

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÔNICA MARIA GOMES DA SILVA

**ANÁLISE RETROSPECTIVA DE SUBTIPOS DE HIV-1 EM UMA POPULAÇÃO
PROCEDENTE DE CURITIBA E RELATO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

**CURITIBA
2009**

MÔNICA MARIA GOMES DA SILVA

**ANÁLISE RETROSPECTIVA DE SUBTIPOS DE HIV-1 EM UMA POPULAÇÃO
PROCEDENTE DE CURITIBA E RELATO DE DADOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do título de mestre

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho

Co-orientador: Prof. MSc. Clóvis Arns da Cunha

**CURITIBA
2009**

Silva, Mônica Maria Gomes da
Análise retrospectiva de subtipos de HIV-1 em uma população
procedente de Curitiba e relato de dados epidemiológicos / Mônica
Maria Gomes da Silva. Curitiba. - 2009.
57f.

Orientador: Professor Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná. Setor
de Ciências da Saúde. Programa de Medicina Interna.

1. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida - Brasil. 2. HIV. 3.
HIV-1. 4. HIV2. 5. epidemiologia. 6. Anti-Retrovirais. I. Título. II.
Telles Filho, Flávio de Queiroz.

NLM: WC 503

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SUBTIPOS DE HIV-1 ENCONTRADOS E SUAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS.....	33
TABELA 2 – COMPARAÇÃO DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS ENTRE SUBTIPOS B E NÃO B.....	34
TABELA 3 – FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES PARA ITRN(t)s NOS SUBTIPOS B E NÃO B.....	36
TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES DE ITRNs ENTRE OS SUBTIPOS ENCONTRADOS.....	37
TABELA 5 – FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES PARA NÃO-ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS NOS SUBTIPOS B E NÃO B.....	38
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DAS MUTAÇÕES PARA ITRNNs ENTRE OS SUBTIPOS ENCONTRADOS.....	39
TABELA 7 – MUTAÇÕES NO GENE DA PROTEASE E COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBTIPOS B E NÃO B.....	42
TABELA 8 – MUTAÇÕES NO GENE DA PROTEASE E COMPARAÇÃO ENTRE OS SUBTIPOS.....	44
TABELA 9 – PACIENTES COM FALHA VIROLÓGICA EM USO DE NFV, FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES 30N E 90M DE ACORDO COM SUBTIPO.....	45

LISTA DE SIGLAS

ARV	- antirretroviral
ARVs	- antirretrovirais
AZT	- zidovudina
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRF	- forma recombinante circulante
CRF _{cpx}	- forma recombinante complexa
CRFs	- formas recombinantes circulantes
ddl	- didanosina
d4T	- estavudina
DRV	- darunavir
EFV	- efavirenz
EUA	- Estados Unidos da América
FDA	- <i>food and drug administration</i>
HAART	- terapia antirretroviral altamente eficaz
HIV	- vírus da imunodeficiência adquirida
HIV-1	- vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1
HIV-2	- vírus da imunodeficiência adquirida tipo 2
IDV	- indinavir
IP	- inibidor de protease
IPs	- inibidores de protease
ITRN(t)	- inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo
ITRN(t)s	- inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo/nucleotídeo
ITRNN	- inibidor da transcriptase reversa não-análogo de nucleosídeo
ITRNNs	- inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo
NFV	- nelfinavir
NVP	- nevirapina
PR	- Paraná
RENAGENO	- rede nacional de genotipagem
RTV	- ritonavir

SIVcpz - Vírus da imunodeficiência dos símios que acomete espécies de chimpanzês como *Pan troglodytes troglodytes* e *Pan troglodytes schweinfurthii*).

SIVsm - Vírus da imunodeficiência dos símios que acomete macacos *Sooty mangabey*

TAM - mutação associada aos timidínicos

TDF - tenofovir

TPV - tipranavir

UFPR - Universidade Federal do Paraná

URF - forma recombinante única

URFs - formas recombinantes únicas

3TC - lamivudina

DEDICATÓRIA

Ao Daniel, meu esposo, pelo amor, apoio e lealdade.

À minha mãe Sonia, por me auxiliar desde os primeiros passos
dessa longa caminhada.

