q58E	TPV/RTV			

- ABC: Abacavir
- ATV: Atazanavir
- AZT: Zidovudina
- D4T: Estavudina
- DDI: Didanosina
- DRV: Darunavir
- EFZ: Efavirenz
- ETV: Etravirina
- FPV: Fosamprenavir
- IP: Inibidores da Protease
- ITRN: Inibidores da Transcriptase análogos aos nucleos(t)ídeos
- ITRNN: Inibidores da Transcriptase não-análogos aos nucleos(t)ídeos
- LPV: Lopinavir
- NVP: Nevirapina
- RTV: Ritonavir
- SQV: Saquinavir
- TDF: Tenofovir
- TPV: Tipranavir
- DRM: Mutação de Resistência à Fármacos
- 3TC: Lamivudina

5.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Entre as 104 sequências da região da Transcriptase e Protease do gene *pol*, cinco foram excluídas das análises de filogenética devido a problemas na qualidade

dessas, totalizando assim, 99 amostras classificadas. A prevalência dos subtipos seguiram as seguintes distribuições: 72 (72,8%) subtipo B, 15 (15,1%) subtipo F, 4 (4%) subtipo C e 8 (8,1%) formas recombinantes (Figura 12). As oito amostras classificadas como recombinantes e confirmadas através do programa SIMPLOT apresentaram padrões de recombinação entre os subtipos B e F sendo cinco semelhantes à CRF28/29_BF, duas à CRF12_BF e uma à CRF39_BF (Figura 13 e 14).

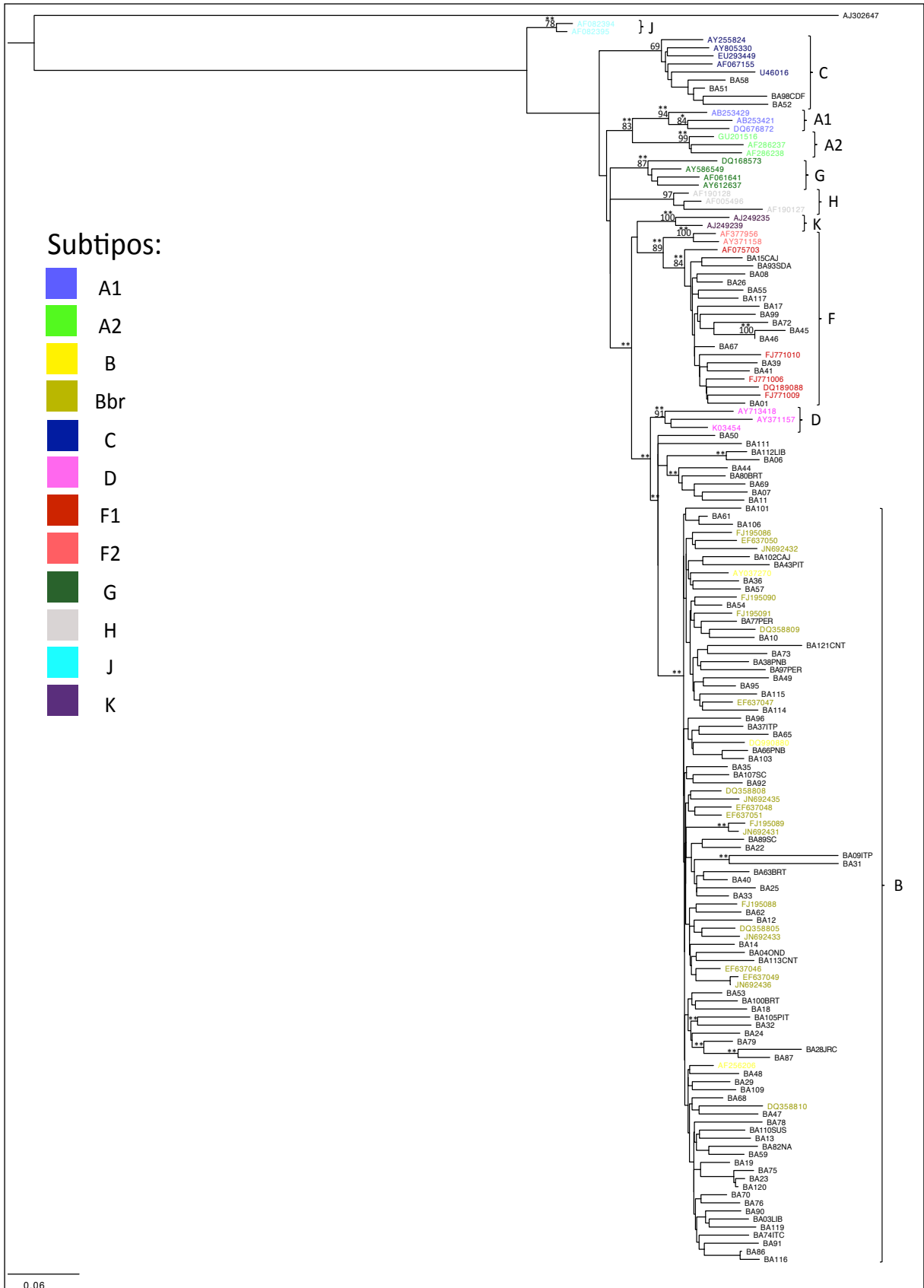


Figura 12 - Análise NJ mostrando as relações filogenéticas entre as sequências da região pol de isolados de HIV-1 circulantes em Salvador e sequencias de referência dos subtipos do grupo M. Uma sequencia do grupo O do HIV-1 foi usada como grupo externo. Apenas valores de *bootstrap* acima de 70% são mostrados

