

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

**Epidemiologia molecular do HIV-1 e resistência primária a
antiretrovirais em indivíduos soropositivos da região metropolitana
de Florianópolis/SC**

TIAGO GRÄF

Florianópolis

2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Tiago Gräf

**Epidemiologia molecular do HIV-1 e resistência primária a
antiretrovirais em indivíduos soropositivos da região metropolitana
de Florianópolis/SC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia aplicada à Saúde. Orientadores: Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto e Prof. Dr. Gonzalo J. B. Bentancor

Florianópolis

2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

G736e Gräf, Tiago

Epidemiologia molecular do HIV-1 e resistência primária a antiretrovirais em indivíduos soropositivos da região metropolitana de Florianópolis/SC [dissertação] / Tiago Gräf ; orientadores, Aguinaldo Roberto Pinto, Gonzalo Jose Bello Bentancor. - Florianópolis, SC, 2011.

92 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. HIV (Virus) - Florianopolis (SC). 3. Epidemiologia. 4. Mutação (Biologia). I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Bentancor, Gonzalo Jose Bello. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

CDU 577.23

Nome completo do autor

TÍTULO: SUBTÍTULO (SE HOUVER)

Este (a) Dissertação/Tese foi julgado(a) adequado(a) para obtenção do Título de “...”, e aprovad(o)a em sua forma final pelo Programa ...

Local, x de xxxxx de xxxx.

Prof. xxx, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a xxxx,
Orientadora
Universidade xxxx

Prof.^a, Dr.^a xxxx,
Co-Orientadora
Universidade xxxx

Prof., Dr. xxxx,
Universidade xxxxxx

Este trabalho foi realizado no Laboratório Imunologia Aplicada/CCB/UFSC, em colaboração com o Laboratório de Protozoologia/CCB/UFSC e o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular/FIOCRUZ, sob orientação do Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto e Prof. Dr. Gonzalo Jose Bello Bentancor, com recursos financeiros da Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedico este trabalho à minha família,
pois sempre me incentivaram em todas as escolhas que fiz.

AGRADECIMENTOS:

Ao meu orientador Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto, pela confiança depositada em mim, por todas oportunidades oferecidas, pelos ensinamentos sobre ciência, sobre a vida e a carreira acadêmica, e principalmente pela amizade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gonzalo J. B. Bentancor, pela paciência em orientar-me a distância, pela acolhida no Rio de Janeiro, pelas contribuições indispensáveis a este trabalho e por todo conhecimento transferido.

Ao Prof. Dr. Edmundo C. Grisard, pela parceria no desenvolvimento deste trabalho, por sua prontidão em ajudar sempre que necessário.

A todos integrantes do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular da FIOCRUZ-RJ, principalmente a Dra. Mariza Morgado, pelo treinamento em técnicas de Biologia Molecular e oportunidade de trabalhar em um dos melhores laboratórios de pesquisa em HIV/AIDS do Brasil.

À Caroline P. B. Passaes pela realização dos seqüenciamentos e análises da região da integrase viral.

Ao Prof. Dr. Carlos Zanetti pela amizade, conselhos e oportunidade de aprender a arte da docência com um grande Professor.

Ao Prof. Dr. Mário Steindel e todos os integrantes do Laboratório de Protozoologia da UFSC, em especial a Dra. Patrícia H. Stoco e Me. Aline D. Schlindwein, pela amizade, auxílio com os seqüenciamentos e por toda ajuda nas mais diversas técnicas utilizadas neste trabalho.

Aos médicos Luis G. E. Ferreira e Isabela A. K. Meirelles pela ajuda na seleção dos pacientes e todo esforço despendido na realização deste trabalho.

A todos os integrantes do LIA, atuais e antigos, Carol, Camila, Gisele, Sílvia, Nana, Elis, Jonathan, Luan, Yuri, Douglas e Álvaro, que fazem deste laboratório um lugar incrível de trabalhar. Obrigado pela amizade, pelas conversas, festas e churrascos. Agradeço especialmente ao Artur, pelo auxílio em todas as etapas deste trabalho, pela amizade, pelos papos filosóficos no RU, por vir ao laboratório em fins de semana e pelo simples companheirismo de assistir aos jogos do Brasil na Copa durante os intervalos de experimentos no laboratório. Muito obrigado!

Aos amigos do LVA, pela divertida convivência e pelos inesquecíveis congressos de virologia.

Ao meu tio Paulo, sua esposa Bernadete e filhos Eduardo e Letícia. Vocês foram como pais e irmãos em Florianópolis e se não

fosse por isso eu certamente não teria encarado esta aventura. Sou eternamente grato por tudo o que vocês fizeram por mim.

À minha namorada Lívia, pela paciência e pelo apoio neste período. Aos meus pais e minha irmã que me deram suporte para vencer todas as etapas deste mestrado e mesmo à distância me deram força em todas as decisões que tomei. Amo muito vocês!

“Há três métodos para ganhar sabedoria: primeiro, por reflexão, que é o mais nobre; segundo, por imitação, que é o mais fácil; e terceiro, por experiência, que é o mais amargo.”

Confúcio.

RESUMO

Florianópolis possui a segunda maior taxa de incidência de casos de AIDS entre as capitais brasileiras, mas pouco se sabe sobre a epidemiologia molecular do HIV-1 e a prevalência de resistência primária a drogas nesta cidade. Com o intuito de melhor entender a dinâmica da epidemia do HIV-1 na região metropolitana de Florianópolis foram analisadas as regiões genômicas do envelope, protease, transcriptase reversa e integrase do HIV-1 de 82 indivíduos soro-positivos e virgens de tratamento. A forma genética do HIV-1 mais freqüente foi o subtipo C (65,8%), seguido por cepas mosaico BC (18,3%), subtipo B (13,6%), subtipo F1 (1,2%) e uma forma recombinante BCF1 (1,2%). Uma associação estatisticamente significativa entre categorias de exposição e subtipos do HIV-1 foi observada no presente estudo. Mais de 75% das formas recombinantes BC e de sequências subtipo C pertenciam a sujeitos da categoria de exposição heterossexual, enquanto que 73% das sequências subtipo B eram provenientes da categoria HSH. Mutações de resistência a drogas foram observadas em 11% dos indivíduos estudados. O presente estudo confirma a alta prevalência de subtipo C e formas recombinantes BC no estado de Santa Catarina e revela uma diferença significativa ($p < 0,05$) na distribuição dos subtipos virais entre as diferentes categorias de exposição, bem como demonstra uma prevalência de mutações de resistência primária maior que a encontrada na maioria das cidades brasileiras.

Palavras chaves: HIV-1, epidemiologia molecular, subtipo C, mutações de resistência, Florianópolis.

ABSTRACT

Florianópolis has the second highest AIDS incidence among Brazilian capitals, but limited information is available about HIV molecular epidemiology and prevalence of primary drug resistance. In order to better understand the dynamics of the HIV-1 in the metropolitan region of Florianópolis, envelope, protease, reverse transcriptase and integrase genomic regions from 82 treatment-naïve HIV-positive individuals were analyzed. The most frequent HIV-1 genetic form was subtype C (65.8%) followed by mosaics BC (18.3%), subtype B (13.6%), subtype F1 (1.2%) and BCF1 recombinant (1.2%). A statistically significant association between exposure categories and HIV-1 subtypes was seen herein. Over 75% of HIV-1 BC recombinants and subtype C sequences belonged to subjects in the heterosexual exposure category, whereas 73% of subtype B sequences were in MSM exposure category. Primary drug resistance mutations were observed in 11% of the individuals. The present study confirms the high prevalence of subtype C and BC recombinants in Santa Catarina State and reveals a significant difference ($p < 0,05$) in the subtype distribution among distinct virus exposure categories, as well shows a prevalence of drug resistance mutations higher than the reports from the most Brazilian cities.

Key words: HIV-1, molecular epidemiology, subtype C, resistance mutations, Florianópolis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do HIV-1, evidenciando sua organização estrutural2
- Figura 2:** Representação esquemática do genoma do HIV-1. Os retângulos coloridos representam os nove genes virais3
- Figura 3.** Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região *env-gp120/C2V3* pelo algoritmo de *Neighbor-joining*24
- Figura 4.** Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região PR/RT pelo algoritmo de *Neighbor-joining*25
- Figura 5.** Padrão de recombinação de CRF31_BC na região PR/RT gerada a partir da metodologia de *bootscanning*26
- Figura 6.** Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região PR/RT de formas recombinantes CRF31_BC pelo algoritmo de *Neighbor-joining*27
- Figura 7.** Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região INT pelo algoritmo de *Neighbor-joining*28
- Figura 8.** Desenho esquemático mostrando o padrão de recombinação das cepas mosaico identificadas neste estudo 29
- Figura 9.** Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 para as regiões *env-gp120/C2V3*, PR/RT e INT isolados de pacientes da região metropolitana de Florianópolis30
- Figura 10:** Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 nas categorias de exposição Heterossexual, HSH e UDI32
- Figura 11:** Mapa da região sul do Brasil apresentando a distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos indivíduos incluídos neste estudo	21
Tabela 2. Dados epidemiológicos da população estudada de acordo com os principais subtipos virais e formas recombinantes encontrados no estudo	31
Tabela 3: Mutações de resistência identificadas em pacientes virgens de tratamento da região metropolitana de Florianópolis e perfil de resistência aos antiretrovirais	34

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABC - Abacavir
AIDS - Síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired immune deficiency syndrome*)
ARV - Antiretroviral
AZT - Zivudina
BLAST - **Ferramenta** local **básica** da **busca** do alinhamento (*Basic local alignment search tool*)
d4T - Stavudina
DDI - Didanosina
DLV - Delavirdina
dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados
DP - Desvio padrão
DRM - Mutação de resistência a fármacos (*Drug resistance mutation*)
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
EFV- Efavirenz
ELV - Elvitegravir
ETR - Etravirina
g – gravidade
HAART - Terapia antiretroviral altamente ativa (*Highly active antiRetroviral treatment*)
HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency vírus*)
HSH - Homens que fazem sexo com homens
INT - Integrase
INTI - Inibidor da integrase
kV - Kilovolt
l – Litro
LTR – Longa repetição terminal (*Long terminal repeat*)
M – Molar
MHC – Complexo maior de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)
ml – Mililitro
mM – Milimolar
NFV - Nelfinavir;
ng – Nanograma
NJ - *Neighbor-joining*
nm – Nanômetros
NNRTI - Inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa (*Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor*)

NRTI - Inibidor nucleosídico da transcriptase reversa (*Nucleoside reverse transcriptase inhibitor*)
NVP - Nevirapina
pb – Pares de bases
PBMC - Células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral blood mononuclear cells*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
PI - Inibidor da protease (*Protease inhibitor*)
pmol – Picomol
PR - Protease
RAL - Raltegravir
RT - Transcriptase reversa (*Reverse transcriptase*)
SC - Santa Catarina
SGR - Recombinante de segunda geração (*Second generation recombinant*)
SIV - Vírus da imunodeficiência símia (*Simian immunodeficiency virus*)
Taq – *Thermus aquaticus*
TDF - Tenofovir
UDI - Usuários de drogas injetáveis
 μg – Micrograma
 μl – Microlitro
 μM – Micromolar
UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE HIV/AIDS	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA DE HIV/AIDS	6
1.2.1 A Epidemia de HIV/AIDS no Brasil	6
1.2.2 Epidemiologia molecular do HIV	7
1.3 TERAPIA ANTIRETROVIRAL	9
2 OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3 PACIENTES, MATERIAIS & MÉTODOS	15
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	15
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	15
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	15
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	15
3.5 REAÇÃO DE PCR	16
3.6 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES AMPLIFICADAS	17
3.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	18
3.8 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA	18
3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICA	19
4 RESULTADOS	21
4.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	21
4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS	22
4.3 RELAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E SUBTIPOS VIRAIS IDENTIFICADOS	31
4.4 ANÁLISES DE RESISTÊNCIA	33
5. DISCUSSÃO	37
6. SUMÁRIO DE RESULTADOS	45
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
9. ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é uma das doenças infecciosas de maior importância a afetar a espécie humana em toda sua história. Atualmente, as mortes causadas pela AIDS são mais numerosas que doenças como tuberculose ou malária (WHO, 2010). Os primeiros relatos de indivíduos com AIDS foram registrados no ano de 1981 em pessoas homossexuais que apresentavam doenças raras, como pneumonia pneumocística e Sarcoma de Kaposi (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007). Logo se registrou a ocorrência da síndrome também em usuários de drogas injetáveis e indivíduos hemofílicos, que recebiam frequentemente doações de hemoderivados. Em um curto período de tempo todas as formas de contágios foram identificadas.

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) pode ser transmitido através de contatos sexuais desprotegidos, sendo atualmente a relação heterossexual a forma mais frequente de contágio, bem como através do compartilhamento de agulhas por usuários de drogas injetáveis (UDI), transmissão vertical durante a gravidez ou através do aleitamento e pela transfusão de hemoderivados contaminados com o vírus. Importante salientar que o HIV não é transmitido pela saliva, suor ou aerossóis produzidos por espirros de indivíduos infectados.

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE HIV/AIDS

Em 1983, apenas dois anos após o aparecimento dos primeiros casos de AIDS, foi isolado o agente causador da doença (BARRE-SINOSSI et al., 1983; GALLO et al., 1984). O HIV pertence ao gênero *Lentivirus* e família *Retroviridae*, existindo dois tipos do vírus: HIV-1 e HIV-2. Morfologicamente HIV-1 e HIV-2 são muito semelhantes, apresentando diferenças nos genes acessórios e no peso molecular de suas proteínas de membrana. Enquanto o HIV-2 é menos patogênico e causa infecções restritas ao oeste da África, o HIV-1 é o grande causador da epidemia de AIDS no mundo, sendo dividido nos grupos M, O, N e P (RAMBAUT et al., 2004; PLANTIER et al., 2009).

Cada partícula viral do HIV-1 tem aproximadamente 100nm de diâmetro e possui um envelope lipoproteico originado da célula hospedeira (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007). No envelope estão ancoradas as proteínas virais gp120 e gp41, além de proteínas do hospedeiro, como adesinas e MHC, que são incorporadas no momento

do brotamento viral e podem facilitar na adesão a outras células alvo (Figura 1). Na face interna do envelope viral, e ancorado a ele, está a proteína p17, formadora da matriz viral, estrutura que cerca o capsídeo. O capsídeo é formado pelas proteínas p24 e dentro dele se encontram as enzimas necessárias à replicação viral: transcriptase reversa (RT), integrase (INT) e protease (PR), assim como o genoma viral composto por duas cópias lineares de RNA.

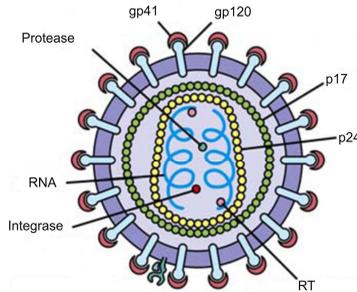


Figura 1. Representação esquemática do HIV-1, evidenciando sua organização estrutural.

O genoma do HIV-1 possui aproximadamente 10 mil nucleotídeos, sendo composto por nove genes flanqueados por regiões LTR (*long terminal repeat*) (Figura 2) (SLEASMAN; GOODENOW, 2003). Estas regiões terminais não codificam nenhuma proteína, mas são importantes na regulação da expressão gênica viral e conectam o genoma do vírus ao DNA da célula hospedeira durante o processo de integração. Os três principais genes virais *gag*, *pol* e *env*, estão presentes em todos os retrovírus e codificam respectivamente as proteínas do capsídeo, as enzimas virais e as proteínas presentes no envelope.