A vocês, todo meu amor.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DE HIV-1 NO MUNDO DE ACORDO COM O BANCO DE DADOS LOS ALAMOS / JULHO DE 2009.....	21
FIGURA 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS SUBTIPOS DE HIV-1 NO BRASIL DE ACORDO COM O BANCO DE DADOS LOS ALAMOS / JULHO DE 2009.....	22
FIGURA 3 – FREQUÊNCIA DE SUBTIPOS DE HIV-1 OBSERVADA.....	32
FIGURA 4 – FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES PARA OS ITRN(t)s NOS SUBTIPOS B E NÃO B.....	35
FIGURA 5 – FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES PARA OS ITRN(t)s NOS SUBTIPOS B, C, F E BF.....	37
FIGURA 6 – MUTAÇÕES PARA OS ITRNNs NOS SUBTIPOS B E NÃO B.....	39
FIGURA 7 – MUTAÇÕES PARA ITRNNs NOS SUBTIPOS B, C, F E BF.....	40
FIGURA 8 – MUTAÇÕES NA PROTEASE NOS SUBTIPOS B E NÃO B.....	40
FIGURA 9 – MUTAÇÕES NA PROTEASE NOS SUBTIPOS B E NÃO B.....	41
FIGURA 10 – MUTAÇÕES NA PROTEASE NOS SUBTIPOS B, C, F E BF.....	43
FIGURA 11 – MUTAÇÕES NA PROTEASE NOS SUBTIPOS B, C, F E BF.....	43
FIGURA 12 – VIAS MUTACIONAIS NA FALHA A NFV, DE ACORDO COM O SUBTIPO.....	45

RESUMO

O HIV-1 sofreu grande diversidade genética em todo mundo desde o início da epidemia em 1981. Hoje há descritos 9 subtipos de HIV-1 (A, B, C, D, F, G, H, J e K), além de várias formas recombinantes. Os países que lideram as pesquisas sobre HIV, em especial sobre antirretrovirais e resistência a esses medicamentos apresentam pacientes com infecção pelo subtipo B. Países em desenvolvimento apresentam maior diversidade de vírus e o aumento do número de casos de HIV é maior nestes países que nos desenvolvidos. O Brasil, que fornece acesso gratuito a antirretrovirais a sua população desde 1996, é líder em número de casos de HIV na América do Sul. Estudos brasileiros relatam predomínio da infecção por subtipo B no Brasil, mas apresentando regionalização dos subtipos não B, com maior número de infecção por subtipo F nos estados das regiões norte e nordeste e subtipo C na região sul. O Paraná é um estado da região sul e nenhum dado procedente desta região foi publicado sobre a prevalência de subtipos de HIV. O objetivo deste estudo é relatar a ocorrência de subtipos de HIV-1 numa população do Paraná e avaliar suas características epidemiológicas. Genotipagens de 211 pacientes infectados pelo HIV-1 foram avaliadas quanto aos subtipos. Pacientes que tinham prontuários com dados completos foram selecionados (n=191). As características demográficas e clínicas dos pacientes foram comparadas de acordo com o subtipo. Cento e trinta e dois pacientes apresentaram infecção pelo subtipo B (69.1%), 41 subtipo C (21.5%), 10 subtipo F (5.2%), 7 recombinantes BF (3.7%) e 1 recombinante CF (0.5%). Os pacientes com infecção por subtipo não B eram mais do sexo feminino e heterossexuais, além de apresentarem menos tempo de infecção pelo HIV em comparação aos infectados por subtipo B. Cento e sessenta e um pacientes foram tratados com 3 classes de antirretrovirais e apresentaram falha virológica. As principais mutações de resistência foram avaliadas e comparadas, sendo na transcriptase reversa, os resíduos 41 e 210 mais mutados no subtipo B. Não houve diferença entre frequência de mutações para não-análogos de nucleosídeos entre os subtipos B e não B. Quanto à protease, as posições 10, 32 e 63 apresentaram mais mutações no subtipo B enquanto os resíduos 20 e 36, no não B. Dos pacientes falhados a esquema contendo nelfinavir, houve preferência pela via mutacional L90M para os vírus dos subtipos B e não B. As mutações K65R e V106M, frequentes em alguns estudos de subtipo C, foram raramente observadas. A mutação 63P e 36I, consideradas comuns em vírus dos subtipos B e C brasileiros, respectivamente, foram observadas com maior frequência. Há uma frequência significativa de infecção por subtipo não B no Paraná, com identificação dos subtipos C, F, BF e CB. O subtipo C predomina em mulheres e em heterossexuais.

Palavras-chave: HIV, aids, subtipos, subtipo B, subtipo não B, diversidade genética, antirretroviral, Brasil.