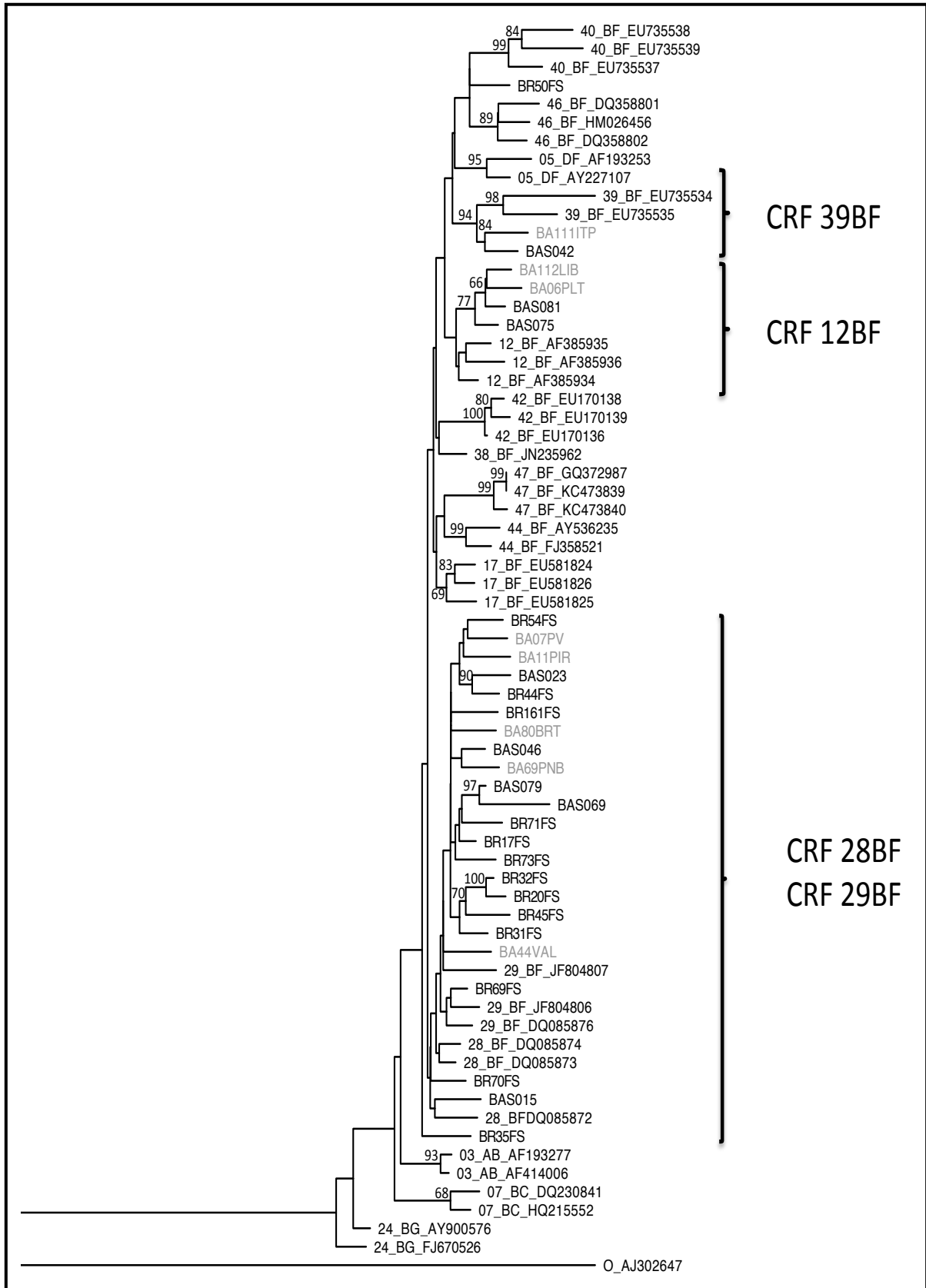


Figura 13 - Árvore NJ mostrando as relações filogenéticas dos diferentes padrões de recombinação entre os subtipos B e F dentro das seqüências da região pol. Uma seqüência do grupo O do HIV-1 foi usada como grupo externo. Seqüências obtidas em Salvador e referências obtidas de Los Alamos HIV. Database estão descritas no anexo C. As seqüências oriundas do estado da Bahia estão em **negrito** e aquelas geradas neste estudo estão sublinhadas. Apenas valores de *bootstrap* acima de 70% são mostrados.