Os outros seis genes são considerados acessórios e são denominados *vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* e *nef*. Os genes *tat* e *rev* são expressos no início da replicação viral (genes imediatos) e suas respectivas proteínas ligam-se a regiões reguladoras no gene *env* e na região LTR, estimulando a transcrição do DNA proviral, transporte do RNAm para o citoplasma e tradução do mesmo em proteínas estruturais e enzimas essenciais para a infecção de novas células (MILLER; SARVER, 1997). A proteína Vif participa da evasão de mecanismos de resposta imune inata e também estimula a transcrição do DNA proviral. O gene *vpr* tem papel na replicação do HIV-1 em macrófagos através da ligação de sua proteína na região LTR, promovendo fortemente a

transcrição do genoma viral (CULLEN, 1998). O gene *vpu* está envolvido com o brotamento das partículas do vírus e o gene *nef* está envolvido com vários mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, uma vez que a proteína Nef inibe a expressão de moléculas MHC-1 e CD4 na superfície da célula infectada, impedindo o sistema imune de detectar a infecção viral (COLLINS et al., 1998; PETER, 1998).



Figura 2. Representação esquemática do genoma do HIV-1. Os retângulos coloridos representam os nove genes virais.

A interação inicial entre HIV e células do hospedeiro ocorre pela interação entre gp120 viral e a molécula da membrana celular denominada CD4. Esta molécula é encontrada na superfície de células como linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e da microglia (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007). A proteína gp120 do envelope viral é capaz de ligar-se ao CD4 e iniciar o processo de infecção. Após esta ligação, ocorre interação entre sítios da gp120 com um co-receptor de quimiocinas, CCR5 ou CXCR4, sendo que a escolha de um destes co-receptores vai depender da célula alvo, da cepa viral infectante e do estágio da doença. A ligação da gp120 com a molécula de CD4 e subsequentemente com o co-receptor de quimiocinas leva a mudanças conformacionais da gp120 e consequentemente à dissociação da gp41. Finalmente, sequências peptídicas hidrofóbicas da gp41 promovem a fusão entre a membrana da célula e o envelope viral (QADIR; MALIK, 2010).

Uma vez livre na célula, o capsídeo viral libera o material genético do vírus e as enzimas que ele carrega consigo (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007). A transcriptase reversa (RT) sintetiza DNA através do RNA viral utilizando nucleotídeos da célula hospedeira. O DNA viral então é transportado ao núcleo onde a enzima viral integrase liga-o covalentemente ao genoma da célula hospedeira, tornando-se assim um provírus. Sob a forma de um componente integral do genoma da célula hospedeira, o DNA proviral é transcrito utilizando a maquinaria celular. Como já citado, primeiro são expressos os genes imediatos *tat* e *rev*, cujas proteínas possuem efeitos regulatórios

essenciais sobre a transcrição dos outros genes. Então uma longa molécula de RNAm policistrônico é sintetizada, processada e traduzida. A partir do gene *env* é traduzida uma proteína de 160 kD que é clivada pela protease viral e origina as proteínas gp120 e gp41 do envelope viral, estas, assim que traduzidas são transportadas a membrana celular. O gene *pol* codifica as enzimas RT, protease e integrase, enquanto o gene *gag* é responsável pelas proteínas p17 e p24, respectivamente matriz e capsídeo viral, e p6, uma proteína protetora do genoma viral. Com o auxílio de proteínas acessórias a partícula viral é montada contendo duas cópias de RNA viral e as três enzimas virais (GANSER-PORNILLOS et al., 2008). Ao brotar da célula ocorre a formação do envelope viral, no qual estarão expressas as proteínas gp120 e gp41 O processo de maturação do HIV ocorre nos instantes iniciais após o brotamento. A enzima protease age na partícula viral recém formada, clivando as proteínas do capsídeo e dando a ele uma forma cônica. Com o capsídeo em sua conformação final a partícula do HIV torna-se infecciosa.

As primeiras células infectadas pelo vírus geralmente são células dendríticas (WU; KEWALRAMANI, 2006). Estas células são encontradas em vários tecidos humanos, entre eles o trato genital e mucosa anal, principal via de infecção do HIV. Desta forma, as células dendríticas conduzem o vírus aos linfonodos onde ocorre a infecção de linfócitos T CD4, principal alvo do HIV. Tecidos linfóides são o ambiente perfeito para o vírus infectar novas células e replicar-se rapidamente. Nesses tecidos há grande concentração de células T CD4 e abundante produção de citocinas pró-inflamatórias, o que leva a ativação de linfócitos infectados e consequentemente a replicação do vírus. Citocinas como IL-1 e TNF- α são capazes de estimular a replicação viral através da ativação de mensageiros secundários que se ligam à região LTR do HIV (PETERLIN; TRONO, 2003). A presença do provírus no genoma de células T em linfonodos é até 10 vezes mais freqüente do que em células mononucleares no sangue, tornando estes tecidos os principais reservatórios virais e o local de maior destruição de linfócitos T CD4 (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007).

A patologia causada pelo HIV pode ser dividida em três fases: a fase aguda, que ocorre logo após a infecção, a fase de latência ou crônica e a fase de AIDS (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007). Durante a fase aguda da infecção, podem surgir alguns sintomas como febre e linfadenopatia devido aos altos níveis de replicação viral. Nesta fase da infecção não há resposta imune adaptativa e a carga viral

plasmática frequentemente é superior a 10^7 partículas/mm³ de sangue. Após algumas semanas, a resposta imune mediada por linfócitos T citotóxicos HIV-específicos controla a viremia e a carga viral se estabiliza em valores menores. Ocorre também a soroconversão devido à produção de anticorpos. A resposta imune é capaz de conter momentaneamente o vírus e o número de células T CD4 circulantes aumenta consideravelmente, porém nunca voltam aos valores prévios à infecção (MELLORS et al., 1995). Fatores genéticos do hospedeiro e da cepa do HIV podem influenciar os níveis de replicação viral na infecção aguda, fazendo com que o patamar de partículas virais circulantes seja bem variável. Este fato é determinante para se estimar a velocidade com que a infecção evoluirá e quão rápido os sinais clínicos da doença surgirão. Por definição, a infecção aguda estende-se do período de exposição ao HIV até o desenvolvimento da resposta imune humoral. Esta etapa também pode ser chamada de janela imunológica devido à ausência de anticorpos contra HIV e a impossibilidade de diagnóstico da infecção por testes sorológicos.

Após a infecção aguda, um período de equilíbrio entre replicação viral e resposta imune do hospedeiro é atingido. Esta fase pode durar por muitos anos sem haver manifestações clínicas da doença, sendo denominada fase de latência. Porém, mesmo aparentemente saudáveis, os indivíduos infectados produzem uma grande quantidade de vírus e a perda de células T CD4 ocorre tanto pela lise devido à replicação e brotamento de partículas virais quanto pela destruição por linfócitos T CD8 e apoptose das células infectadas (POPE; HAASE, 2003).

O final da fase de latência ocorre quando a imunossupressão é muito acentuada e o sistema imunológico não é mais capaz de proteger o indivíduo soropositivo de infecções por patógenos oportunistas. Quando o paciente soropositivo tiver alguma infecção por um patógeno oportunista característico ou a contagem de linfócitos T CD4 for abaixo de 200 células/mm³ de sangue ele é caracterizado como portador de AIDS. Doenças como pneumonias causadas por *Pneumocystis carinii*, infecções na orofaringe por *Candida spp.*, tuberculose pulmonar e extrapulmonar causadas por micobactérias e infecções virais por herpes simplex e citomegalovírus são comuns na fase de AIDS e indicadores de imunossupressão acentuada. Outros sinais como febre, perda de peso, sudorese noturna e diarreia também surgem quando a infecção já está bem avançada. Os indivíduos com AIDS podem eventualmente ser acometidos por tumores malignos (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007).

1.2 EPIDEMIOLOGIA DE HIV/AIDS

A epidemia causada pelo HIV parece ter se estabilizado nos últimos anos. O número anual de novas infecções no mundo baixou de 3,2 milhões em 1997, quando a incidência de novos casos alcançou seu ápice, para 2,6 milhões em 2009, representando uma queda de mais de 21% (WHO, 2010). Nos últimos anos o número de mortes relacionadas à AIDS também vem decaindo, passando do auge em 2004, quando se estimou cerca de 2,1 milhões de mortes, para 1,8 milhões em 2009. Este declínio é explicado tanto pela queda da incidência de novos casos a partir de 1997, quanto pela crescente disponibilidade de acesso ao tratamento antiretroviral.

Existe uma grande discrepância na distribuição geográfica das pessoas vivendo com HIV/AIDS. A África sub-saariana contém 68% de todos os casos da infecção pelo vírus no mundo, sendo que a prevalência de indivíduos infectados em alguns países africanos pode chegar a mais de 25% (WHO, 2010). Além disso, 90% das crianças soropositivas no mundo vivem na África sub-saariana. Apesar de não possuírem a magnitude da epidemia na África, outros continentes também apresentam números preocupantes. São quase 5 milhões de infectados na Ásia, 1,4 milhões na América Latina, 1,5 milhões na América do Norte e 1,4 milhões no Leste Europeu. Apenas Estados Unidos e Rússia possuem respectivamente 1,2 milhões e 1 milhão de pessoas vivendo com HIV (WHO, 2010).

1.2.1 A Epidemia de HIV/AIDS no Brasil

De 1980 até Junho de 2009 o número de casos acumulados de infecções pelo HIV no Brasil foi de 544.866, entretanto estimativas apontam para 630 mil pessoas vivendo com o vírus no país (COORDENAÇÃO DE DST E AIDS, 2010). A prevalência é de 0,61% entre pessoas na faixa etária de 15 a 49 anos, sendo que em mulheres desta faixa etária a prevalência é de 0,41%, enquanto que em homens é de 0,82%. A razão de casos de AIDS entre homens e mulheres, que era de 15:1 em 1986, passou para 1,5:1 em 2009, demonstrando uma tendência de equilíbrio entre os sexos. O total de óbitos acumulados desde o primeiro caso da doença até o final do ano de 2008 soma 217.091 mortes. A taxa de incidência de novos casos da doença no Brasil encontra-se estável desde o ano de 2002, sendo que em 2008 foram registrados 18,2 novos casos por 100 mil habitantes

(COORDENAÇÃO DE DST E AIDS, 2010). A região Sudeste sustenta uma trajetória de queda no número de novos casos de AIDS desde o ano de 2003, enquanto na região Sul o número de novos casos voltou a crescer a partir de 2006, apresentando em 2008 a maior taxa de incidência do país, 29,3 novos casos por 100 mil hab.

A principal via de transmissão do HIV no Brasil é a relação heterossexual desprotegida (COORDENAÇÃO DE DST E AIDS, 2010). Desde 1996 este é o principal método de contágio entre homens acima de 13 anos de idade e no ano de 2009 representou 47,6% dos casos de infecção pelo HIV entre homens. A categoria de exposição classificada como homens que fazem sexo com homens (HSH) representou 26,3% das infecções por HIV em 2009. Infecções através do compartilhamento de seringas e agulhas por usuários de drogas injetáveis também teve sua prevalência reduzida com o passar dos anos no Brasil. Até 1997 22,6% dos casos de AIDS eram consequência desta forma de contágio entre homens e 19,5% entre mulheres. No ano de 2009 estes números passaram para 6,7% em homens e 2,4% em mulheres. No sexo feminino a via heterossexual é responsável por 97% das infecções.

O estado de Santa Catarina (SC) possui aproximadamente 6 milhões de habitantes e desde 1984, quando se registrou o primeiro caso de AIDS no estado, 26.057 casos da doença já foram notificados (SECRETARIA DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, 2009). Em 2008 a incidência foi de 29,6 casos por grupo de 100 mil habitantes, uma das maiores entre os estados brasileiros. Desde 2002 o número anual de novos casos se estabilizou e começou a apresentar leve queda. Os municípios com maiores números de casos da doença são Florianópolis, Joinville, Itajaí, Blumenau e São José, sendo que Florianópolis possui a segunda maior incidência de casos de AIDS dentre todas as capitais brasileiras (COORDENAÇÃO DE DST E AIDS, 2010). Santa Catarina apresentou 1,3 homens para cada mulher diagnosticada com AIDS no ano de 2008. A via de transmissão predominante é a relação heterossexual desprotegida (75%), seguida pela categoria HSH (12%) e UDI (7%). Transmissão vertical ou por transfusão de hemoderivados representou 1% das infecções enquanto 4% eram de forma ignorada (SECRETARIA DA SAÚDE DE SANTA CATARINA, 2009).

1.2.2 Epidemiologia molecular do HIV

O genoma do HIV possui uma grande variabilidade genética devido à imprecisão da enzima RT e a eventos de recombinação gênica. A etapa de transcrição reversa do RNA viral, feita pela RT, pode gerar

de 1-10 mutações por genoma (RAMBAUT et al., 2004). A rápida taxa evolutiva do HIV faz com que o sistema imune seja incapaz de combater tantas variantes virais, torna o desenvolvimento de vacinas um desafio e permite o vírus tornar-se resistente aos fármacos antiretrovirais. Porém, esta característica mutante do genoma do HIV permitiu que suas origens fossem traçadas com muita precisão. A história evolutiva do HIV-1 e HIV-2 foi reconstruída com muitos detalhes a partir de análises filogenéticas.

A descoberta do vírus da imunodeficiência símia (SIV) permitiu aos pesquisadores entenderem as origens do HIV. Ambos são lentivirus, sendo o SIV encontrado em mais de 20 espécies de primatas africanos (SANTIAGO et al., 2002) É possível que o HIV-1 tenha-se originado do SIV presente em chimpanzés - *Pan troglodytes* - que habitam o oeste e centro da África (GAO et al., 1999). Nesta região é comum a caça destes macacos para o consumo da carne e este pode ter sido o processo desencadeador das primeiras infecções, sendo os grupos M, N, O e P do HIV-1 originados de diferentes eventos de transmissão entre primata e homem. Por sua vez, o HIV-2 é filogeneticamente mais próximo ao SIV de macacos *Cercocebus atys*, uma espécie de primatas presentes apenas na África ocidental, região onde as infecções pelo HIV-2 estão concentradas (GAO et al., 1992; HAHN et al., 2000).

O grupo M do HIV-1 é responsável por mais de 90% das infecções no mundo (SPIRA et al., 2003). Este grupo é dividido nos subtipos A, B, C, D, F, G, H, J e K que são classificados conforme a similaridade de seus genomas. Pode haver uma divergência de 20-30% entre as bases do gene *env*, a região mais variável do genoma do HIV, entre os diferentes subtipos do grupo M. Além disto, ainda existem formas recombinantes entre os subtipos virais. A recombinação é um fenômeno que ocorre quando há co-infecção de um indivíduo com duas ou mais cepas virais, podendo levar à permuta de material genético entre elas resultando num vírus com genoma recombinante. Devido à grande variabilidade do genoma do HIV, tanto pela alta taxa de erros da RT quanto pelo processo de recombinação, a epidemia do HIV é muito complexa e apresenta por vezes um caráter regional (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007).

O subtipo B é predominante na Europa, Américas e Austrália (SPIRA et al., 2003; MCCUTCHAN, 2006). Por ser o grande responsável pela epidemia nos países ricos, este é o subtipo viral mais estudado e muitas das inovações tecnológicas que visam o combate ao HIV são

desenvolvidas e testadas contra o subtipo B. Porém os subtipos A e C são responsáveis pela maior parte das infecções, uma vez que apenas na África correspondem a mais de 80% dos infectados. O subtipo C é predominantemente encontrado no sul e leste da África e Índia, enquanto que o subtipo A é encontrado no oeste do continente africano. É importante ressaltar ainda que nos países desenvolvidos mais de 40% das infecções recentes são de subtipos não B, provavelmente resultado do aumento dos movimentos migratórios.

No Brasil o subtipo B é o predominante, seguido pelo subtipo F1, formas recombinantes BF1, subtipo C e formas recombinantes BC (TEIXEIRA et al., 2004; SA FILHO et al., 2005; PEDROSO et al., 2007; GADELHA et al., 2003; CARDOSO et al., 2009; MACHADO et al., 2009). Nas regiões sudeste, norte, nordeste e centro-oeste do país o subtipo B é responsável por 70-90% das infecções. Nestas mesmas regiões os subtipos F1 e recombinantes BF1 apresentam prevalências variando de 3-17% e 2-14%, respectivamente, enquanto que a frequência de subtipo C registrada na maioria dos estudos é de no máximo 3%. Na região sul do Brasil, o cenário epidemiológico é bastante diferente do restante do país. Estudos têm descrito a presença de subtipo C em 27-42% das infecções no estado do Rio Grande do Sul, 48-79% em Santa Catarina e 20-30% no Paraná (SANTOS et al., 2007; BRIGIDO et al., 2007; LOCATELI et al., 2007; RODRIGUES et al., 2006; RODRIGUES et al., 2010; FERREIRA et al., 2008; TOLEDO et al., 2010). A cepa mosaico CRF31_BC, uma forma recombinante entre os subtipos C e B no gene *pol*, é encontrada unicamente no sul do Brasil. Sua frequência é de até 26% no estado do Rio Grande do Sul, podendo ser encontrada em frequências menores em Santa Catarina e Paraná (RODRIGUES et al., 2006; BRIGIDO et al., 2007; TOLEDO et al., 2010).