ABSTRACT

Since the beginning of HIV epidemic in 1981, HIV-1 presented rapid viral evolution. Nowadays 9 HIV-1 clades (A, B, C, D, F, G, H, J and K) and many recombinant forms were described. Developed countries, where most research in HIV was done, enrolled mostly patients with infection by HIV-1 subtype B. Resource limited countries have patients with different HIV-1 subtypes and these are places where HIV-1 numbers still increase. Brazil has a history of universal and free access to ARV therapy since 1996. Data from Brazil show that most HIV-1 infections are caused by subtype B, but geographical differences between southern and northern states have been shown, with more subtype C in southern states and subtype F in northern and northeast regions. Parana state is located in Brazil's south region and no data about HIV diversity has been published so far. The primary objective of this study is to describe HIV subtypes in a population from Parana and evaluate its characteristics. Genotypes from 211 patients with confirmed HIV-1 infection were studied. Patients with complete medical charts were selected (n=191). Demographic and clinical characteristics were compared according to HIV-1 subtype. One hundred thirty two patients presented with subtype B infection (69.1%), 41 subtype C (21.5%), 10 subtype F (5.2%), 7 recombinant BF (3.7%) and 1 recombinant CF (0.5%). Patients with subtype B infection had been diagnosed earlier than patients with subtype non B. Also, subtype B infection was more frequent in men who have sex with man, while non B subtypes occurred more frequently in heterosexuals and women. Patients with previous history of 3 classes of ARVs (n=161) intake were selected to evaluate resistance. The most frequent resistance associated mutations (RAM) were compared according to subtype. For transcriptase reverse inhibitors, 41L and 210W were more frequently observed in subtype B than in non B strains. No differences between subtypes and mutations were observed to NNTRIs. Mutations at 10, 32 and 63 position of protease were more observed in subtype B viruses than non B, while positions 20 and 36 of showed more amino acid substitutions in subtype non B viruses. Patients with history of nelfinavir intake were evaluated to resistance pathway. The L90M pathway was more frequent in subtypes B and non B. Mutations previously reported as common in non B viruses, such as 65R and 106M, were uncommon in our study. Mutations 63P and 36I, previously reported as common in HIV-1 subtypes B and C from Brazil, respectively, were common. We conclude that there are a significant frequency of HIV-1 non B infections in Parana state, with isolates classified as subtypes C, F, BF and BC. Patients with subtype C infection were more frequently female and heterosexual.

Key words: HIV, aids, subtypes, subtype B, subtype non B, genetic diversity, antiretroviral, Brazil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 JUSTIFICATIVA.....	11
1.1.1 Justificativa da Pesquisa do Ponto de Vista de Outros Autores.....	11
1.1.2 Fatores que Determinaram a Escolha do Tema.....	12
1.1.3 Contribuição para o Conhecimento Científico.....	13
2 PROBLEMA DE PESQUISA	11
2.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA DE PESQUISA.....	14
2.2 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA DE PESQUISA.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 O HIV NO MUNDO.....	15
3.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (HIV).....	16
3.3 ORIGEM DO HIV.....	17
3.4 A DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV.....	19
3.4.1 Subtipos de HIV.....	19
3.4.2 Subtipos de HIV no Brasil.....	22
3.5 IMPORTÂNCIA DOS SUBTIPOS NO COMPORTAMENTO CLÍNICO E BIOLÓGICO DO HIV.....	23
3.5.1 Subtipos e Inibidores de Protease (IPs).....	24
3.5.2 Subtipos e Inibidores da transcriptase Reversa Análogos (ITRNs) e Não- análogos (ITRNNs) aos nucleosídeos.....	26
3.5.3 Subtipos e Novas Classes: Inibidores de Entrada (Inibidores de Fusão, Inibidores de Correceptores) e Inibidores de Integrase.....	27
4 OBJETIVOS, HIPÓTESES E VARIÁVEIS	28
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	28
4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	28
4.3 HIPÓTESE PRINCIPAL.....	29
4.4 HIPÓTESES SECUNDÁRIAS.....	29
4.5 VARIÁVEIS INDEPENDENTES.....	29
4.6 VARIÁVEIS DEPENDENTES.....	30
5 MÉTODOS	30
5.1 LEVANTAMENTO DE DADOS.....	30
5.2 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	31
6 RESULTADOS	31
6.1 MUTAÇÕES NA TRANSCRIPTASE REVERSA, DE ACORDO COM O SUBTIPO.....	34
6.2 MUTAÇÕES NA PROTEASE, DE ACORDO COM O SUBTIPO.....	40
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
GLOSSÁRIO	59
ANEXO	57

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da epidemia de aids, o HIV evoluiu em diversos subtipos e hoje apresenta-se como mais de 40 subtipos geneticamente distintos localizados em diferentes regiões geográficas do mundo (SPIRA et al., 2003). Questiona-se se as diferenças genéticas observadas entre os subtipos podem acarretar em distintas respostas aos tratamentos ou evolução imunológica (SUCUPIRA et al., 2007; KELLER et al., 2009).