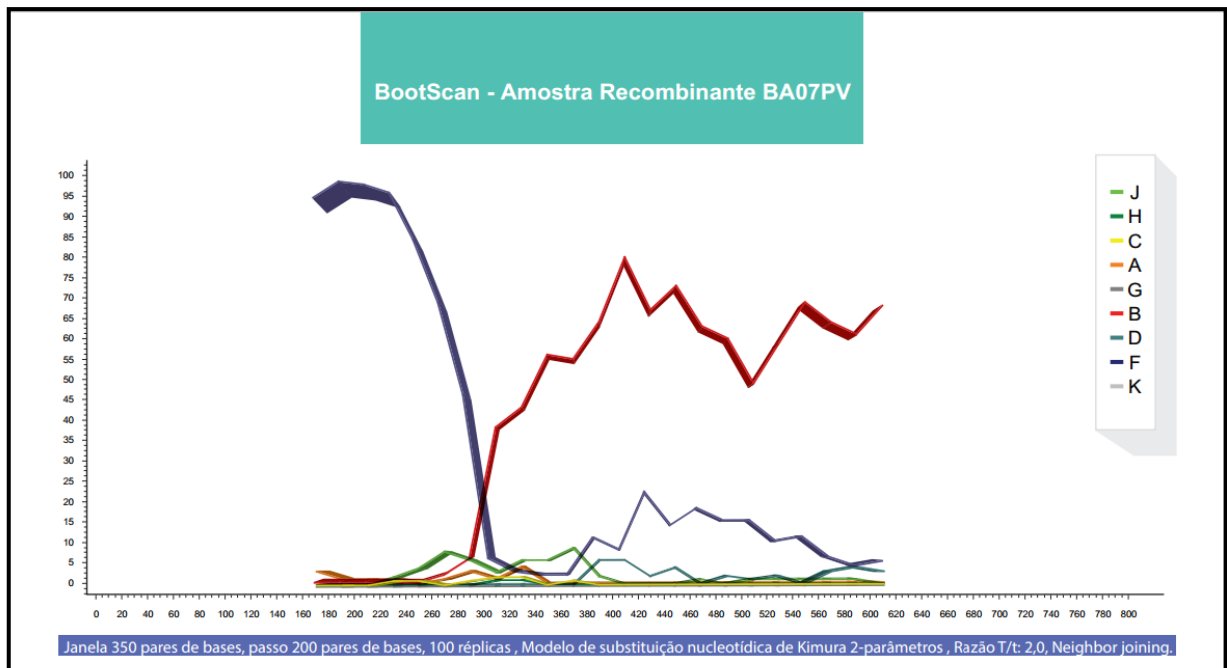


Figura 14 - Boot Scan - Amostra Recombinante X. As sequências do gene *pol* que não agruparam dentro dos subtipos de referência foram submetidas às análises de recombinação no programa SIMPLOT. A figura representa a análise Bootscanning de uma das amostras mostrando o padrão de recombinação entre os subtipos B e F dentro de *pol*.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a prevalência de mutações de resistência transmitida na cidade de Salvador utilizando a lista de mutações para vigilância de resistência transmitida (SDRM). Os resultados obtidos pela SDRM evidenciaram taxas intermediárias com 6,8% na população geral (2,9 - 11,7% Intervalo de Confiança de 95%), 2,9% aos ITRNN, 1,9% aos ITRN e IP. O único estudo anterior utilizando a metodologia SDRM, encontrou prevalência valor global de 8,1%. Esse estudo contudo, na análise restrita à Salvador apresentava tamanho amostral de 34 pacientes, inferior ao atualmente preconizado pela WHO de pelo menos 45 pacientes, encontrando apenas 1 indivíduo com a mutação K103N o que representa uma prevalência global de apenas 2,9% (INOCENCIO et al., 2009).

Uma vez que essa metodologia fora aplicada apenas uma vez, é necessário comparar este estudo aos metodologicamente mais semelhantes. Em 2010 Arruda e Cols. obtiveram no estado do Ceará valores mais elevados de DRM com 9,5% no total e subdividindo por classe de antirretroviral, relataram 4,1% aos ITRN e IP e 2,7% aos ITRNN. Comparando com o presente estudo, Arruda e Cols. obtiveram um tamanho amostral menor com 64 pacientes, cinco desses menores de 18 anos, e características epidemiológicas, como maior prevalência de HSH e de pacientes com infecção mais recente pelo HIV-1 (mediana de apenas 4,5 meses entre o diagnóstico e o arrolamento ao estudo), que são sabidamente fatores preditivos de maiores taxas de DRM (HIRSCH et al., 2008; KIERTIBURANAKUL et al., 2013). Em 2013, estudos realizados nas regiões Sudeste (estado de São Paulo) e no Centro-Oeste (estado de Goiás) do Brasil apresentaram características metodológicas semelhantes ao presente estudo e obtiveram taxas de DRM bastante similares, 7,6% e 7,3%, respectivamente, corroborando com os nossos achados (PFRIMER et al., 2013, FERREIRA et al., 2013).

Entre todas as mutações descritas na nossa população, segundo a metodologia SDRM, apenas a T215D foi encontrada em mais de uma amostra. Em concordância com a literatura mundial, a classe com maior prevalência de DRM neste estudo foi dos ITRNN. Analisando o impacto dessas mutações de DRM na sensibilidade aos antirretrovirais, fica evidente o possível impacto na eficácia ao primeiro esquema terapêutico. Mutações encontradas na nossa população como a G190EA, K103N, I84V, M46I e V82T conferem alterações na sensibilidade que

abrangem o espectro de resistência intermediária a alto nível de resistência à drogas como o Efavirenz, Nevirapina, Atazanavir/Ritonavir e Lopinavir/Ritonavir, que estão classificadas como de primeira linha para início de terapia, e conferem de forma menos esperada alterações na sensibilidade à drogas como a Etravirina e o Tipranavir/Ritonavir que são drogas reservadas apenas para pacientes em falha avançada aos antirretrovirais.

A análise de mutações de resistência utilizando o algoritmo de Stanford evidenciou uma prevalência aproximadamente seis vezes maior do que através da metodologia SDRM. A taxa global encontrada foi de 41,3%, com 24% com mutações associados aos IP, 16,3% aos ITRNN e 5,8% aos ITRN. Estudos anteriores a lista atualizada de mutações de vigilância também reportaram taxas elevadas com até 36% em Santos e de 18,9% na própria Salvador (PEDROSO et al., 2007, SUCUPIRA et al., 2007). Este estudo demonstra uma elevação na taxa de mutações de DRM, comparativamente aos dados já previamente muito elevados em população semelhante, nos pacientes com HIV/Aids vivendo em Salvador (PEDROSO et al., 2007). A diferença nas prevalências de DRM encontrada entres as metodologias SDRM e do algoritmo de Stanford nesse estudo é de 34,4% (6,9% X 41,3% respectivamente) quando a análise restringe-se à quantificação de todas as mutações encontradas, independentemente do impacto na sensibilidade aos antirretrovirais. Essa diferença pode ser explicada pela presença das mutações polimórficas encontradas no algoritmo de Stanford.