1.3 TERAPIA ANTIRETROVIRAL

O primeiro medicamento antiretroviral (ARV) a ser utilizado no tratamento de pessoas com HIV foi a zivudina (AZT) no ano de 1987 (MITSUYA et al., 1988). Entretanto, o tratamento monoterápico com AZT não obteve resultados duráveis e durante quase 10 anos que sucederam sua descoberta, nenhuma inovação surgiu no campo da terapia antiretroviral. Em 1995 dois análogos de nucleosídeos demonstraram resultados melhores que a monoterapia com AZT e o uso destes foi recomendado imediatamente (HAMMER et al., 1996). No final do mesmo ano começaram a ser testados três inibidores da protease (PI) do HIV,

sendo aprovados para utilização quase que imediatamente (CAMERON et al., 1998). Em 1996, surgiu o primeiro inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa (NNRTI).

A partir destas descobertas, o número de indivíduos em tratamento subiu de 2% para 64% em um período de três anos na Europa, resultando em uma queda acentuada da incidência de AIDS entre os indivíduos soropositivos (KIRK et al., 1998). Porém o surgimento de efeitos colaterais alertou sobre os perigos da terapia antiretroviral. Muitos pacientes começaram a apresentar lipodistrofia, principalmente no rosto e nas costas. O risco de desenvolver diabetes e toxicidade mitocondrial também foram relatados como conseqüências do tratamento. Finalmente estudos com as células reservatórios do vírus mostraram que o tratamento com os medicamentos disponíveis até então não era capaz de erradicar o HIV do organismo, evidenciando a necessidade da busca por novas terapias (SILICIANO et al., 2003).

No início do século XXI, uma nova gama de medicamentos focando diferentes fases do ciclo viral começaram a ter sua eficácia avaliada. O inibidor de fusão chamado T20 foi o primeiro fármaco licenciado capaz de impedir a entrada do vírus na célula (LAZZARIN et al., 2003). Antes disso, todos os fármacos focavam sua ação na fase de replicação e maturação do HIV. Poucos anos depois, em 2007, foi autorizada a utilização do maraviroc, outro fármaco capaz de combater a entrada do HIV na célula, porém com mecanismo de ação distinto do T20 (LIEBERMAN-BLUM et al., 2008). No mesmo ano raltegravir, primeiro medicamento inibidor da enzima integrase, teve seu uso aprovado (MARCHAND et al., 2009). Tornou-se possível combater o HIV em vários momentos de seu ciclo, seja inibindo a ação de qualquer uma de suas três enzimas, ou impedindo sua entrada na célula alvo. Atualmente existem 25 medicamentos aprovados para uso na terapia antiretroviral altamente ativa (HAART), sendo estes divididos em seis classes (BRODER, 2010):

- Inibidores da RT nucleosídicos (NRTI): agem como falso substrato para a enzima RT, competindo com os nucleotídeos da célula infectada e impedindo a síntese de DNA ao serem adicionados;
- Inibidores da RT não-nucleosídicos (NNRTI): ligam-se à enzima RT próximo ao sítio catalítico que adiciona nucleotídeos à fita de DNA crescente,

resultando na diminuição significativa da velocidade de polimerização do DNA;

- Inibidores da protease (PI): ligam-se à protease e inibem sua ação, impedindo a formação das proteínas do capsídeo e enzimas do HIV;
- Inibidores de fusão: agem ligando-se a sequências peptídicas hidrofóbicas da gp41 responsáveis pela fusão do envelope viral à célula, impedindo a entrada do HIV;
- Inibidores de entrada: são moléculas sintéticas com efeito antagonista ao receptor de quimiocina CCR5, impedindo a interação da gp120 viral com seu co-receptor;
- Inibidores da integrase (INTI): são moléculas que se ligam à enzima integrase, impedindo o processo de integração do genoma viral no DNA da célula hospedeira.

Apesar das opções disponíveis para tratamento, a necessidade de avanços tecnológicos no campo da terapia antiretroviral é constante. Além dos graves problemas com efeitos colaterais que exigem a descoberta de medicamentos menos tóxicos ao organismo, a seleção de variantes do HIV resistentes aos medicamentos antiretrovirais é um grande obstáculo a ser vencido em busca da supressão completa do vírus. Mutações que conferem resistência (DRM) são selecionadas sob a forte pressão seletiva exercida pelos antiretrovirais, fazendo com que cepas resistentes adquiram uma importante vantagem adaptativa sobre a população viral até então prevalente no organismo (HOFFMANN; ROCKSTROH; KAMPS, 2007). Quando isto acontece, a carga viral sobe e é preciso trocar de terapia. Este fenômeno é tão comum que se estima que aproximadamente 70% dos indivíduos em tratamento e com carga viral detectável apresentem vírus com DRM à pelo menos um medicamento utilizado (SCOTT et al., 2004). Existem dois tipos de mutações relacionadas à resistência a fármacos: as mutações primárias são selecionadas inicialmente e levam a mudanças perceptíveis na susceptibilidade do vírus a um medicamento específico, enquanto que as mutações secundárias apenas auxiliam e complementam o efeito de mutações primárias. Mutações secundárias quando ocorrem sozinhas não levam a mudanças consideráveis na susceptibilidade aos ARV (LITTLE, 2000).

A falta de adesão ao tratamento é um fato que favorece o surgimento e dispersão de cepas virais resistentes. O fenômeno de resistência primária ocorre quando um indivíduo nunca antes exposto a antiretrovirais é infectado por cepas resistentes, podendo apresentar falhas terapêuticas no momento em que for necessário iniciar a terapia. Pesquisas com indivíduos soropositivos recém-infectados mostram taxas de resistência primária superiores a 22,7% nos Estados Unidos (LITTLE et al., 2002) e 14,2% na Inglaterra (CANE et al., 2005). No Brasil o acesso universal ao tratamento antiretroviral gera uma grande preocupação com relação à seleção e transmissão de cepas resistentes entre indivíduos infectados. Apesar disto, estudos demonstraram prevalência entre 7-8% de DRM em pacientes virgens de tratamento, números consideravelmente menores que os encontrados em países desenvolvidos (SPRINZ et al., 2009; INOCENCIO et al., 2009). Contudo, alguns estudos em grandes cidades portuárias brasileiras apresentaram prevalências de DRM variando de 14-36% (PEDROSO et al., 2007; PIRES et al., 2004; SUCUPIRA et al., 2007) Em Santa Catarina poucas informações sobre o padrão de resistência do HIV circulante estão disponíveis. Em um estudo realizado com indivíduos virgens de tratamento foi demonstrado que nas cidades de Itajaí e Camboriú 8,3% dos pacientes apresentavam pelo menos uma mutação de resistência (BRIGIDO et al., 2007).

O estado de Santa Catarina apresenta um cenário muito peculiar no tocante à epidemiologia molecular do HIV, uma vez que apresenta uma das maiores prevalências de subtipo C encontradas no Brasil. A cidade de Florianópolis possui o maior número de indivíduos infectados pelo HIV no estado e uma das maiores incidências de casos do país e ainda assim as características moleculares do vírus nesta região são pouco conhecidas. Em vista disso, estudos que visem descrever subtipos virais, formas recombinantes e mutações de resistência circulantes na região da grande Florianópolis fazem-se necessários. Este tipo de conhecimento pode auxiliar no monitoramento de transmissão de cepas virais resistentes ao tratamento, estabelecer políticas de saúde pública e possibilitar o desenvolvimento de novos tratamentos e testes vacinais, quando os mesmos estiverem disponíveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a diversidade do HIV-1 circulante na região metropolitana de Florianópolis – SC e estimar a frequência de mutações que conferem resistência primária a antiretrovirais na população de indivíduos soropositivos não submetidos a tratamento nesta região.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar os subtipos de HIV-1 circulantes na região metropolitana de Florianópolis;
- b) Estimar a frequência e descrever a diversidade das mutações do HIV-1 que conferem resistência aos medicamentos antiretrovirais em pacientes virgens de tratamento na região metropolitana de Florianópolis;
- c) Avaliar as associações entre subtipos virais, formas de transmissão e prevalência das mutações de resistência do HIV-1;
- d) Gerar informações que possam auxiliar na escolha da terapia antiretroviral dos pacientes residentes na região metropolitana de Florianópolis.

3 PACIENTES, MATERIAIS & MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS: Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (projeto n° 160-2007). Os pacientes foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa e os que demonstraram interesse em participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1).

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO: Foram selecionados 100 indivíduos soropositivos da região metropolitana de Florianópolis/SC que realizavam acompanhamento clínico no Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes e no Centro de Vigilância em Saúde, ambos localizados na cidade de São José/SC. Foram selecionados apenas pacientes maiores de 18 anos, com sorologia positiva para HIV-1, sem exposição prévia a antiretrovirais e sem sinais ou sintomas de AIDS. A partir do prontuário médico de cada paciente, foram obtidas informações tais como sexo, idade, data do primeiro diagnóstico, forma de contágio, contagem de linfócitos TCD4 e TCD8 e carga viral.

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS: Foram coletados 4 ml de sangue periférico sendo a coleta realizada em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como anticoagulante. A partir desta amostra de sangue foram separados plasma e células sanguíneas mononucleares (PBMC) através da técnica de gradiente de densidade com Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich). Em um tubo de fundo cônico contendo 2 ml de Ficoll foi despejado cuidadosamente 4 ml de sangue, sendo então centrifugadas a 400 x g por 15 minutos à temperatura ambiente. A fase contendo PBMC foi coletada e transferida para um novo tubo contendo tampão fosfato salino (PBS) (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7,4) e submetida a dois ciclos de centrifugação a 400 x g por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo o sedimento congelado a -20° C.

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL: O DNA total das PBMC foi extraído com o kit *QIAmpl Blood* (Qiagen Inc.) segundo protocolo fornecido pelo fabricante. Inicialmente adicionou-se protease e tampão de lise ao tubo contendo o precipitado de PBMC, sendo em seguida incubadas por 10 min a 56°C. Após a lise das amostras, etanol absoluto

foi adicionado ao tubo e todo o conteúdo foi transferido para uma coluna com um filtro de sílica acoplado a um tubo coletor. A coluna foi centrifugada a 6000 x g por 1 minuto à temperatura ambiente. Foram efetuadas duas lavagens do filtro de sílica através da adição de tampão de lavagem e centrifugação a 6000 x g por 1 min à temperatura ambiente. Por fim, o DNA retido no filtro de sílica foi eluído com tampão de eluição em incubação por 3 min à temperatura ambiente e coletado em um microtubo, após centrifugação por 6000 x g por 1 min à temperatura ambiente. O microtubo contendo o DNA foi armazenado a -20°C.

3.5 REAÇÃO DE PCR: O DNA pró-viral foi amplificado através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com dois momentos de amplificação (*nested* PCR). Foram utilizados iniciadores específicos conforme descrito por estudos anteriores (DELWART et al., 1995; BELLO et al., 2008) e cujas sequências encontram-se no anexo 2. Três regiões de interesse do genoma pró-viral do HIV-1 foram amplificadas:

- Gene do envelope (*env*): foi amplificada uma região de 611 pares de bases (pb) correspondente a região C2-V3 da proteína gp120;
- Gene da polimerase (*pol*):
 - a) Uma região de 1270 pares de bases correspondente ao gene completo da enzima protease (PR) e parte da transcriptase reversa (RT);
 - b) Uma região de 866 pares de bases correspondente à enzima integrase (INT);

Para as reações de *nested* PCR, tanto primeira quanto segunda amplificação, foram utilizados 0,25 μ M de iniciadores, 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (LGC Biotecnologia), 0,25 mM de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (Invitrogen), 5 mM de $MgCl_2$, 0,25 mM de Tampão de reação (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM, pH 8,5) e 0,1 a 2,0 μ g de DNA molde, num volume final de reação de 20 μ l. A reação de amplificação foi feita no termociclador *Mastercycler Gradient*[®] (Eppendorf) nas seguintes condições térmicas: 1 ciclo de 97°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min; 32 ciclos de 95°C por 45 seg, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min; uma etapa final de extensão a 72°C por 10 min. Para a segunda amplificação foram transferidos 2 μ l do material amplificado na primeira reação para uma nova reação onde substituiu-se os iniciadores externos pelos iniciadores internos.

Após o *nested* PCR, o produto da reação de amplificação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM). Após a diluição das amostras do DNA extraído em tampão de aplicação (xilenocianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25% e ficoll 15%), as amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese por aproximadamente 40 minutos a 100V (60 mA) em TBE. Após a eletroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídeo 0,01% e revelado por exposição à luz UV em um transiluminador MacroVue UV20[®] (Hoefler), sendo os resultados documentados de forma digital. O produto do PCR foi então purificado utilizando-se o *kit* comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme instruções do fabricante.

3.6 SEQUENCIAMENTO DAS REGIÕES AMPLIFICADAS: O sequenciamento das regiões genômicas do HIV-1 amplificadas por *nested* PCR foi realizado no equipamento *MegaBace 1000[®] DNA Analysis System* (GE/Amershan Biosciences), utilizando-se o *kit DYEnamic[®] ET Dye Terminator* (GE/Amershan Biosciences). Utilizou-se entre 50 a 200 ng do produto de *nested* PCR como DNA molde, 5,0 pmol de iniciador específico (ver anexo 3), 3,2 µl de *DYEnamic[®] ET terminator reagent premix*, no volume final de 10 µl em microplacas próprias de 96 cavidades. As condições empregadas na amplificação da reação de sequenciamento foram: 95°C por 25 seg de desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg, 55°C por 30 seg e extensão a 60°C por 120 seg.

Após a reação de sequenciamento realizou-se a purificação dos produtos gerados na reação de sequenciamento. Para tanto, adicionou-se a cada orifício da placa isopropanol 70% e centrifugou-se a 9.000 x g por 45 min à temperatura ambiente. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com etanol 70%, seguindo-se nova centrifugação a 9.000 x g por 15 min a temperatura ambiente. A placa foi mantida em estufa a 37°C por 15 min para evaporação de resíduos de etanol, sendo as amostras foram diluídas em tampão de aplicação contendo 70% formamida e EDTA 1mM. As amostras foram eletroinjetadas a 2 KV por 120 seg e eletroeluídas a 9 KV por 1-2 horas. Após eletroforese as sequências geradas foram associadas em *contigs* utilizando-se o programa *SeqMan*, pertencente ao pacote de programas *LaserGene* (DNASTAR). Os *contigs* gerados foram visualmente analisados para garantia da qualidade da sequência nucleotídica. Para as sequências

destinadas às análises filogenéticas posteriores foram desconsideradas todas as ambigüidades de nucleotídeos, na ocorrência de uma ambigüidade foi considerado apenas o pico cromatográfico majoritário. Enquanto que nas sequências editadas com destino à análise das mutações de resistência, as ambigüidades foram mantidas.

3.7 ANÁLISES FILOGENÉTICAS: O subtipo das sequências do HIV-1 foi determinado através de análises filogenéticas e de recombinação. As sequências nucleotídicas obtidas no presente estudo, juntamente com sequências de referência (anexo 4) obtidas do banco de dados de *Los Alamos HIV Database* (www.hiv.lanl.gov), foram alinhadas pelo programa CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997). O alinhamento foi posteriormente editado manualmente no sentido de uniformizar o tamanho das sequências para posterior análise filogenética e de recombinação. As regiões analisadas foram: PR/RT (nucleotídeos 2316-3316 correspondentes a HXB2); INT (nucleotídeos 4230-5096 correspondentes a HXB2); *env-gp120/C2V3* (nucleotídeos 6905-7288 correspondentes a HXB2).