Analisando comparativamente os valores de DRM quando estratificada segundo o impacto das mutações na ação do medicamento, as prevalências assemelharam-se com 7,7% e 6,7% para baixo nível de resistência e intermediário respectivamente no algoritmo de Stanford contra 6,8% pela SDRM. O nosso estudo corrobora os achados de Green e Cols. que em 2008 também não acharam diferenças entre as duas metodologias com valores de DRM de 9,2 e 10% pela SDRM e Stanford respectivamente quando as mutações consideradas em Stanford eram apenas as que causavam alterações de baixo a alto nível de resistência (GREEN et al., 2008).

O presente estudo também descreveu a epidemiologia molecular do HIV-1. Os achados assemelham-se aos previamente encontrados em estudos realizados em Salvador ou cidade geograficamente próxima desde 2007 (BRENNAN et al., 2007). A prevalência dos subtipos foi de 72,8% subtipo B, 15,1% subtipo F; 4% do

subtipo C e 8,1% formas recombinantes (5 semelhantes à CRF28/29_BF, 2 à CRF12_BF, 1 à CRF39_BF). Monteiro-Cunha e Cols. e Santos e Cols. em 2011 descreveram padrões bastante semelhantes de distribuição dos subtipos, contudo, há no presente estudo uma evidência no aumento de 300% dos casos do subtipo C quando comparados aos achados dessas últimas publicações. Esse fato pode ser explicado pela complexa dinâmica da epidemia e da evolução do HIV-1, como a introdução de novos subtipos trazidos por portadores oriundos de localidades com epidemiologia molecular diversa à baiana. Semelhante aos achados dos trabalhos dos citados autoras, entre as amostras classificadas como recombinantes, apesar de assemelharem-se aos CRF caracterizados pelos bancos de dados mundiais, as análises de reconstrução da Árvore Filogenética e das regiões nucleotídicas de provável recombinação sugerem que essas amostras apresentam formas distintas de recombinação com características que podem defini-las como formas circulantes próprias da epidemia baiana (MONTEIRO et al. , 2009; SANTOS et al., 2011).

Contudo, os resultados desse estudo precisam ser analisados, considerando as limitações inerentes a um estudo de corte transversal, que impossibilita a definição de causalidade para os seus achados. Em relação as características epidemiológicas da população estudada, os valores de DRM podem estar subestimados e a prevalência categorizada por classe de antirretroviral distorcida, uma vez que a população do estudo apresentava a mediana do tempo estimado de infecção em 29 meses. Sabe-se que o tempo de infecção é diretamente associado a menores taxas de DRM, explicado pela taxa de substituição nucleotídica do vírus que é o tempo necessário para que cepas mutantes retornem ao padrão nucleotídico selvagem. Estima-se que, em quatro anos, 100% das cepas possuidoras da mutação M184V retornarão a forma 184M, esse tempo difere em relação a outras mutações para drogas da mesma classe e aventa-se que 20% das cepas retornarão ao padrão selvagem em relação as mutações associadas aos ITRNN e 22% aos IP (JAIN et al., 2011).

Outra limitação deste estudo foi a utilização da técnica de genotipagem convencional, que detecta apenas populações majoritárias do vírus que representem mais de 20% da população viral total (JOHNSON et al., 2008). Mutações de resistência em pacientes virgens de tratamento tornam-se minoritárias ao longo do tempo, uma vez que não há pressão seletiva exercida pelos HAART, podendo desta forma subestimar a prevalência de DRM (VANDAMME et al., 2011).

Em relação às análises filogenéticas, o sequenciamento de um único gene impossibilita a definição mais fidedigna dos subtipos e apenas a análise do genoma completo permitirá elucidar os questionamentos sobre o padrão de recombinação.

Podemos concluir, que a taxa de resistência transmitida na cidade de Salvador está classificada como intermediária segundo a OMS (6,8%), o que sugere a necessidade de incorporação as diretrizes nacionais de tratamento aos pacientes vivendo com HIV/Aids do teste de genotipagem previamente ao início da HAART (VANDAMME et al., 2011). Os achados de DRM utilizando o algoritmo de Stanford assemelha-se ao SDRM quando estratificado pelo impacto aos antirretrovirais nos níveis de resistência baixa e intermediária. Conclui-se também que a epidemia molecular do HIV-1 em Salvador permanece estável e as atuais evidências, em conjunto aos achados prévios da literatura, suportam a hipótese que existem formas recombinantes BF com características locais e nos motiva a desenvolver um estudo do genoma completo dessas amostras para possibilitar a comprovação dessa teoria.

7 CONCLUSÕES

A prevalência mutações para vigilância de resistência transmitida (SDRM) na cidade de Salvador em 2012 é classificada como intermediária segundo a OMS, com valores globais de 6,9%.

A análise de mutações de resistência utilizando o algoritmo de Stanford, evidenciou níveis de resistência transmitida semelhante ao encontrado através da lista de mutações para vigilância de resistência transmitida (SDRM), quando estratificado pelo impacto aos antirretrovirais nos níveis de resistência baixa e intermediária.

A prevalência dos subtipos foi de 72,8% subtipo B, 15,1% subtipo F; 8,1% formas recombinantes (5 semelhantes à CRF28/29_BF, 2 à CRF12_BF, 1 à CRF39_BF) e 4% do tipo C.