As análises filogenéticas foram realizadas pelo método de *Neighbor-joining* (NJ), utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica de Tamura-Nei com 1000 pseudoréplicas (*bootstrap*). Para tanto foi utilizado o programa MEGA v4 (TAMURA; NEI, 1993; TAMURA et al., 2007).

A identificação de sequências recombinantes foi realizada pelo método de *bootscanning* através do programa SIMPLOT 3.5.1 (SALEMI et al., 1995). Para esta análise, foi utilizado o método de NJ com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), uma janela de 250 pb e um passo de 10 pb. Foram realizadas 100 pseudoréplicas para avaliar o suporte dos grupamentos filogenéticos em cada fragmento.

3.8 ANÁLISE DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA: Para determinar a presença de mutações relacionadas à resistência e susceptibilidade a antiretrovirais, sequências relativas às enzimas PR/RT e INT foram submetidas à análise pelo *Stanford HIV Drug Database* (www.stanford.edu). Uma lista de monitoramento epidemiológico da transmissão de resistência entre indivíduos virgens de tratamento, preconizada pela Organização Mundial da Saúde, foi utilizada no presente estudo para auxiliar na análise da prevalência das mutações de

resistência (SHAFER et al., 2007; BENNETT et al., 2009). Polimorfismos e mutações com frequência maior que 0,5% em indivíduos virgens de tratamento não foram consideradas.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICA: O teste Qui-quadrado de aderência foi empregado para avaliação da associação de variáveis categóricas, tais como subtipo do HIV-1, gênero e categorias de exposição dos pacientes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

A partir de 100 indivíduos inicialmente selecionados para o estudo, foram obtidas informações moleculares do HIV-1 de 82 indivíduos. Sendo assim, 18 indivíduos foram excluídos do estudo devido ausência de amplificação do material genômico do HIV-1 ou sequências gênicas geradas de má qualidade. As principais características dos 82 indivíduos incluídos no estudo encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos indivíduos incluídos neste estudo.

Característica	n = 82
Idade média (anos) ± DP	37,8 ± 10
Sexo (%)	
Masculino	40 (48,8%)
Feminino	42 (51,2%)
Média do ano de diagnóstico ± DP	2004 ± 3,8
Categorias de exposição	
Heterossexual	58 (70,6%)
HSH	18 (22%)
UDI	4 (5%)
Desconhecida	2 (2,4%)
Média de contagem de linfócitos TCD4 (cels/mm ³) ± DP	513 ± 312
Média da carga viral (log ₁₀) ±DP	4,1 ± 0,8

DP: desvio padrão; HSH: Homens que fazem sexo com homens;

UDI: usuários de drogas injetáveis

O grupo amostral foi formado por 40 homens e 42 mulheres, sendo a idade média destes indivíduos de 37,8 anos. Em média, os pacientes do presente estudo foram diagnosticados como soropositivos para o HIV-1 em 2004. A principal categoria de exposição da população estudada foi heterossexual (70,6%), seguida pela categoria HSH (22%) e UDI (5%). Dois indivíduos não forneceram tal informação. A média da contagem de linfócitos TCD4 foi de 513 células/mm³ de sangue, com grande variação (± 312 cels/mm³) observada. Em vista de que a população estudada era de indivíduos virgens de tratamento, 23,2% dos

pacientes não possuíam dados de carga viral. A média do logaritmo do número de cópias dos indivíduos que haviam realizado o exame de carga viral foi igual a 4,1.

4.2 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

A análise genética das sequências nucleotídicas do HIV-1 obtidas no presente estudo, revelou a presença dos subtipos B, C e F1, assim como formas recombinantes entre os subtipos encontrados. Cada região genômica foi avaliada separadamente.

Para a região *env-gp120/C2V3* e PR/RT foram obtidas 82 sequências. Análises filogenéticas da região *env-gp120/C2V3* identificaram 64 (78%) sequências subtipo C, 17 (20,8%) sequências subtipo B e uma (1,2%) sequência subtipo F1 (Figura 3).

Análises filogenéticas da região PR/RT identificaram 61 (74,5%) sequências subtipo C, 11 (13,5%) sequências subtipo B e uma (1,2%) sequência subtipo F1 (Figura 4). As outras nove (11,0%) sequências foram classificadas como recombinantes inter-subtipo. A análise de *bootscanning* revelou que três (3,6%) destas sequências (BR10SC39, BR10SC49 e BR10SC93) apresentaram o mesmo padrão de recombinação que as sequências CRF31_BC na região PR/RT (Figura 5), com as quais formam um *cluster* monofilético suportado por um valor de *bootstrap* de 75% (Figura 6), sendo classificadas como CRF31_BC-like. Cinco (6%) das sequências recombinantes foram classificadas como formas recombinantes únicas entre os subtipos B e C (URFs_BC) e uma (1,2%) foi classificada como URF_BF (Figura 8). Dentre as URFs_BC, quatro sequências (BR10SC63, BR10SC101, BR10SC104 e BR10SC142) apresentaram um ponto de recombinação característico da forma recombinante CRF31_BC (próximo à posição 3215, relativo à HXB2) (Figura 8).

Para a região INT foram geradas 81 sequências, não sendo possível obter amplificação do genoma pró-viral da amostra BR10SC08. Análises filogenéticas e de *bootscanning* identificaram 60 (74%) sequências do subtipo C, 11 (13,6%) sequências do subtipo B, oito (10%) sequências URFs_BC, uma (1,2%) sequência do subtipo F1 e uma (1,2%) sequência URF_CF (Figuras 7 e 8). A amostra BR10SC93, cuja sequência da região PR/RT havia sido classificada como CRF31_BC-like, apresentou uma recombinação B/C adicional na região INT, sendo desta forma reclassificada como URF_BC.

Analisando-se conjuntamente as três regiões genômicas sequenciadas neste estudo foram observadas 54 (65,8%) sequências subtipo C, 15 (18,3%) sequências recombinantes BC, 11 (13,4%) sequências subtipo B, uma (1,2%) sequência subtipo F1 e uma (1,2%) sequência recombinante entre os subtipos B, C e F (URF_BCF) (Figura 9).

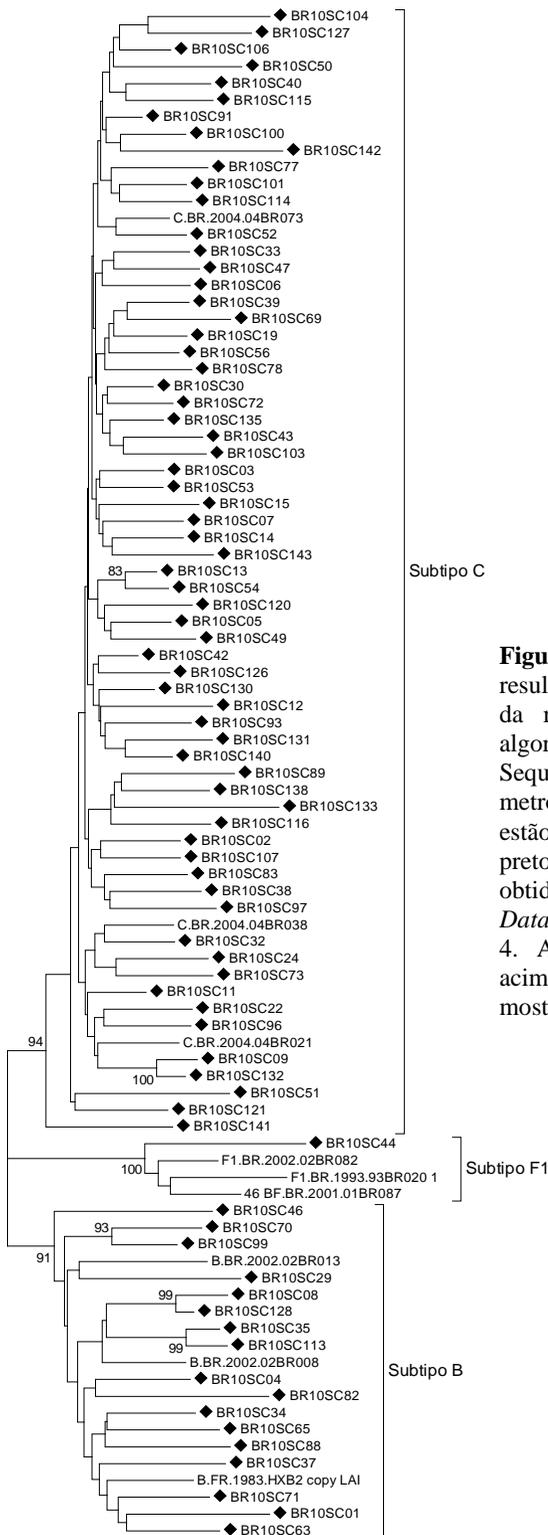


Figura 3. Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região *env-gp120/C2V3* pelo algoritmo de *Neighbor-joining*. Sequências obtidas na região metropolitana de Florianópolis estão marcadas com losangos pretos. Sequências referências obtidas de *Los Alamos HIV Database* estão descritas no anexo 4. Apenas valores de *bootstrap* acima de 70% estão sendo mostrados.

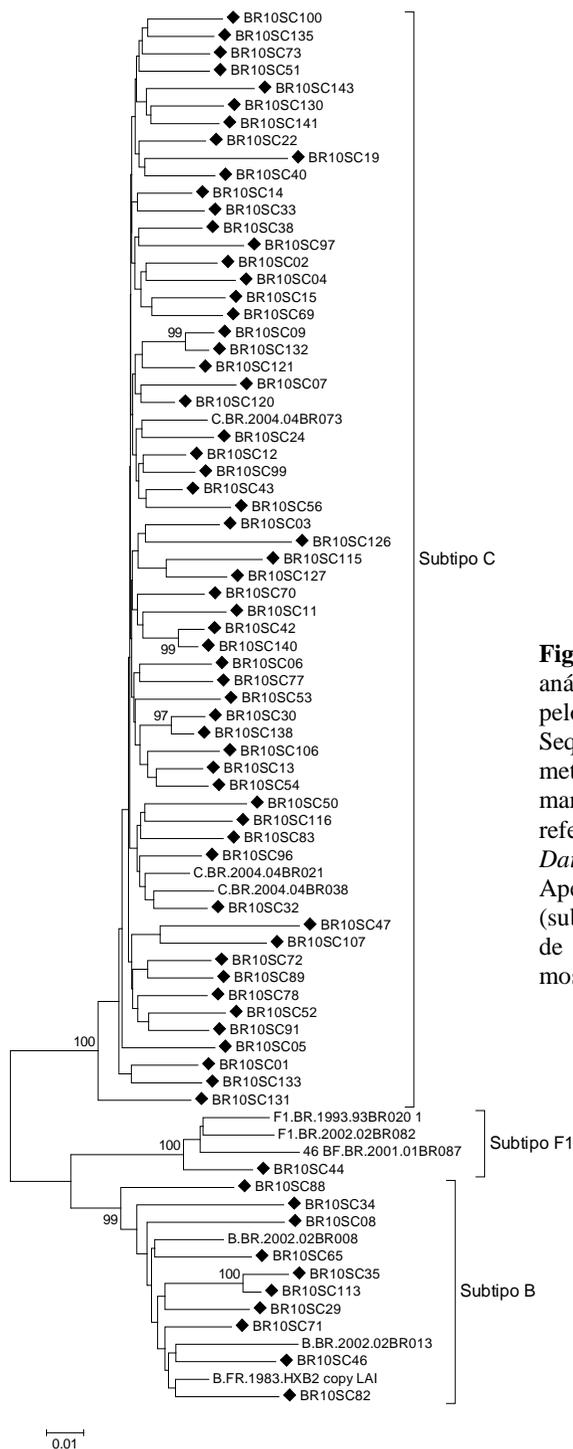


Figura 4. Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região PR/RT pelo algoritmo de *Neighbor-joining*. Sequências obtidas na região metropolitana de Florianópolis estão marcadas com losangos pretos. Sequências referências obtidas de *Los Alamos HIV Database* estão descritas no anexo 4. Apenas sequências não recombinantes (subtipos puros) são apresentadas. Valores de *bootstrap* acima de 70% estão sendo mostrados.

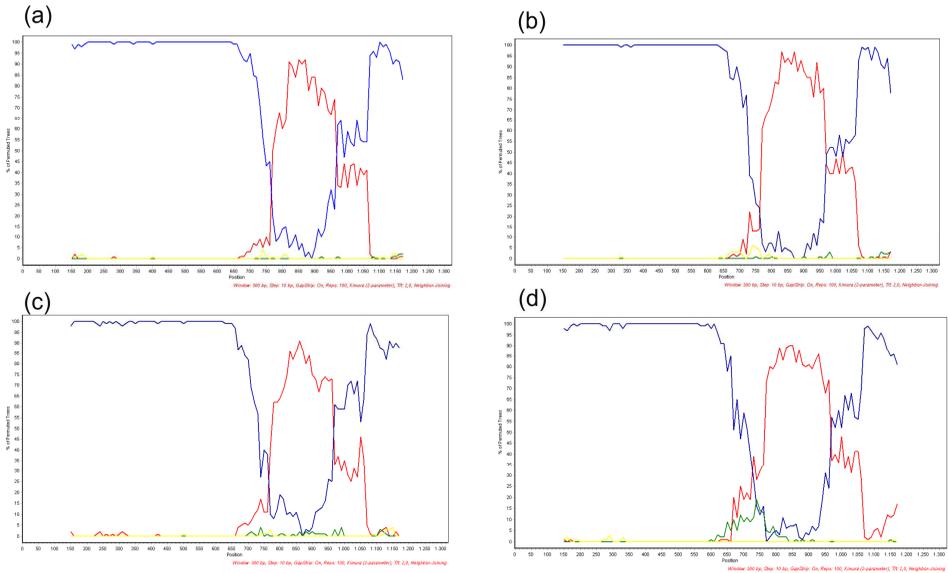


Figura 5. Padrão de recombinação de CRF31_BC na região PR/RT gerada a partir da metodologia de *bootscanning*. A linha azul representa a porção genômica classificada como subtipo C e a linha vermelha representa a porção genômica classificada como subtipo B. (a) Sequência referência 110PA; (b) BR10SC39; (c) BR10SC49; (d) BR10SC93.

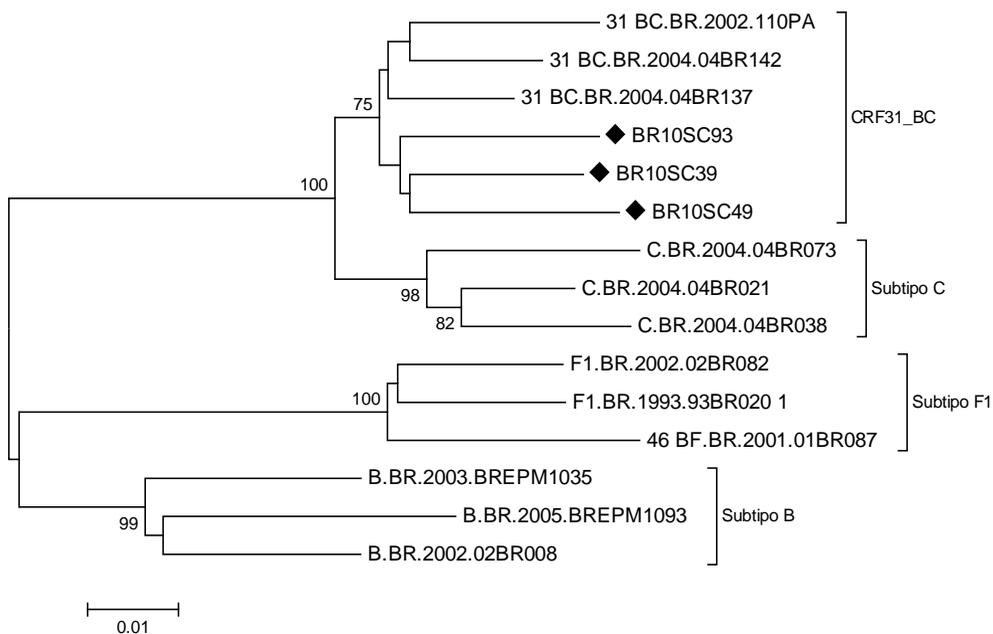


Figura 6. Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região PR/RT de formas recombinantes CRF31_BC pelo algoritmo de *Neighbor-joining*. Sequências obtidas na região metropolitana de Florianópolis estão marcadas com losangos pretos. Sequências referências obtidas de *Los Alamos HIV Database* estão descritas no anexo 4. Apenas valores de *bootstrap* acima de 70% estão sendo mostrados.