REFERÊNCIAS

- ABEL, S. ; BACK, D. J. ; Vourvahis, M. **Antivir Ther.** v. 14, p. 607-618, 2009.
- ARRUDA, E. et al. Short communication: intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.27, p.153-156, 2011.
- BANG, J.I. et al. Prevalence of primary antiretroviral resistance: trends in Korea. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.24, p.83-85, 2008.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, p. 868-71, 1983.
- BARRE-SINOUSSE, F. **HIV as the cause of AIDS**. Lancet, v. 348, p. 31-35, 1996.
- BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infect. Genet. Evol.**, v. 7, p. 263 – 70, 2007.
- BENNETT, D. E. et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PLoS One**, v. 4. p. 4724-9, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Bol. Epidemiol. DST/Aids**, v. 9, n.1, 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos vivendo com HIV/AIDS**. Versão preliminar. Brasília, 2013.
- BRENNAN, C. A. et al. HIV global surveillance: foundation for retroviral discovery and assay development. **J. Med. Virol.**, v. 78 Supl 1, p. 24–29, 2006.
- BRENNAN, C. A. et al. HIV-1 Strains Identified in Brazilian Blood Donors: Significant Prevalence of B/F1 Recombinants. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 23, p.1434-1441, 2007.
- CAMBIANO, V. et al. Transmission of Drug Resistant HIV and Its Potential Impact on Mortality and Treatment Outcomes in Resource-Limited Settings. **J. Infect. Dis.**, v. 207, S2, p.S57-S62, 2013.
- CARVALHO, B. C. et al. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland North State of Tocantins, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 27, p.1081-1087, 2011.
- CHAN, D. C. et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. **Cell**, v. 89, p. 263-73, 1997.
- CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 18, p. 343-6, 1986.
- COFFIN, J. et al. Human immunodeficiency viruses. **Science**, v. 9, p. 697, 1986.

CONLON, C. P. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants associated with zidovudine resistance. **J Infect Dis**, v. 169, p. 411-415, 1994.

CONNOR, R. I. ; Ho D. D. 1992. Etiology of AIDS: biology of human retroviruses. In: Devita VT. editor. **AIDS etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company p.13-85.

CONWAY, B. et al. Primary lamivudine resistance in acute/early human immunodeficiency virus infection. **Clin Infect Dis**, v. 28, p.910-1, 1999.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, p. 772, 2012.

DENG, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, v.381, p.661-666, 1996.

DORANZ, B. J. et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. **Cell**, v. 85, p. 1149-1158, 1996.

ERICE, A. et al. Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. **N Engl J Med**, v. 328, p. 1163-1165, 1993.

ERON, J.J. JR. HIV-1 protease inhibitors. **Clin Infect Dis**, v. 30, p. S160-70, 2000.

ESSEX, M. et al. Human immunodeficiency viruses in the developing world. **Adv Virus Res**, v. 53, p. 71-88, 1999.

EYER-SILVA, W. A. et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in inner Rio De Janeiro State, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, p. 303-8, 2007.

FERREIRA, J. L. et al. Transmitted Drug Resistance among People Living with HIV/Aids at Major Cities of Sao Paulo State, Brazil. **Adv Virol**, v. 2013, p. 878237, 2013.

FOX, J. et al. Prevalence of primary genotypic resistance in a UK centre: Comparison of primary HIV-1 and newly diagnosed treatment-naive individuals. **AIDS**, v.21, p.237-9, 2007.

FREED, E. O. HIV-1 replication. **Somat Cell Mol Genet**, v. 26, p.13-33, 2001.

FRENTZ, D. et al. Temporal Changes in the Epidemiology of Transmission of Drug-Resistant HIV-1 across the World. **AIDS Rev**, v. 14, p. 17-27, 2012.

GAGLIANI, L. H. et al. The Association Between Primary Antiretroviral Resistance and HAART Virologic Failure in a Developing Set. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, p.251- 256, 2011.

GARCIA-LERMA, J. G. et al. Increased ability for selection of zidovudine resistance in a distinct class of wild-type HIV-1 from drug-naive persons. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, p. 13907-139012, 2001.

GILBERT, M. T. et al. The emergence of HIV/AIDS in the American and beyond. **Proc Natl Acad Sci**, v. 104, p. 18566-18570, 2007.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N Engl J Med**, v.10, p.1425-31, 1981.

GRAF, T. et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure categories. **J Clin Virol**, v. 51, p. 186-91, 2011.

GRAY, R. R. et al. Spatial phylodynamics of HIV-1 epidemic emergence in east Africa. **AIDS**, v. 23, p. 9-17, 2009.

GREEN, H. et al. The impact of different definitions on the estimated rate of transmitted HIV drug resistance in the United Kingdom. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 49, p. 196-204, 2008.

GUPTA, K. R. et al. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis. **Lancet**, v. 380, p. 1250-1258, 2012.

GUTIÉRREZ, C. et al. Prevalence of primary resistance mutations to integrase inhibitors in treatment-naïve and -experienced patients infected with B and non-B HIV-1 variants. **HIV Clin Trials**, v. 14, p. 10-16, 2013.

HAUBRICH, R. ; DEMETER, L. International perspectives on antiretroviral resistance. Clinical utility of resistance testing: retrospective and prospective data supporting use and current recommendations. **J. Acquir Immune Defic Syndr**, v. 26, S1, p.51-59, 2001.

HAZUDA, D. J. HIV integrase as a target for antiretroviral therapy. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 7, p. 383–389, 2012.

HECHT, F. M. et al. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. **N Engl J Med**, v. 339, p. 307-3011, 1998.

HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends Mol Med**, v.18, p. 182-92, 2012.

HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. **Clin Infect Dis**, v. 46, p. 266-285, 2008.

HOFFMANN, W. et al. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 96, p. 6359-6364, 1999.