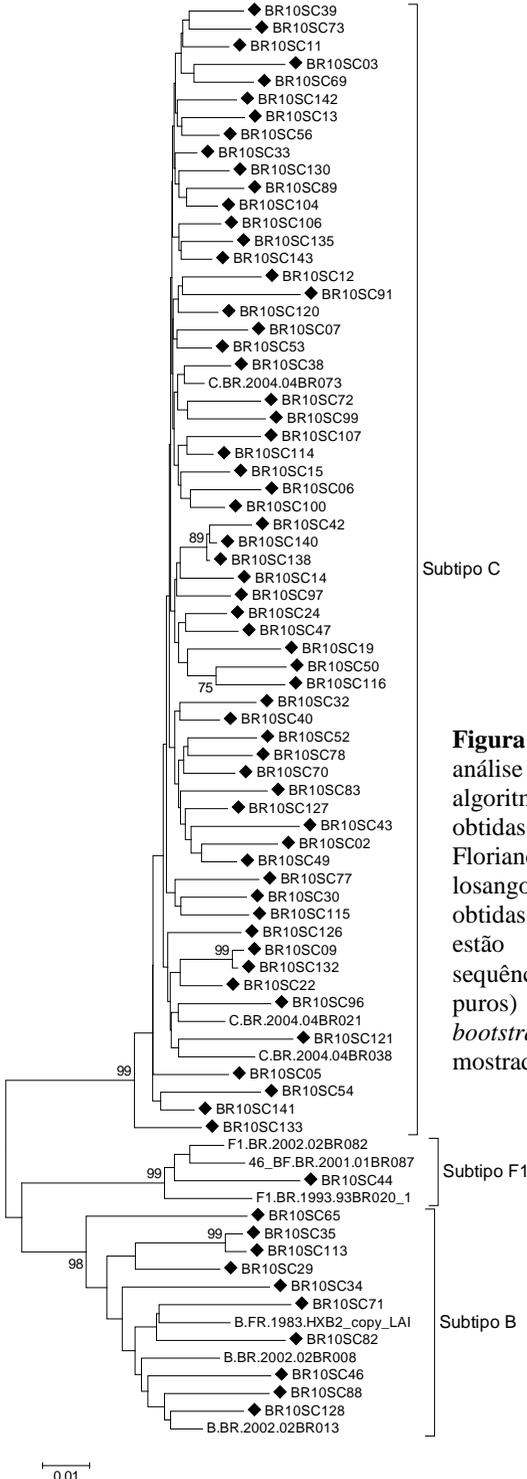
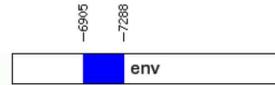
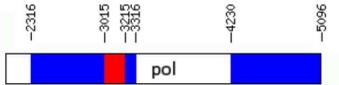
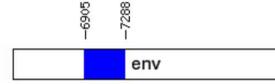
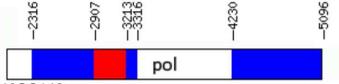


Figura 7. Árvore filogenética resultante da análise das sequências da região INT pelo algoritmo de *Neighbor-joining*. Sequências obtidas na região metropolitana de Florianópolis estão marcadas com losangos pretos. Sequências referências obtidas de *Los Alamos HIV Database* estão descritas no anexo 4. Apenas sequências não recombinantes (subtipos puros) são apresentadas. Valores de *bootstrap* acima de 70% estão sendo mostrados.

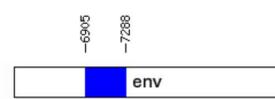
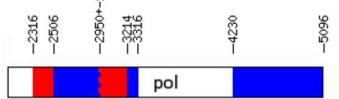
CRF31, BR10SC39, BR10SC49



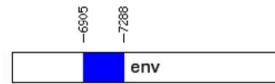
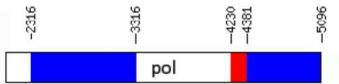
BR10SC104



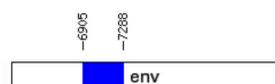
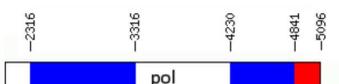
BR10SC142



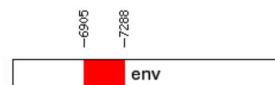
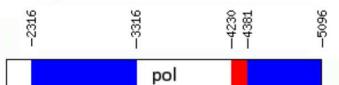
BR10SC51



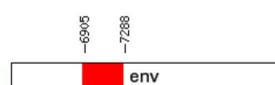
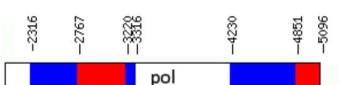
BR10SC131



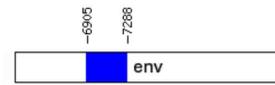
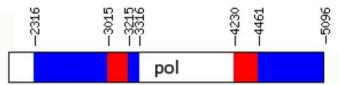
BR10SC01, BR10SC04



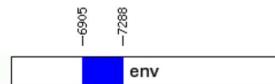
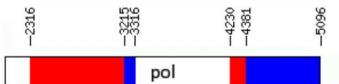
BR10SC63



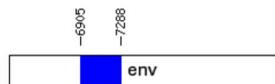
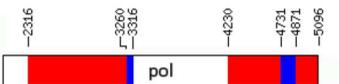
BR10SC93



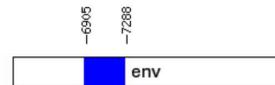
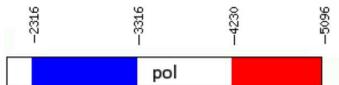
BR10SC101



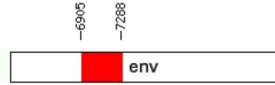
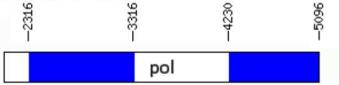
BR10SC103



BR10SC47



BR10SC70, BR10SC99



BR10SC37

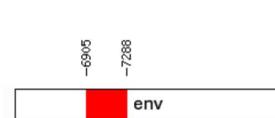
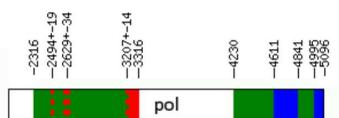


Figura 8. Desenho esquemático mostrando o padrão de recombinação das cepas mosaico identificadas neste estudo. Os pontos de recombinação foram obtidos através da metodologia de *bootscanning* pelo programa Simplot 3.5.1 e numeradas de acordo com a sequência referência HXB2. Apenas os genes *pol* e *env* estão representados e coloridos em azul para o subtipo C, vermelho para o subtipo B e verde para o subtipo F1.

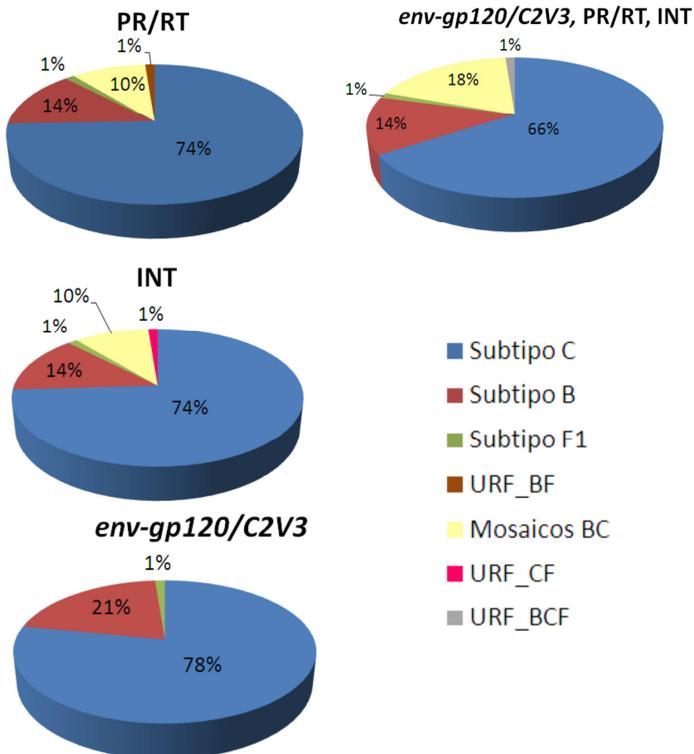


Figura 9. Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 para as regiões *env-gp120/C2V3*, PR/RT e INT isolados de pacientes da região metropolitana de Florianópolis. As porcentagens dos gráficos são valores aproximados.

4.3 RELAÇÃO ENTRE DADOS CLÍNICOS E SUBTIPOS VIRAIS IDENTIFICADOS

Relacionando-se os dados epidemiológicos dos pacientes com as informações moleculares das amostras isoladas foi possível averiguar-se uma associação altamente significativa ($p < 0,05$) entre subtipos C e mosaicos BC e a categoria de exposição heterossexual e o subtipo B e a categoria HSH. Dentre as 54 sequências classificadas como subtipo C, 41 (76%) foram provenientes de amostras de indivíduos heterossexuais (Tabela 2). Já entre as 15 sequências mosaico BC, 12 (80%) foram amplificadas a partir de amostras isoladas de indivíduos heterossexuais. Por outro lado, das 11 amostras subtipo B obtidas, oito (72,7%) haviam sido isoladas de indivíduos do grupo HSH.

Tabela 2. Dados epidemiológicos da população estudada de acordo com os principais subtipos virais e formas recombinantes encontrados no estudo.

	Total (n=82)	Subtipo C (n=54)	Subtipo B (n=11)	Mosaico BC (n=15)
Idade média (anos) \pm DP	37,8 \pm 10	39 \pm 9,2	31,3 \pm 9,3	37 \pm 11
Sexo (%)				
Masculino	40 (48,8%)	23 (42,6%)	9 (81,8%)	7 (46,7%)
Feminino	42 (51,2%)	31 (57,4%)	2 (18,2%)	8 (53,3%)
Média do ano de diagnóstico \pm DP	2004 \pm 3,8	2004 \pm 4,3	2005 \pm 2,1	2005 \pm 2,7
Categorias de exposição				
Heterossexual	58 (70,6%)	41 (76%)	3 (27,3%)	12 (80%)
HSH	18 (22%)	9 (16,5%)	8 (72,7%)	1 (6,6%)
UDI	4 (5%)	3 (5,5%)	-	1 (6,6%)
Desconhecida	2 (2,4%)	1 (2%)	-	1 (6,6%)
Média de contagem de linfócitos TCD4 (cels/mm ³) \pm DP	513 \pm 312	492 \pm 269	563 \pm 429	522 \pm 366
Média da carga viral (log) \pm DP	4,1 \pm 0,8	4,1 \pm 0,8	4,4 \pm 0,9	3,9 \pm 0,7

* Não representados as sequências do subtipo FI e URF_BCF.

DP: Desvio Padrão; HSH: homens que fazem sexo com homens; UDI: usuários de drogas injetáveis

Adicionalmente, foi possível observar-se que mais de 80% das sequências subtipo B foram isoladas de homens, enquanto que apenas 18,2% eram provenientes de mulheres. Entre os subtipos C e mosaicos BC a distribuição entre homens e mulheres foi semelhante, sendo as mulheres responsáveis por uma ligeira predominância em ambas as

formas. Indivíduos heterossexuais apresentaram infecção por HIV-1 subtipo B em apenas 5,2% dos casos e mais de 90% das infecções foram relacionadas ao subtipo C e mosaicos BC (Figura 10). Já no grupo HSH a frequência de HIV-1 subtipo B foi de 44,4%, sendo 50% das infecções relacionadas ao subtipo C. Dentre quatro indivíduos usuários de drogas injetáveis, três (75%) eram infectados por HIV-1 subtipo C e um (25%) por uma forma mosaico BC. As duas únicas sequências classificadas como subtipo F1 e URF_BCF foram isoladas de indivíduos heterossexuais e não estão representadas na tabela 2.

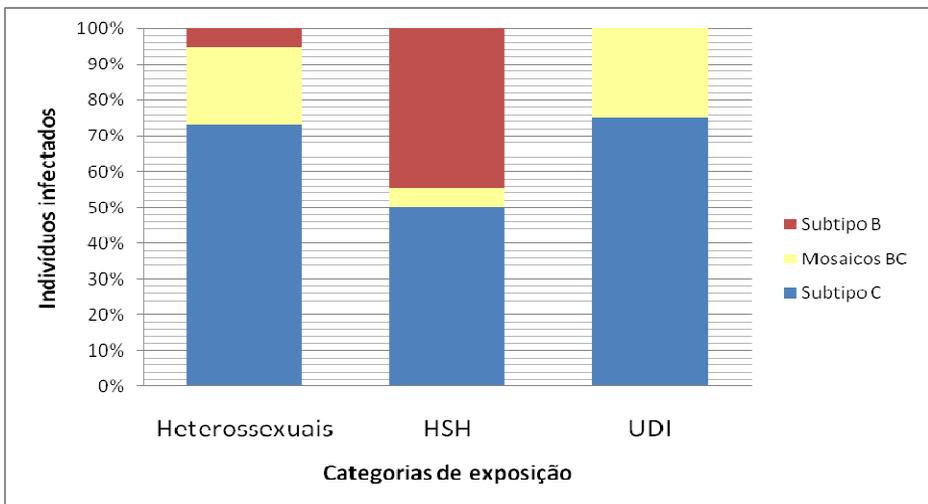


Figura 10: Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 nas categorias de exposição Heterossexual, HSH e UDI. HSH: homens que fazem sexo com homens; UDI: usuários de drogas injetáveis

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada para idade média dos pacientes, ano de diagnóstico, contagem de linfócitos T CD4 ou carga viral entre os diferentes subtipos virais encontrados nesta população. Contudo observou-se que os indivíduos infectados pelo subtipo B apresentavam menor média de idade (31,3 anos), maiores contagens de linfócitos T CD4 (563) e maior número de cópias de HIV-1 circulantes ($\log=4,4$) do que os indivíduos infectados pelo subtipo C, F1 ou por formas recombinantes.

4.4 ANÁLISES DE RESISTÊNCIA

A partir das sequências das regiões PR/RT e INT foi analisada a presença de mutações de resistência para PI, NNRTI, NRTI e INTI. Dentre as todas as sequências analisadas, pelo menos uma DRM foi observada em nove (11%) pacientes (Tabela 3). DRM relacionadas à resistência a PI foram observadas em dois (2,4%) indivíduos, levando a resistência intermediária ao nelfinavir. Mutações de resistência a NRTI foram encontradas em quatro (5%) indivíduos, levando a um perfil de resistência baixo a intermediário contra vários fármacos da classe dos NRTI. DRM relacionadas à resistência a NNRTI foram identificadas em três (3,6%) dos pacientes estudados, sendo que todos eles apresentaram um perfil de alta resistência a pelo menos um fármaco. Dentre as quatro mutações de resistência a NNRTI identificadas, apenas a mutação K101E não levava a um perfil de alta resistência. Mutações de resistência a INTI foram observadas em um (1,2%) paciente, que apresentando a mutação S147R associada à mutação E138A, conferindo baixa resistência ao raltegravir e elvitegravir. A sequência BR10SC107 apresentou DRM para duas classes de antiretrovirais, sendo identificadas mutações de alta resistência a NNRTI e resistência baixa a intermediária aos NRTI.

Tabela 3: Mutações de resistência identificadas em pacientes virgens de tratamento da região metropolitana de Florianópolis e perfil de resistência aos antiretrovirais

Amostra	Subtipo <i>Pol</i>	DRM para PI	DRM para NRTI	DRM para NNRTI	DRM para INTI	Perfil de resistência		
						Baixo	Intermediário	Alto
BR10SC06	C				S147R + E138A	RAL, ELV		
BR10SC07	C	N88D					NFV	
BR10SC29	B		K219Q			AZT		
BR10SC42	C	M46I					NFV	
BR10SC46	B		V75M			DDI	d4T	
BR10SC47	C			K101E, V106M, G190A, M230L			ETR	DLV, EFV, NVP
BR10SC50	C		M41L, T215C			ABC, DDI, TDF	AZT, d4T	
BR10SC107	C		M41L	G190A		AZT, d4T, ETR	EFV	NVP
BR10SC131	C			K103N				DLV, NVP

PI: inibidor de protease; NRTI: inibidor nucleosídico da transcriptase reversa; NNRTI: inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa. ABC: abacavir; AZT: zidovudina; DDI: didanosina; DLV: delavirdina; d4T: stavudina; EFV: efavirenz; ETR: etravirina; NFV: nelfinavir; NVP: nevirapina; TDF: tenofovir; RAL: Raltegravir e ELV: elvitegravir.

Dentre as nove sequências que apresentaram pelo menos uma DRM, sete pertenciam ao subtipo C e duas ao subtipo B, representando 13% e 18,2% do total de sequências subtipo C e B, respectivamente. Contudo, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) e nenhuma correlação entre subtipos na região PR/RT e prevalência de DRM foi encontrada.

Polimorfismos e mutações auxiliares foram encontrados em 24 (29,2%) sequências, sendo que muitas delas apresentavam tais mutações na região da protease, RT e INT simultaneamente. Polimorfismos na região da protease foram encontrados em 17 (20,7%) sequências, sendo L10I/V/R e T74S as mutações mais frequentes e que foram identificadas em 10 e seis sequências respectivamente. No gene da enzima RT foram identificados sete (8,5%) sequências com algum polimorfismo. O polimorfismo E138A foi encontrado em três sequências e os polimorfismos V179D e V118I foram identificados em duas sequências. Polimorfismos e mutações auxiliares na região INT foram observadas em 10 (12,2%) sequências, sendo a mutação V151I a mais frequente, principalmente entre as amostras do subtipo B.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou uma população de 82 indivíduos HIV-soropositivos e virgens de tratamento que realizavam acompanhamento médico na região metropolitana de Florianópolis. Análises filogenéticas demonstraram alta prevalência de subtipo C (65,8%), seguidas por frequências menores de subtipo B (13,4%) e subtipo F1 (1,2%). Tais resultados corroboram pesquisas realizadas em outras cidades do estado de Santa Catarina como Camboriú/Itajaí e Criciúma onde foram observadas prevalências de 64% e 79% de subtipo C respectivamente (BRIGIDO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010). Os dados aqui apresentados também demonstram um aumento da prevalência de subtipo C sobre os subtipos B e F1 na região metropolitana de Florianópolis. Um estudo anterior observou prevalências de 56% de subtipo C, 40% de subtipo B e 4% de subtipo F1 em sequências do gene *env* de indivíduos de Florianópolis cuja data média de diagnóstico foi 1998 (LOCATELI et al., 2007). Considerando-se apenas as análises do gene *env*, o presente estudo apresentou 78% de subtipo C, 20,8% de subtipo B e 1,2% de subtipo F1 em indivíduos cuja data média de diagnóstico foi 2004, evidenciando o crescimento do número de infecções pelo subtipo C do HIV-1 na região estudada.

No cenário epidemiológico da região sul do Brasil, o estado de Santa Catarina destaca-se por apresentar as maiores prevalências de subtipo C entre os três estados que compõem esta região geográfica (Figura 11). No Rio Grande do Sul, onde o subtipo C foi originalmente identificado no Brasil, prevalências de 42% e 27% foram observadas nas cidades de Rio Grande e Porto Alegre respectivamente (Figura 11) (SOARES et al., 2003; SANTOS et al., 2007; BRIGIDO et al., 2007). Na cidade de Curitiba, capital do estado mais ao norte da região sul do Brasil, a prevalência de subtipo C foi de 32% (FERREIRA et al., 2008).

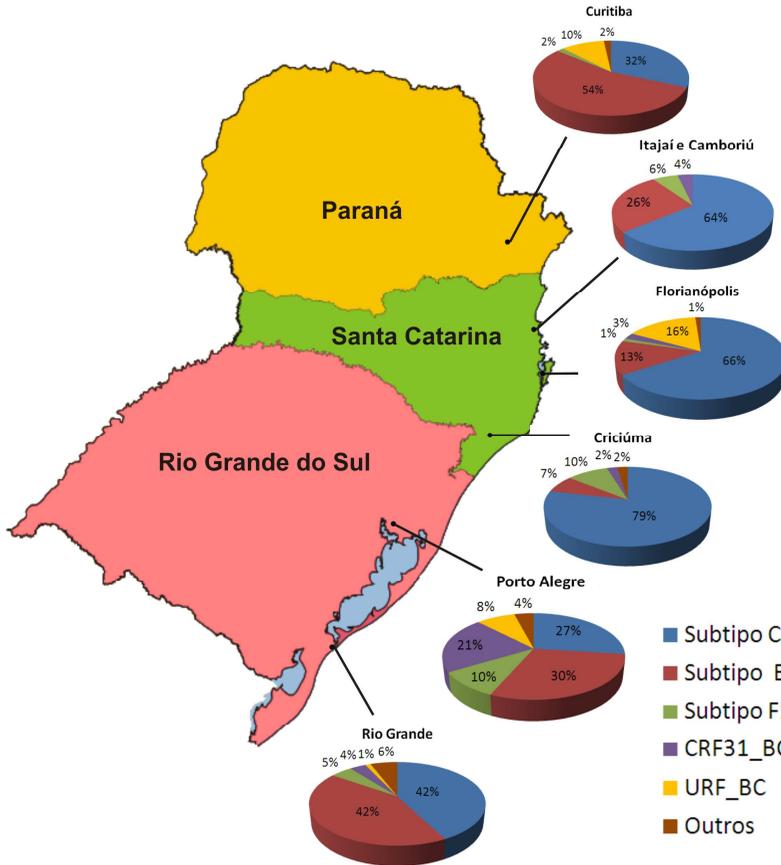


Figura 11: Mapa da região sul do Brasil apresentando a distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1. Os nomes dos estados estão indicados no mapa e o nome das cidades analisadas está indicado acima dos gráficos.

Uma elevada frequência de cepas mosaico BC (18,3%) foi identificada no presente estudo, fato que pode ser explicado pela co-circulação dos subtipos B e C na epidemia do HIV-1 de Florianópolis, propiciando que recombinações gênicas entre estes subtipos ocorram quando há co-infecção em um mesmo indivíduo. Entre as cidades do sul do Brasil avaliadas em outros estudos, apenas Porto Alegre apresenta uma prevalência maior (29%) de cepas mosaico BC (Figura 11). Em Porto Alegre, no entanto, a elevada frequência de recombinantes BC pode ser explicada pela alta prevalência do CRF31_BC, responsável por aproximadamente 20% das infecções pelo HIV-1 nessa cidade. Na

região metropolitana de Florianópolis observou-se uma baixa frequência de CRF31_BC (2,4%) e um predomínio de URFs_BC (15,9%). Estes dados são consistentes com estudos anteriores em cidades catarinenses, nos quais se relatou uma baixa prevalência de CRF31_BC (2% a 4%), concluindo-se que esta forma recombinante circula em baixa frequência entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 em Santa Catarina (SANTOS et al., 2007; BRIGIDO et al., 2007).

As análises deste estudo identificaram que dentre as 13 sequências classificadas como URFs_BC, cinco possuíam pelo menos um ponto de recombinação semelhante ao CRF31_BC. As amostras BR10SC63, BR10SC101, BR10SC104 e BR10SC142 possuem um ponto de recombinação próximo à posição 3215 (relativo ao HXB2), característico da forma recombinante CRF31_BC, mas apresentam fragmentos de subtipo B maiores na região PR/RT que o encontrado na CRF31_BC. Já a amostra BR10SC93, classificada como CRF31_BC-like na região PR/RT, apresentou um fragmento B adicional na região INT. Estas URF_BC podem ser formas recombinantes de segunda geração (SGR), derivadas da recombinação entre cepas CRF31_BC e cepas subtipo B, tendo este evento levado à extensão do fragmento genômico subtipo B destas sequências. SGR derivadas da CRF31_BC foram relatadas no estado do Rio Grande do Sul, porém, ao contrário dos dados apresentados aqui, a recombinação ocorreu provavelmente entre CRF31_BC e subtipo C, levando a uma redução do fragmento B da região PR/RT (PASSAES et al., 2009; BRIGIDO et al., 2007).

Verificamos neste estudo que as categorias de exposição heterossexual e HSH apresentaram associação altamente significativa ($p < 0,05$) com subtipo C e subtipo B, respectivamente. Mais de 70% das sequências subtipo C eram provenientes de indivíduos heterossexuais, enquanto que 72,7% das sequências subtipo B foram obtidas de indivíduos da categoria HSH. Além disto, observou-se que 80% das cepas classificadas como mosaico BC eram provenientes de heterossexuais. Esta clara dicotomia entre subtipos virais e formas de infecção sugere que duas epidemias independentes ocorram na região de Florianópolis, com subtipos C e B infectando populações diferentes. Ao considerarmos o grupo HSH, observou-se que 50% dos indivíduos eram infectados por HIV-1 subtipo C, enquanto que entre heterossexuais apenas 5,2% dos indivíduos eram infectados pelo subtipo B. Estes dados sugerem que o subtipo C teria transpassado as barreiras que separam as diferentes populações, dispersando-se tanto através do grupo

heterossexual como do grupo HSH em Florianópolis. Enquanto que o subtipo B continuaria a ser transmitido principalmente na população de HSH.

Vários estudos já relataram uma associação entre categorias de exposição e subtipos do HIV-1. Na África do Sul e na Argentina duas epidemias independentes foram identificadas, estando o subtipo C relacionado aos indivíduos heterossexuais e o subtipo B a HSH (VAN HARMELEN et al., 1997; AVILA et al., 2002). Na Europa, o início da epidemia era principalmente sustentado pelo subtipo B circulando entre os grupos HSH e UDI (BUONAGURO et al., 2007). Os subtipos não B foram introduzidos posteriormente por via heterossexual após a chegada de imigrantes de regiões onde estas formas virais eram endêmicas. No Brasil, diversos estudos observaram, nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná, maior frequência de subtipo C entre mulheres e de subtipo B entre homens (SOARES et al., 2005; DIAS et al., 2009; TOLEDO et al., 2010; RABONI et al., 2010). Da mesma forma, em Santa Catarina, a maior proporção de subtipo C foi observada em gestantes soropositivas da cidade de Criciúma (RODRIGUES et al., 2010). Tais observações sugerem uma diferente eficácia de transmissão dos subtipos B e C entre populações heterossexuais e homossexuais. Porém, estudos sobre o potencial infectivo dos diferentes subtipos do HIV-1 não demonstraram uma associação entre um subtipo específico e uma determinada forma de transmissão (BUONAGURO et al., 2007).

A peculiar segregação de subtipos do HIV-1 entre os diferentes grupos de exposição poderia também ser explicada por fatores demográficos, econômicos e sociais que separam os grupos de exposição e determinam redes de transmissão distintas. No Brasil, a história das epidemias dos subtipos B e C do HIV-1 pode ser dividida em duas fases, o que ajudaria a explicar a aparente segregação destes subtipos na população. A epidemia antiga seria caracterizada por infecções pelo subtipo B, cuja introdução na população brasileira foi estimada por volta de 1965-1970 (BELLO et al., 2007), e concentrada principalmente nos grupos de exposição MSM e UDI. Já o subtipo C seria resultado de uma introdução mais recente, por volta de 1980-1985 (BELLO et al., 2008), coincidindo com uma expansão do número de infecções pelo HIV na população heterossexual. A entrada do subtipo C na população heterossexual, associada às altas taxas de incidência de HIV-1 no sul do Brasil, pode explicar a elevada prevalência deste subtipo em Santa Catarina. Por sua vez, a circulação do subtipo B teria

ficado mais restrita ao pequeno grupo de HSH, com uma expansão mais limitada ao grupo de heterossexuais.

Recentemente foi demonstrado que a taxa de expansão do subtipo C e CRF31_BC decaiu a partir da metade dos anos 90 em pacientes estudados no Rio Grande do Sul, estado onde originalmente foi identificado o subtipo C no Brasil (BELLO et al., 2009). Apesar disto, assim como aqui demonstrado, estudos em cidades de outros estados apontam para um crescente número de infecções pelo subtipo C. No estado do Paraná observou-se que 46% dos indivíduos menores de 13 anos eram infectados com HIV-1 C, enquanto que em indivíduos maiores de 13 anos esta proporção era de 27%, apontando para uma expansão recente do subtipo C (RABONI et al., 2010). Neste mesmo estudo é descrito menor proporção de subtipo C em cidades do norte do estado do Paraná se comparadas à capital Curitiba e cidades do sul, próximas a divisa com Santa Catarina. No estado de São Paulo, a proporção de infecções pelo subtipo C do HIV-1 aumentou de 0,5% em amostras de 1998-2003 para 11,6% em 2010 (BRIGIDO et al., 2010). Analisando estas informações torna-se cabível a hipótese de que o subtipo C esteja em expansão rumo ao norte do país, mas estabilizado no Rio Grande do Sul, onde a epidemia do subtipo C é provavelmente mais antiga. Contudo, análises epidemiológicas e filogenéticas detalhadas de seqüências dos estados do sul e São Paulo são necessárias para confirmação desta hipótese.

O presente estudo também avaliou a presença de mutações de resistência a antiretrovirais em indivíduos virgens de tratamento da região metropolitana de Florianópolis. Nas regiões PR/RT e INT, a presença de pelo menos uma DRM foi observada em 11% dos indivíduos analisados. Considerando-se apenas a região PR/RT o presente estudo encontrou mutações de resistência em 9,7% das seqüências, caracterizando-se uma prevalência ligeiramente maior que a média brasileira (7-8%) para esta região genômica, porém menor que as estimativas observadas em cidades como Santos, Salvador e Rio de Janeiro (SPRINZ et al., 2009; INOCENCIO et al., 2009; PEDROSO et al., 2007; PIRES et al., 2004; SUCUPIRA et al., 2007). A prevalência de DRM observada aqui pode ser considerada modesta se comparada a estudos de países desenvolvidos como Estados Unidos e Inglaterra. A recente introdução de inibidores de integrase no Brasil justifica a baixa prevalência de DRM que afetam INTI (1,2%), o que estimula a

utilização deste novo fármaco no tratamento de indivíduos com AIDS na região estudada.

Polimorfismos na região da protease foram encontrados em grande frequência, tendo as mutações L10/I/V/R e T74S como as mais encontradas. A mutação L10/I/V/R está associada à resistência a vários PI quando ocorre em presença de outras mutações, porém, ela é observada em 5-10% de indivíduos não tratados e por isso é classificada como um polimorfismo (RHEE et al., 2006). A mutação T74S está relacionada à resistência ao inibidor de protease nelfinavir, contudo sua ocorrência frequente em indivíduos não tratados infectados com o subtipo C a torna um polimorfismo. Neste estudo todas as sequências que apresentaram a mutação T74S eram subtipo C.

O presente estudo descreveu uma prevalência de mutações de resistência maior que muitos estudos realizados no Brasil, mesmo assim os dados aqui mostrados podem estar subestimados. Estudos mostram que a prevalência de DRM em indivíduos recém infectados (há menos de 12 meses) pelo HIV-1 é maior que aquela encontrada em indivíduos com infecção crônica (LITTLE, 2000). DRM podem afetar a capacidade infectiva do vírus, sua velocidade de replicação ou qualquer outro passo do ciclo viral, resultando na diminuição do *fitness* (BUCKHEIT, 2004). Desta forma, sem a pressão seletiva dos antiretrovirais, DRM podem ser desvantajosas ao HIV-1 e a reversão destas mutações pode ocorrer em indivíduos não tratados. Como os pacientes selecionados para este estudo não eram recém infectados, sendo em média diagnosticados no ano de 2004, a prevalência de DRM da população de estudo pode ser maior que a apresentada neste trabalho.