- IMRIE, A. et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 resistant to nevirapine and zidovudine. Sydney Primary HIV Infection Study Group. **J Infect Dis**, v. 175, p.1502-6, 1997.
- INOCENCIO, L. A. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J Int AIDS Soc**, v.18, p.12:20, 2009.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Censo 2010. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2010/default.shtm>> Acesso em: 02 fev. 2013.
- JAIN, V. et al. Differential persistence of transmitted HIV-1 drug resistance mutation classes. **J Infect Dis**, v. 203, p.1174-1181, 2011.
- JAIN, V. et al. Transmitted drug resistance in persons with acute/early HIV-1 in San Francisco, 2002-2009. **PLoS One**, v.10, p.e15510, 2010.
- JOHNSON, V. A. et al. 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**, v. 183, p.1688-1693, 2001.
- JUNQUEIRA, D. M. et al. Reviewing the history of HIV-1: spread of subtype B in the Americas. **PLoS One**, v. 6: e27489, 2011.
- KANDATHIL, A. J. et al. Molecular epidemiology of HIV. **Indian J Med Res**, v. 121, p. 333–344, 2005.
- KARLSSON, A. et al. Low prevalence of transmitted drug resistance in patients newly diagnosed with HIV-1 infection in Sweden 2003-2010. **PLoS One**, v. 7, p.e33484, 2012.
- KATO, S. et al. Differential prevalence of HIV type 1 subtype B and CRF01_AE among different sexual transmission groups in Tokyo, Japan, as revealed by subtype-specific PCR. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.19, p. 1057–1063, 2003.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v.15, p.1647-1649, 2012.
- KIERTIBURANAKUL, S. Comparisons of primary HIV-1 drug resistance between recent and chronic HIV-1 infection within a Sub-regional cohort of Asian patients. **PLoS One**, v. 8, p.e 62057, 2013.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, p. 111-20, 1980.
- KORBER, B. et al. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. **Science**, v. 228, p. 1789-96, 2000.

- KOZAL, M. J. et al. A population based and longitudinal study of sexual behavior and multidrug-resistant HIV among patients in clinical care. **Med Gen Med**, v.8, p. 72, 2006.
- KOZAL, M. J. et al. Extensive polymorphism observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. **Nat Med**, vol.2, p.753-759, 1996.
- KUIKEN, C. et al. Genetic analysis reveals epidemiologic patterns in the spread of human immunodeficiency virus. **Am J Epidemiol**, v.152, p. 814–822, 2000.
- LEARN, G. H. et al. Maintaining the integrity of human immunodeficiency virus sequence databases. **J Virol**, v. 70, p. 5720-5730, 1996.
- LI, L. et al. Genetic characterization and transmitted drug resistance of the HIV type 1 epidemic in men who have sex with men in Beijing, China. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, p. 633-637, 2013.
- LI, Y. et al. RNA polymerase II initiation factor interactions and transcription start site selection. **Science**, v.263, p.805-807, 1994.
- LITTLE, S. J. et al. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. **JAMA**, v. 282, p.1142-9, 1999.
- LUNDGREN, J. D.; MOCROFT, A. The impact of antiretroviral therapy on AIDS and survival. **J HIV Ther**, v.11, p. 36-38, 2006.
- MANASA, J. et al. Primary drug resistance in South Africa: data from 10 years of surveys. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.28, p.558-565, 2012.
- MANSKY, L. M. The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. **Virology**, v. 15, p. 391-400, 1996.
- MANTOVANI, N. P. et al. Analysis of transmitted resistance to raltegravir and selective pressure among HIV-1-infected patients on a failing HAART in Sao Paulo, Brazil. **J Clin Microbiol**, v.50, p.2122-2125, 2012.
- MARINS, J. R. et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. **AIDS**, v. 17, p.1675-1682, 2003.
- MARKOWITZ, M. et al. Sustained antiretroviral effect of raltegravir after 96 weeks of combination therapy in treatment-naive patients with HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 52, p. 350-356, 2009.
- MEDEIROS, R. M. De. et al. Co-circulation HIV-1 subtypes B, C, and CRF31_BC in a drug-naive population from Southernmost Brazil: analysis of primary resistance mutations. **J Med Virol**, v.83, p.1682-1688, 2011.
- MEYER, P. R. et al. Unblocking of chain-terminated primer by HIV-1 reverse transcriptase through a nucleotide-dependent mechanism. **PNAS**, v. 95, n. 23, p.13471-6, 1998.

- MOCROFT, A. et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. **Lancet**, v. 362, p. 22-29, 2003.
- MONLEAU, M. et al. Drug Resistance Mutations of HIV Type 1 Non-B Viruses to Integrase Inhibitors in Treatment-Naive Patients from Sub-Saharan Countries and Discordant Interpretations. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, p.1157 -1160, 2012.
- MONTEIRO J. P. et al. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. **J Med Virol**, v. 81, p. 391-9, 2009.
- MONTEIRO_CUNHA, J. P. et al. Lack of high-level resistance mutations in HIV type 1 BF recombinant strains circulating in northeast Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 27, p. 623-631, 2011.
- MORGADO, M. G. et al. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, p.143-50, 2002.
- PALELLA, F. J. Jr. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. **N Engl J Med**, v. 338, p. 853-860, 1998.
- PALELLA, F. J. Jr. et al. Survival benefit of initiating antiretroviral therapy in HIV-infected persons in different CD4+ cell strata. **Ann Intern Med**, v. 138, p.620-626, 2003.
- PALELLA, F. J. Jr. et al. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 43, p. 27-34, 2006.
- PASSAES, C. B. et al. Lack of Primary Mutations Associated With Integrase Inhibitors Among HIV-1 Subtypes B, C, and F Circulating in Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 51, p. 07-12, 2009.
- PEDROSO, C. et al. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a northeast state of Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, p. 251-253, 2007.
- PERELSON, A. S. et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science**, v. 271, p.1582–1586, 1996.
- PFRIMER, I. A. et al. Intermediate levels of transmitted antiretroviral drug resistance in Midwestern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v.29, p.205-206, 2013.
- PINEDA- PENA, A. C. et al. Automated subtyping of HIV-1 genetic sequences for clinical and surveillance purposes: Performance evaluation of the new REGA version 3 and seven other tools. **Infect Genet Evol**, v. 19, p. 337-48, 2013.
- POMERANTZ, R. J. ; HORN, D. L. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. **Nat Med**, v. 9, p. 867-873, 2003.