O trabalho apresentado aqui analisou 82 amostras coletadas entre 2008 e 2009 de indivíduos virgens de tratamento da região metropolitana de Florianópolis. Análises filogenéticas revelaram uma grande prevalência de HIV-1 subtipo C, seguido por cepas mosaico BC, subtipo B, subtipo F1 e outras formas recombinantes. Os resultados apresentados indicam um aumento considerável de infecções pelo subtipo C na região estudada e uma associação altamente significativa entre subtipo C e indivíduos heterossexuais, bem como entre subtipo B e o grupo MSM. A elevada taxa de incidência de casos de AIDS na região sul do Brasil, combinada ao aumento do número de mulheres infectadas pelo HIV-1, ajuda a explicar a elevada prevalência do subtipo C em Santa Catarina. Este trabalho também descreve prevalência de DRM entre indivíduos virgens de tratamento maior que a média descrita no

Brasil, o que associado ao rápido aumento no número de indivíduos em tratamento, evidencia a necessidade de estudos de vigilância da transmissão de formas resistentes do HIV-1 em Florianópolis e no estado de Santa Catarina.

6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Dentre as amostras de 100 indivíduos selecionados para o estudo foi possível obter sequências de 82 amostras para a região *env-gp120/C2V3* e PR/RT e de 81 amostras para a região INT. Um total de 18 amostras não apresentou amplificação ou não geraram sequências adequadas para as análises posteriores.
- A principal categoria de exposição da população estudada foi heterossexual (70,6%), seguida pela categoria HSH (22%) e UDI (5%).
- Análises filogenéticas identificaram 54 (65,8%) sequências subtipo C, 15 (18,3%) sequências recombinantes BC, 11 (13,4%) sequências subtipo B, uma (1,2%) sequência subtipo F1 e uma (1,2%) sequência recombinante entre os subtipos B, C e F (URF_BCF).
- Dentre as 15 sequências recombinantes BC, oito sequências foram classificadas como URF_BC, duas (2,4%) classificadas como CRF31_BC-like e cinco sequências foram consideradas SGR derivadas da CRF31_BC.
- Observou-se que 76% das sequências subtipo C e 80% das sequências mosaico BC foram provenientes de amostras de indivíduos heterossexuais.
- Observou-se que 72,7% das sequências subtipo B haviam sido isoladas de indivíduos do grupo HSH.
- No grupo heterossexual, 90% dos indivíduos apresentaram infecção por HIV-1 subtipo C ou mosaicos BC e apenas 5,2% por subtipo B.
- No grupo HSH, 44,4%, dos indivíduos apresentaram infecção pelo HIV-1 subtipo B e 50% das infecções relacionadas ao subtipo C.
- No grupo UDI, 75% eram infectados por HIV-1 subtipo C e 25% por formas mosaico BC.
- Uma associação altamente significativa ($p < 0,001$) entre subtipos C e mosaicos BC e a categoria de exposição heterossexual, bem como subtipo B e a categoria HSH foi observada.
- Pelo menos uma DRM foi observada em 11% dos pacientes estudados.

- DRM relacionadas à resistência a PI foram observadas em 2,4% dos indivíduos, à NRTI em 5% dos indivíduos, à resistência a NNRTI em 3,6% dos indivíduos e DRM relacionadas à INTI foram observadas em 1,2% dos indivíduos.
- Nenhuma correlação entre subtipos virais e prevalência de DRM foi encontrada.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo confirma a alta prevalência de subtipo C e cepas recombinantes BC no estado de Santa Catarina e revela uma diferença significativa na distribuição de subtipos do HIV-1 entre as distintas categorias de exposição. Este estudo também mostra prevalência de mutações de resistência primária maior que a relatada na maioria das cidades brasileiras.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVILA, M. M.; PANDO, M. A.; CARRION, G.; PERALTA, L. M.; SALOMON, H.; CARRILLO, M. G.; SANCHEZ, J.; MAULEN, S.; HIERHOLZER, J.; MARINELLO, M.; NEGRETE, M.; RUSSELL, K. L.; CARR, J. K. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 29, n. 4, p. 422-6, 2002.

BARRE-SINOUSI, F.; CHERMANN, J. C.; REY, F.; NUGEYRE, M. T.; CHAMARET, S.; GRUEST, J.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIOUX, C.; ROZENBAUM, W.; MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-71, 1983.

BELLO, G.; EYER-SILVA, W. A.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; GUIMARAES, M. L.; CHEQUER-FERNANDEZ, S. L.; TEIXEIRA, S. L.; MORGADO, M. G. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 7, n. 2, p. 263-70, 2007.

BELLO, G.; PASSAES, C. P.; GUIMARAES, M. L.; LORETE, R. S.; MATOS ALMEIDA, S. E.; MEDEIROS, R. M.; ALENCASTRO, P. R.; MORGADO, M. G. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS**, v. 22, n. 15, p. 1993-2000, 2008.

BELLO, G.; GUIMARÃES, M. L.; PASSAES, C. P.; MATOS, S. E.; VELOSO, V. G.; MORGADO, M. G. Short communication: Evidences of recent decline in the expansion rate of the HIV type 1 subtype C and CRF31_BC epidemics in southern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 25, n. 11, p.1065-9, 2009.

BENNETT, D. E.; CAMACHO, R. J.; OTELEA, D.; KURITZKES, D. R.; FLEURY, H.; KIUCHI, M.; HENEINE, W.; KANTOR, R.; JORDAN, M. R.; SCHAPIRO, J. M.; VANDAMME, A. M.; SANDSTROM, P.; BOUCHER, C. A.; VAN DE VIJVER, D.; RHEE, S. Y.; LIU, T. F.; PILLAY, D.; SHAFER, R. W. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. 4724-9, 2009.

BRIGIDO, L. F.; FERREIRA, J. L.; ALMEIDA, V. C.; ROCHA, S. Q.; RAGAZZO, T. G.; ESTEVAM, D. L.; RODRIGUES, R. Southern Brazil HIV Type 1 C Expansion into the State of Sao Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 00, p. 1-6, 2010.

BRIGIDO, L. F.; NUNES, C. C.; OLIVEIRA, C. M.; KNOLL, R. K.; FERREIRA, J. L.; FREITAS, C. A.; ALVES, M. A.; DIAS, C.; RODRIGUES, R. HIV type 1 subtype C and CB Pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1579-86, 2007.

BRODER, S. The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic. **Antiviral Res**, v. 85, n. 1, p. 1-18, 2010.

BUCKHEIT, R. W., JR. Understanding HIV resistance, fitness, replication capacity and compensation: targeting viral fitness as a therapeutic strategy. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 13, n. 8, p. 933-58, 2004.

BUONAGURO, L.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. **J Virol**, v. 81, n. 19, p. 10209-19, 2007.

CAMERON, D. W.; HEATH-CHIOZZI, M.; DANNER, S.; COHEN, C.; KRAVCIK, S.; MAURATH, C.; SUN, E.; HENRY, D.; RODE, R.; POTTHOFF, A.; LEONARD, J. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. **Lancet**, v. 351, n. 9102, p. 543-9, 1998.

CANE, P.; CHRYSTIE, I.; DUNN, D.; EVANS, B.; GERETTI, A. M.; GREEN, H.; PHILLIPS, A.; PILLAY, D.; PORTER, K.; POZNIAK, A.; SABIN, C.; SMIT, E.; WEBER, J.; ZUCKERMAN, M. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom: multicentre observational study. **BMJ**, v. 10, n. 331, p. 1368-70, 2005.

CARDOSO, L. P.; QUEIROZ, B. B.; STEFANI, M. M. HIV-1 pol phylogenetic

diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naive patients from Central West Brazil. **J Clin Virol**, v. 46, n. 2, p. 134-9, 2009.

COLLINS, K. L.; CHEN, B. K.; KALAMS, S. A.; WALKER, B. D.; BALTIMORE, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. **Nature**, v. 391, n. 6665, p. 397-401, 1998.

COORDENAÇÃO DE DST E AIDS. Ministério da Saúde. Brasil. **Boletim Epidemiológico AIDS. Ano VI, n. 1, 01 à 26 semanas epidemiológicas - janeiro a junho de 2009**. Brasília. 2010.

CULLEN, B. R. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. **Cell**, v. 93, n. 5, p. 685-92, 1998.

DELWART, E. L.; HERRING, B.; RODRIGO, A. G.; MULLINS, J. I. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl**. v. 4, n. 5, p. S202-16, 1995.

DIAS, C. F.; NUNES, C. C.; FREITAS, I. O.; LAMEGO, I. S.; OLIVEIRA, I. M.; GILLI, S.; RODRIGUES, R.; BRIGIDO, L. F. High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naive patients in Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 4, p. 191-6, 2009.

FERREIRA, J. L.; THOMAZ, M.; RODRIGUES, R.; HARRAD, D.; OLIVEIRA, C. M.; OLIVEIRA, C. A.; BATISTA, J. P.; ITO, T. S.; BRIGIDO, L. F. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 800-8, 2008.

GADELHA, S. R.; SHINDO, N.; CRUZ, J. N.; MORGADO, M. G.; GALVAO-CASTRO, B. Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-1 in the state of Ceara, Northeast, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 461-3, 2003.

GALLO, R. C.; SALAHUDDIN, S. Z.; POPOVIC, M.; SHEARER, G. M.; KAPLAN, M.; HAYNES, B. F.; PALKER, T. J.; REDFIELD, R.; OLESKE, J.; SAFAI, B.; ET AL. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500-3, 1984.

GANSER-PORNILLOS, B. K.; YEAGER, M.; SUNDQUIST, W. I. The structural biology of HIV assembly. **Curr Opin Struct Biol**, v. 18, n. 2, p. 203-17, 2008.

GAO, F.; BAILES, E.; ROBERTSON, D. L.; CHEN, Y.; RODENBURG, C. M.; MICHAEL, S. F.; CUMMINS, L. B.; ARTHUR, L. O.; PEETERS, M.; SHAW, G. M.; SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436-41, 1999.

GAO, F.; YUE, L.; WHITE, A. T.; PAPPAS, P. G.; BARCHUE, J.; HANSON, A. P.; GREENE, B. M.; SHARP, P. M.; SHAW, G. M.; HAHN, B. H. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. **Nature**, v. 358, n. 6386, p. 495-9, 1992.

HAHN, B. H.; SHAW, G. M.; DE COCK, K. M.; SHARP, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-14, 2000

HAMMER, S. M.; KATZENSTEIN, D. A.; HUGHES, M. D.; GUNDAKER, H.; SCHOOLEY, R. T.; HAUBRICH, R. H.; HENRY, W. K.; LEDERMAN, M. M.; PHAIR, J. P.; NIU, M.; HIRSCH, M. S.; MERIGAN, T. C. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. **N Engl J Med**, v. 335, n. 15, p. 1081-90, 1996.

HOFFMANN, C; ROCKSTROH, J; KAMPS, B. **HIV Medicine**. 15. ed. Flying Publisher. 2007. Disponível em: <<http://www.hivmedicine.com/>>. Acesso em 28 jun. 2008

INOCENCIO, L. A.; PEREIRA, A. A.; SUCUPIRA, M. C.; FERNANDEZ, J. C.; JORGE, C. P.; SOUZA, D. F.; FINK, H. T.;

DIAZ, R. S.; BECKER, I. M.; SUFFERT, T. A.; ARRUDA, M. B.; MACEDO, O.; SIMAO, M. B.; TANURI, A. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. **J Int AIDS Soc**, v. 12, n. 1, p. 20, 2009.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-20, 1980.

KIRK, O.; MOCROFT, A.; KATZENSTEIN, T. L.; LAZZARIN, A.; ANTUNES, F.; FRANCIOLI, P.; BRETTLE, R. P.; PARKIN, J. M.; GONZALES-LAHOZ, J.; LUNDGREN, J. D. Changes in use of antiretroviral therapy in regions of Europe over time. EuroSIDA Study Group. **AIDS**, v. 12, n. 15, p. 2031-9, 1998.

LAZZARIN, A.; CLOTET, B.; COOPER, D.; REYNES, J.; ARASTEH, K.; NELSON, M.; KATLAMA, C.; STELLBRINK, H. J.; DELFRAISSY, J. F.; LANGE, J.; HUSON, L.; DEMASI, R.; WAT, C.; DELEHANTY, J.; DROBNES, C.; SALGO, M. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. **N Engl J Med**, v. 348, n. 22, p. 2186-95, 2003.

LIEBERMAN-BLUM, S. S.; FUNG, H. B.; BANDRES, J. C. Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. **Clin Ther**, v. 30, n. 7, p. 1228-50, 2008.

LITTLE, S. J. Transmission and prevalence of HIV resistance among treatment-naive subjects. **Antivir Ther**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2000.

LITTLE, S. J.; HOLTE, S.; ROUTHY, J. P.; DAAR, E. S.; MARKOWITZ, M.; COLLIER, A. C.; KROUP, R. A.; MELLORS, J. W.; CONNICK, E.; CONWAY, B.; KILBY, M.; WANG, L.; WHITCOMB, J. M.; HELLMANN, N. S.; RICHMAN, D. D. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. **N Engl J Med**, v. 347, n. 6, p. 385-394. 2002.

LOCATELI, D.; STOCO, P. H.; DE QUEIROZ, A. T.; ALCANTARA, L. C.; FERREIRA, L. G.; ZANETTI, C. R.; RODRIGUES, R.; GRISARD, E. C.; PINTO, A. R. Molecular epidemiology of HIV-1 in

Santa Catarina State confirms increases of subtype C in Southern Brazil. **J Med Virol**, v. 79, n. 10, p. 1455-63, 2007.

MACHADO, L. F.; ISHAK, M. O.; VALLINOTO, A. C.; LEMOS, J. A.; AZEVEDO, V. N.; MOREIRA, M. R.; SOUZA, M. I.; FERNANDES, L. M.; SOUZA, L. L.; ISHAK, R. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 10, p. 961-6, 2009.

MARCHAND, C.; MADDALI, K.; METIFIOT, M.; POMMIER, Y. HIV-1 IN inhibitors: 2010 update and perspectives. **Curr Top Med Chem**, v. 9, n. 11, p. 1016-37, 2009.

MCCUTCHAN, F. E. Global epidemiology of HIV. **J Med Virol**, v. 78 Suppl. 1, p. S7-S12, 2006.

MELLORS, J. W.; KINGSLEY, L. A.; RINALDO, C. R., JR.; TODD, J. A.; HOO, B. S.; KOKKA, R. P.; GUPTA, P. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. **Ann Intern Med**, v. 122, n. 8, p. 573-9, 1995.

MILLER, R. H.; SARVER, N. HIV accessory proteins as therapeutic targets. **Nat Med**, v. 3, n. 4, p. 389-94, 1997.

MITSUYA, H., DAHLBERG, J.E., SPIGELMAN, Z., MATSUSHITA, S., JARRETT, R.F., MATSUKURA, M., CURRENS, M.J., AARONSON, S.A., REITZ, M.S., MCCAFFREY, R.S., BRODER, S. 2,3-dideoxynucleosides: broad spectrum antiretroviral activity and mechanism of action. **UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology**. Los Angeles. NEW SERIES, vol. 71, p. 407-421, 1988.

PASSAES, C. P.; BELLO, G.; LORETE, R. S.; MATOS ALMEIDA, S. E.; JUNQUEIRA, D. M.; VELOSO, V. G.; MORGADO, M. G.; GUIMARAES, M. L. Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31_BC in Southern Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 9, n. 4, p. 474-82, 2009.

PEDROSO, C.; QUEIROZ, A. T.; ALCANTARA, L. C.; DREXLER, J. F.; DIAZ, R. S.; WEYLL, N.; BRITES, C. High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a northeast state of Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, n. 2, p. 251-3, 2007.

PETER, F. HIV nef: the mother of all evil? **Immunity**, v. 9, n. 4, p. 433-7, 1998.

PETERLIN, B. M.; TRONO, D. Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 2, p. 97-107, 2003.