QUIGG, M. et al. Mutations associated with zidovudine resistance in HIV-1 among recent seroconvertors. **AIDS**, v.11, p. 835-836, 1997.

RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, p. 52-61, 2004.

RANGEL, H. R. et al. Absence of primary integrase resistance mutations in HIV type 1-infected patients in Venezuela. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 2, p.923-926, 2010.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, p.:55–56, 2000.

RONDE, A. de. 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**, v. 10, p. 231-232, 1996;

RUBIO, A et al. Increase in the frequency of mutation at codon 215 associated with zidovudine resistance in HIV-1-infected antiviral-naive patients from 1989 to 1996. **AIDS**, v. 11, p. 1184-1186, 1997.

SALEMI, M. et al. Different epidemic potentials of the HIV-1B and Csubtypes. **J Mol Evol**, v. 60, p. 598-605, 2005.

SANABANI, S. S. et al. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. **PLoS One**, v. 6, p. e25869, 2011.

SANTOS, L.A. et al. Detection of distinct human immunodeficiency virus type 1 circulating recombinant forms in northeast Brazil. **J Med Virol**, v. 83, p. 2066-72, 2011.

SEPKOWITZ, K. A. AIDS--the first 20 years. **N Engl J Med**, v. 344, p. 1764-1772, 2001.

SHAFER, R. et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. **AIDS**, v. 21, p. 215-23, 2007.

SHARP, P. M. ; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, p. a006841, 2011.

SHEN, L. et al. Steered Molecular Dynamics Simulation on the Binding of NNRTI to HIV-1 RT. **Biophys J**, v. 84, n. 6, p. 3547-63, 2003.

SPRINZ, E. et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, p. 861-867, 2009.

SUCUPIRA, M. C. et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. **AIDS Patient Care STDS**, v. 21, p.116-128, 2007.

SWOFFORD, D. L. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1998.

TEBIT, D. M. ; ARTS, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. **Lancet Infect Dis**, v.11, p. 45-56, 2011.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TUPINAMBÁS, U. et al. Transmitted human immunodeficiency virus-1 drug resistance in a cohort of men who have sex with men in Belo Horizonte, Brazil--1996-2012. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.108, p.470-475, 2013.

TURNER, B. G. SUMMERS, MF. Structural biology of HIV. **J Mol Biol**, v. 285, p.1-32, 1999.

UNAIDS, **Global Report**, 2012.

VAISHNAV, Y. N; WONG-STAAL, F . The Biochemistry of Aids. **Annual Review of Biochemistry**. v. 60, p. 577-630, 1991.

VANDAMME, A.M. et al. European Recommendations for the Clinical Use of HIV Drug Resistance Testing: 2011 Update. **AIDS REV**, v.13, p. 77-108, 2011.

VERBIEST, W. et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in antiretroviral naive patients: a prospective study. **AIDS**, v.15, p.647-650, 2001

VIDAL, N. et al. Unprecedented Degree of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Group M Genetic Diversity in the Democratic Republic of Congo Suggests that the HIV-1 Pandemic Originated in Central Africa. **J Virol**, v. 74, p. 10498-10507, 2000.

WITTKOP, L. et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-Chain joint Project): a European multicohort study. **Lancet Infect Dis**, v. 11, p. 363-371, 2011.

WOROBEY, M. et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. **Nature**, v.2, p. 661-4, 2008.

ANEXOS

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

ANEXO B - Questionário Epidemiológico

ANEXO C - Sequências de Referência para análise filogenética

ANEXO D – Parecer Final N° 257/2012

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convido o senhor(a) _____, nascido no dia _____ em _____, a participar do estudo: “Avaliação da história epidemiológica da infecção pelo HIV-1 no estado da Bahia – Brasil”. A minha participação neste estudo é voluntária, não remunerada, e em hipótese alguma está condicionada à continuidade do meu tratamento ou do fornecimento das medicações que necessito ou venha a necessitar. Minha participação também não envolve qualquer despesa para mim e posso solicitar a qualquer momento a minha retirada do estudo e do armazenamento das minhas amostras sanguíneas. O estudo será realizado no LASP (Laboratório Avançado de Saúde Pública do CPqGM/FIOCRUZ do Instituto Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia) e no Laboratório de Pesquisa em Virologia no Hospital Universitário Professor Edgard Santos, com o objetivo de identificar os subtipos do HIV-1 mais encontrados, estimar quando ocorreu a primeira infecção por esse vírus no estado da Bahia, estimar de que local esse agente viral foi trazido e identificar quais e o número de mutações que podem tornar o HIV resistente aos medicamentos. A minha participação do estudo será através do preenchimento de um questionário, sendo informado que posso me negar a responder quaisquer questões, e da autorização do uso e do armazenamento do material sanguíneo excedente coletado para o estudo da carga viral e CD4, que serão utilizados unicamente para a realização dos estudos necessários que identificarão as características do vírus e desta forma tentar esclarecer os objetivos do estudo acima citados. Fui informado que existem vários subtipos de HIV e que o conhecimento do subtipo específico com o qual estou infectado provavelmente não trará qualquer utilidade para o meu tratamento, mas poderá ajudar na compreensão de como o vírus está se disseminando pela Bahia. Fui informado ainda que também será pesquisada a presença de mutações virais que o tornam mais resistente aos medicamentos que tomo ou poderei vir a tomar para combatê-lo. Estas informações, sim, poderão ter grande valia para o meu tratamento. Fui informado que a ainda que os riscos que corro pela participação neste estudo são mínimos, e se limitam a eventuais complicações no local da coleta de sangue, não sendo necessário coleta de amostra sanguínea maior do que a já prevista para os exames solicitados pelo meu médico (carga viral e CD4) e que há total garantia de confidencialidade e privacidade das informações a serem geradas. Autorizo que os resultados sejam divulgados em publicações biomédicas de qualidade indiscutível. Fui esclarecido que os dados a serem publicados não permitirão a identificação dos pacientes. Autorizo também que parte do meu sangue seja conservada pelo LASP para estudos futuros, desde que estes venham a ser autorizados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Gonçalo Muniz.