PIRES, I. L.; SOARES, M. A.; SPERANZA, F. A.; ISHII, S. K.; VIEIRA, M. C.; GOUVEA, M. I.; GUIMARAES, M. A.; DE OLIVEIRA, F. E.; MAGNANINI, M. M.; BRINDEIRO, R. M.; TANURI, A. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 426-30, 2004.

PLANTIER, J. C.; LEOZ, M.; DICKERSON, J. E.; DE OLIVEIRA, F.; CORDONNIER, F.; LEMEE, V.; DAMOND, F.; ROBERTSON, D. L.; SIMON, F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat Med**, v. 15, n. 8, p. 871-2, 2009.

POPE, M.; HAASE, A. T. Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. **Nat Med**, v. 9, n. 7, p. 847-52, 2003.

QADIR, M. I.; MALIK, S. A. HIV fusion inhibitors. **Rev Med Virol**, v. 20, n. 1, p. 23-33, 2010.

RABONI, S. M.; ALMEIDA, S. M.; ROTTA, I.; RIBEIRO, C. E.; ROSARIO, D.; VIDAL, L. R.; NOGUEIRA, M. B.; RIEDEL, M.; WINHESCKI MDA, G.; FERREIRA, K. A.; ELLIS, R. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1044-9, 2010.

RAMBAUT, A.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; HOLMES, E. C. The causes and consequences of HIV evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 1, p. 52-61, 2004.

RHEE, S. Y.; KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D. A.; CAMACHO, R.; MORRIS, L.; SIRIVICHAYAKUL, S.; JORGENSEN, L.; BRIGIDO, L. F.; SCHAPIRO, J. M.; SHAFER, R. W. HIV-1 pol mutation frequency by subtype and treatment experience: extension of the HIVseq program to seven non-B subtypes. **AIDS**, v. 20, n. 5, p. 643-51, 2006.

RODRIGUES, R.; MANENTI, S.; ROMAO, P. R.; DE PAULA FERREIRA, J. L.; BATISTA, J. P.; SIQUEIRA, A. F.; DE MACEDO BRIGIDO, L. F. Young pregnant women living with HIV/AIDS in Criciuma, Southern Brazil, are infected almost exclusively with HIV type 1 clade C. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 3, p. 351-7, 2010.

RODRIGUES, R.; SCHERER, L. C.; OLIVEIRA, C. M.; FRANCO, H. M.; SPERHACHE, R. D.; FERREIRA, J. L.; CASTRO, S. M.; STELLA, I. M.; BRIGIDO, L. F. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. **Virus Res**, v. 116, n. 1-2, p. 201-7, 2006.

SA FILHO, D. J.; SANABANI, S.; DIAZ, R. S.; MUNERATO, P.; BRUNSTEIN, A.; FUSUMA, E.; SABINO, E. C.; JANINI, L. M. Analysis of full-length human immunodeficiency virus type 1 genome reveals a variable spectrum of subtypes B and f recombinants in Sao Paulo, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21, n. 2, p. 145-51, 2005.

SALEMI, M.; DE OLIVEIRA, T.; SOARES, M. A.; PYBUS, O.; DUMANS, A. T.; VANDAMME, A. M.; TANURI, A.; CASSOL, S.; FITCH, W. M. Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol*, v. 60, n. 5, p. 598-605, 2005.

SALMINEN, M. O.; CARR, J. K.; BURKE, D. S.; MCCUTCHAN, F. E. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV

type 1 by bootscanning. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 11, n. 11, p. 1423-5, 1995.

SANTIAGO, M. L.; RODENBURG, C. M.; KAMENYA, S.; BIBOLLET-RUCHE, F.; GAO, F.; BAILES, E.; MELETH, S.; SOONG, S. J.; KILBY, J. M.; MOLDOVEANU, Z.; FAHEY, B.; MULLER, M. N.; AYOUBA, A.; NERRIENET, E.; MCCLURE, H. M.; HEENEY, J. L.; PUSEY, A. E.; COLLINS, D. A.; BOESCH, C.; WRANGHAM, R. W.; GOODALL, J.; SHARP, P. M.; SHAW, G. M.; HAHN, B. H. SIVcpz in wild chimpanzees. **Science**, v. 295, n. 5554, p. 465, 2002.

SANTOS, A. F.; SCHRAGO, C. G.; MARTINEZ, A. M.; MENDOZA-SASSI, R.; SILVEIRA, J.; SOUSA, T. M.; LENGGRUBER, R. B.; SOARES, E. A.; SPRINZ, E.; SOARES, M. A. Epidemiologic and evolutionary trends of HIV-1 CRF31_BC-related strains in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, n. 3, p. 328-33, 2007.

SCOTT, P.; ARNOLD, E.; EVANS, B.; POZNIAK, A.; MOYLE, G.; SHAHMENESH, M.; WHITE, D.; SHIRLEY, J.; CANE, P.; PILLAY, D. Surveillance of HIV antiretroviral drug resistance in treated individuals in England: 1998-2000. **J Antimicrob Chemother**, v. 53, n. 3, p. 469-73, 2004.

SECRETARIA DA SAÚDE DE SANTA CATARINA. Diretoria de vigilância epidemiológica. **A epidemia de AIDS em Santa Catarina: tendências e desafios. Ano 2009**. Estado de Santa Catarina. Disponível em:

<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/gerencia_dst_aids/noticias/2009/Situacao_da_AIDS_em_SC_ate_2008.pdf> Acesso em Dezembro de 2010.

SHAFER, R. W.; RHEE, S. Y.; PILLAY, D.; MILLER, V.; SANDSTROM, P.; SCHAPIRO, J. M.; KURITZKES, D. R.; BENNETT, D. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. **AIDS**, v. 21, n. 2, p. 215-23, 2007.

SILICIANO, J. D.; KAJDAS, J.; FINZI, D.; QUINN, T. C.; CHADWICK, K.; MARGOLICK, J. B.; KOVACS, C.; GANGE, S. J.;

SILICIANO, R. F. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 727-8, 2003.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. 13. HIV-1 infection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 111, n. 2 Suppl, p. S582-92, 2003.

SOARES, E. A.; MARTINEZ, A. M.; SOUZA, T. M.; SANTOS, A. F.; DA HORA, V.; SILVEIRA, J.; BASTOS, F. I.; TANURI, A.; SOARES, M. A. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. **AIDS**, v. 19 Suppl 4S81-6, 2005.

SOARES, E. A.; SANTOS, R. P.; PELLEGRINI, J. A.; SPRINZ, E.; TANURI, A.; SOARES, M. A. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 520-6, 2003.

SPIRA, S.; WAINBERG, M. A.; LOEMBA, H.; TURNER, D.; BRENNER, B. G. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 51, n. 2, p. 229-40, 2003.

SPRINZ, E.; NETTO, E. M.; PATELLI, M.; LIMA, J. S.; FURTADO, J. J.; DA EIRA, M.; ZAJDENVERG, R.; MADRUGA, J. V.; LEWI, D. S.; MACHADO, A. A.; PEDRO, R. J.; SOARES, M. A. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 9, p. 861-7, 2009.

SUCUPIRA, M. C.; CASEIRO, M. M.; ALVES, K.; TESCAROLLO, G.; JANINI, L. M.; SABINO, E. C.; CASTELO, A.; PAGE-SHAFER, K.; DIAZ, R. S. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. **AIDS Patient Care**, v. 21, n. 2, p. 116-28, 2007.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol Biol Evol**, v. 24, n. 8, p. 1596-9, 2007.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol Biol Evol**, v. 10, n. 3, p. 512-26, 1993.

TEIXEIRA, S. L.; BASTOS, F. I.; TELLES, P. R.; HACKER, M. A.; BRIGIDO, L. F.; DE, F. O. C. A.; BONGERTZ, V.; MORGADO, M. G. HIV-1 infection among injection and ex-injection drug users from Rio de Janeiro, Brazil: prevalence, estimated incidence and genetic diversity. **J Clin Virol**, v. 31, n. 3, p. 221-6, 2004.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res**, v. 25, n. 24, p. 4876-82, 1997.

TOLEDO, P. V.; DE CARVALHO, D. S.; DE ROSSI, S. G.; BRINDEIRO, R.; DE QUEIROZ-TELLES, F. Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Parana, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 230-6, 2010.

VAN HARMELEN, J.; WOOD, R.; LAMBRICK, M.; RYBICKI, E. P.; WILLIAMSON, A. L.; WILLIAMSON, C. An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. **AIDS**, v. 11, n. 1, p. 81-7, 1997.

WHO LIBRARY CATALOGUING-IN-PUBLICATION DATA. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. **Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2010**. UNAIDS. Disponível em: <http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm> Acesso em: 30 nov. 2010

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 11, p. 859-68, 2006.

9. ANEXOS

ANEXO 1: Termo de consentimento e livre esclarecimento.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas
88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

PROJETO DE PESQUISA: Estudo da diversidade genética do HIV-1 e resistência primária a anti-retrovirais em pacientes soropositivos dos Estados de Santa Catarina e Paraná
RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto

TERMO DE CONSENTIMENTO E INFORMAÇÃO

A AIDS é uma doença causada pelo vírus HIV e causa uma diminuição das defesas do corpo. Este vírus destrói as células responsáveis pela defesa do organismo, e assim o corpo fica sem uma proteção natural. A contaminação pelo HIV pode ocorrer através da relação sexual desprotegida, de mães grávidas para seus filhos, através da troca de seringas entre usuários de drogas e mais raramente em transfusões de sangue. No início da doença os sintomas podem ser parecidos com os de uma gripe comum. Após alguns anos, outros sintomas mais graves aparecem. Quando o exame para HIV é positivo o médico solicita constantemente outros exames, como carga viral e contagem de células CD4/CD8, para saber se a doença esta progredindo e como o vírus está reagindo aos medicamentos. O vírus HIV esta presente em várias partes do mundo e pode se apresentar de diferentes formas, que são chamadas de subtipos. Dependendo do subtipo do vírus o médico pode utilizar um tipo diferente de tratamento para o paciente. Conhecer o subtipo do vírus é também importante para tentar desenvolver novos tratamentos e vacinas, mas para isso é necessário estudar e pesquisar o vírus presente no sangue de indivíduos portadores. Além disso, alguns vírus apresentam mutações que conferem resistência contra certos medicamentos, tornando esses medicamentos ineficazes contra o vírus.

Este projeto pretende pesquisar o tipo de HIV presente em portadores do Estado de Santa Catarina e Paraná, bem como saber

contra quais medicamentos estes vírus são resistentes. É um estudo inicial e as informações aqui obtidas poderão ajudar estudos futuros a tentarem desenvolver tratamentos mais adequados e vacinas contra esta AIDS. A sua participação neste estudo é muito importante e o senhor/a senhora não terá que pagar nada. O senhor/a senhora está sendo convidado a fazer parte deste estudo juntamente com muitas outras pessoas.

PROCEDIMENTO

Se o senhor/a senhora concordar com a participação, deverá autorizar a utilização do seu sangue em alguns testes para fins desta pesquisa. Será coletado apenas uma pequena quantidade de seu sangue (10 ml) e nada mais. Não haverá qualquer outro procedimento que possa ocasionar desconfortos para o participante a não ser o desconforto da picada da agulha que coletará o sangue. Pedimos também autorização para consultar seu prontuário médico. O benefício deste estudo poderá não ser imediato, porém fornecerá informações a pesquisadores sobre qual é o tipo de vírus que o paciente apresenta e baseado nisto poderão ser desenvolvidos novos tratamentos e vacinas para o HIV, que poderá beneficiar outros pacientes futuramente.

PARTICIPAÇÃO E CONFIDENCIALIDADE

A participação dos pacientes neste estudo é voluntária, confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação. Caso o senhor/a senhora não queira participar, isto não influenciará o tratamento que você tem recebido. Pense bem, faça a pergunta que desejar e esclareça suas dúvidas. Todos os itens deste termo de consentimento e informação serão cumpridos e respeitados pelos pesquisadores envolvidos.

Se você tiver alguma dúvida ou mesmo depois de assinar este documento não quiser mais participar desta pesquisa, pode entrar em contato com qualquer um destes pesquisadores abaixo, comunicar sua decisão e você será excluído da pesquisa:

Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto/Universidade Federal de Santa Catarina –
Fone: 3721-5206

CONSENTIMENTO

Eu recebi uma cópia e li (ou leram para mim) as informações acima descritas. Foram explicados todos os procedimentos deste estudo. Sei que posso perguntar o que desejar e compreendo exatamente que o meu sangue será utilizado para realização de pesquisas sobre o HIV. Sei

também dos possíveis desconfortos e benefícios com a participação neste estudo. Sou livre para autorizar ou não a minha participação neste estudo.

Pesquisador responsável:

Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto

DECLARAÇÃO

Declaro estar ciente das informações ora prestadas, tendo lido atentamente e concordado com o todo teor.

Florianópolis/SC, _____ de _____ de 20__.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Nome completo do paciente: _____

Nome Responsável: _____

RG: _____

CPF: _____

ANEXO 2: Iniciadores utilizados na amplificação do genoma do provírus do HIV por *nested* PCR.

Gene	Região	Sequência do iniciador	Posição em HXB2
<i>Env</i>	gp120/C2V3	Externos: ED5: 5' ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG 3' ED12: 5' AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG 3' Internos: ED31: 5' CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG 3' ED33: 5' TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC 3'	6557 → 6582 7811 → 7782 6817 → 6845 7381 → 7360
<i>Pol</i>	PR/RT	Externos: DP10: 5' TAACTCCCTCTCAGAAGCAGGAGCCG 3' MMRT6: 5' TTTTACATCATTAGTGTGGG 3' Internos: DP16: 5' CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC 3' MMRT5: 5' TAAATTTGATATGTCCATTG 3'	2198 → 2223 3647 → 3628 2253 → 2274 3574 → 3555
<i>Pol</i>	INT	Externos: MMRT7: 5' CATGGGTACCAGCAC 3' MMINT7: 5' TCTCCTGTWTGCARMCCCAATATGT 3' Internos: MMRT2: 5' ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA 3' MMINT6: 5' GGGATGTGTACTTCTGAACTT 3'	4150 → 4164 5267 → 5242 4173 → 4195 5213 → 5193

ANEXO 3: Iniciadores utilizados para o sequenciamento das regiões genômicas do provírus do HIV.

Gene	Região	Sequência do iniciador	Posição em HXB2
<i>Env</i>	gp120/C2V3	ES7: 5' CTGCTGTAAATGGCAGTCTAG 3' ED31: 5'CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG 3' ED33: 5' TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC 3'	6999 → 7020 6817 → 6845 7381 → 7360
<i>Pol</i>	PR/RT	LR49: 5'CAATGGCCATTGACAGAAGA 3' LR51: 5' TGTGGTATTCCTAATTGAACTTCCC 3' LR54: 5' TAGGCTGTACTGTCCATTTAT 3' DP16: 5' CCTCAAATCACTCTTTGGCAAC 3' MMRT5: 5' TAAATTTGATATGTCCATTG 3' DP11: 5' CCTGGCTTYAATTTTACTGGTA 3' SEQRT: 5' ATGGAAAGGATCACCAGCAA 3' LR54F: 5' AYAAATGGACAGTMCAGCCTAT 3'	2616 → 2635 2836 → 2812 3279 → 3259 2253 → 2274 3574 → 3555 2593 → 2572 3005 → 3024 3259 → 3280
<i>Pol</i>	INT	MMRT2: 5' ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA 3' MMINT6: 5' GGGATGTGTACTTCTGAACTT 3' MMINT3: 5' CCCTACAATCCCCAAAAGTCAAG 3' MMINT4: 5'CTTGACTTTGGGGATTGTAGGG 3'	4173 → 4195 5213 → 5193 4653 → 4674 4674 → 4653

ANEXO 4: Sequências utilizadas nas análises filogenéticas e obtidas de *Los Alamos HIV Database*.

Subtipo	Sequência
C	04BR021, 04BR038, 04BR073
B	02BR008, 02BR013, HXB2_copy_LAI, BREPM1035, BREPM1093
F1	93BR020_1, 02BR082, 01BR087,
CRF31_BC	110PA, 04BR137, 04BR142