Caso os resultados dos exames discriminados acima apontem a necessidade de investigações adicionais ou tratamento específico, estes serão informados ao meu médico assistente ou ao serviço de referência no qual estou em acompanhamento clínico, pelo médico e responsável pelo estudo, Dr Marcio de Oliveira Silva (Endereço: Rua Comendador José Alves Ferreira, 240 – Garcia, Salvador - BA, 40100-160; Telefone 071 9197-9086).

Declaro que, após o entendimento e em acordo com os objetivos, possíveis riscos e benefícios, aceito participar do estudo: “Avaliação da história epidemiológica da infecção pelo HIV-1 no estado da Bahia – Brasil” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Gonçalo Moniz – CPqGM (Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Tel. (71) 3176-2200 - FAX (71) 3176-2327 - ascom@bahia.fiocruz.br número de aprovação 257/2012.

Recebo uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Local e data _____

Assinatura _____

Assinatura datiloscópica:

Declaro que, após o entendimento e em acordo com os objetivos, possíveis riscos e benefícios, aceito participar do estudo: “Avaliação da história epidemiológica da infecção pelo HIV-1 no estado da Bahia – Brasil” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Gonçalo Moniz – CpqGM (Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA CEP: 40296-710

Tel. (71) 3176-2200 - FAX (71) 3176-2327 - ascom@bahia.fiocruz.br) número de aprovação 257/2012 e permito o armazenamento das amostras biológicas por mim cedidas.

Local e Data _____

Assinatura _____

Assinatura datiloscópica:

ANEXO B - Questionário Epidemiológico

Avaliação da história epidemiológica da infecção pelo HIV-1 no estado da Bahia-Brasil.

Questionário.

Uso de Terapia Antirretroviral () Sim – Exclusão do Estudo.

Identificação (Iniciais completas) : _____;

Data da Entrevista: ___/___/___;

Amostra: EpHIV_____;

Gênero: () Masculino () Feminino;

Data de Nascimento: ___/___/___;

Raça (auto relato): () Branco; () Pardo, () Negro, () Outros _____;

Endereço: _____

Telefones () _____/_____;

Nome do Médico solicitante do exame: _____;

Unidade em atendimento: _____;

Data do Diagnóstico do HIV: ___/___/___;

Exposição : () Sexual: () Homem ()Mulher () Homem e Mulher;

() Acidente com Perfuro cortante;

() Drogas Venosas;

() Hemotransfusão;

() Transmissão Vertical;

() Outros _____;

Histórico de Exames:

Primeiro: Cd4_____; Cd8_____; Ratio _____; Carga Viral _____; Log_____;

Último (Data da entrevista): Cd4_____; Cd8_____; Ratio _____; Carga Viral _____; Log_____;

ANEXO C - Sequências de Referência para análise filogenética

AB253421	A1	AY586549	G
AB253429	A1	AY612637	G
DQ676872	A1	DQ168573	G
AF286237	A2	AF005496	H
AF286238	A2	AF190127	H
GU201516	A2	AF190128	H
AF256206	B	AF082394	J
AY037270	B	AF082395	J
DQ990880	B	AJ249235	K
DQ358805	B Brasil	AJ249239	K
DQ358808	B Brasil	AJ302647	O
DQ358809	B Brasil		
DQ358810	B Brasil		
EF637046	B Brasil		
EF637047	B Brasil		
EF637048	B Brasil		
EF637049	B Brasil		
EF637050	B Brasil		
EF637051	B Brasil		
FJ195086	B Brasil		
FJ195088	B Brasil		
FJ195089	B Brasil		
FJ195090	B Brasil		
FJ195091	B Brasil		
JN692431	B Brasil		
JN692432	B Brasil		
JN692433	B Brasil		
JN692435	B Brasil		
JN692436	B Brasil		
AF067155	C		
AY255824	C		
AY805330	C		
EU293449	C		
U46016	C		
AY371157	D		
K03454	D		
AY713418	D		
AF075703	F1		
DQ189088	F1		
FJ771006	F1		
FJ771010	F1		
FJ771009	F1		
AF377956	F2		
AY371158	F2		
AF061641	G		

ANEXO D



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

PARECER FINAL Nº 257/2012

Protocolo: 376/ 2012

Projeto de Pesquisa: “Avaliação da história epidemiológica da infecção pelo HIV-1 no estado da Bahia - Brasil”.

Pesquisador(a) Responsável: Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara

Instituição ou Departamento: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao pesquisador responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado, com algumas sugestões e recomendações a seguir:

- (1) Adequar/rever a folha de rosto – substituir por modelo atual;
- (2) Atualizar o cronograma;
- (3) Inserir no TCLE, contato do CEP-CPqGM.
- (4) O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios parcial e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

Vigência: 03/08/2012 a 02/08/2014.

Relatório parcial: 02/08/2013.

Relatório final: 02/09/2014.

Salvador, 03 de agosto de 2012.

Adriana Lanfredi Rangel

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

CPqGM/FIOCRUZ

IORG-0002090 / IRB-00002612