Uma parcela significativa dos estudos conduzidos na área de HIV é procedente dos países com maior prevalência de infecção por subtipo B. Além disso, bancos de dados mundiais de cepas de HIV ainda contam com um menor número de amostras de HIV-1 não B em comparação com a grande disponibilidade de cepas B (RHEE et al., 2006). Assume-se, então, que o maior conhecimento adquirido até hoje sobre tratamento ARV e mutações de resistência aplica-se especialmente ao HIV-1 subtipo B.

No mundo, porém, o subtipo C é o mais prevalente desde o início deste novo milênio, contando com mais de 56% das infecções (SOARES et al., 2002). É frequente nos sudeste e leste africanos e vem ocorrendo com grande frequência na Índia, país que hoje tem a maior prevalência de HIV-1 subtipo C do mundo (JERE et al., 2004) e estima-se que apresentará a maior prevalência de infecção por HIV de todo mundo no ano 2010 (SPIRA et al., 2003).

A distribuição de subtipos de HIV-1 no Brasil é muito dinâmica, sendo o subtipo B predominante no país (BARRETO et al., 2006). Estudos mais recentes apontam uma grande proporção de subtipo não B nos estados das regiões sudeste (MACHADO et al., 2004) e sul, e se questiona um atual aumento da prevalência do subtipo HIV-1 C no país, sobretudo nos estados da região sul (MARTINEZ et al., 2002; LOCATELI et al., 2007).

A variabilidade genética associada à ocorrência de diferentes subtipos virais pode contribuir para uma grande diversidade fenotípica, tropismos celulares distintos, escapes do sistema imune e padrões individuais de resistência às enzimas protease e transcriptase reversa (MARTINEZ et al., 2006; KELLER et al., 2009). Alguns padrões mutacionais específicos têm sido atribuídos a determinados subtipos

(GROSSMAN et al., 2004) e sugerido maior risco de falha virológica (POVEDA et al., 2008). No Brasil, um estudo realizado com doadores de sangue HIV positivos (virgens de tratamento) em São Paulo observou mais mutações de resistência em indivíduos infectados com cepas não B em comparação com B (BARRETO et al., 2006). Outro estudo também brasileiro sugeriu um declínio mais rápido da contagem de células T CD4 e conseqüentemente evolução mais rápida para aids nos pacientes infectados por vírus do subtipo B (SANTORO-LOPES et al., 2000). Alguns ainda têm sugerido pior resposta virológica na infecção por subtipo F em comparação com B (ACCETTURI et al., 2000), enquanto outros sugerem que a infecção pelo subtipo C pode ser menos agressiva que a causada por HIV-1 subtipo B (SUCUPIRA et al., 2001).

No Paraná, poucos casos foram incluídos em amostras de autores que publicaram sobre a região sul do Brasil (SOARES et al., 2003). Estima-se que, como em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, a prevalência de subtipo C também seja significativa (SOARES et al., 2007; LOCATELI et al., 2007), porém ainda não há publicações dessa região. Nosso estudo é o primeiro do Paraná a relatar a ocorrência de diferentes subtipos de HIV-1 e suas características.

1.1 JUSTIFICATIVA

1.1.1 Importância da Pesquisa do Ponto de Vista de Outros Autores

O estudo da variabilidade genética do HIV em regiões distintas do mundo é importante para o entendimento da doença causada por esse vírus. Monitorar a diversidade estrutural do HIV-1 auxilia na compreensão da epidemiologia molecular e no rastreamento do movimento do vírus nos diferentes grupos de risco e eventualmente em novas populações suscetíveis. Além disso, as diferenças genéticas entre os subtipos podem acarretar em respostas imunológicas distintas frente a potenciais vacinas contra o HIV-1, influenciar a resposta ao tratamento antirretroviral, causar resultados falso-negativos em testes diagnósticos ou de

monitoramento da doença e levar a diferenças na progressão da infecção (SUCUPIRA et al., 2007).

O significado clínico das diferenças na infecção por HIV-1 subtipo B em comparação com subtipo não B permanece em investigação, sendo motivo de grande interesse para investigadores de países em desenvolvimento. Diferenças na vitalidade e “*fitness*” viral entre os subtipos trazem perguntas sobre possíveis distinções na resposta clínica frente a diferentes inibidores de protease (SOARES et al., 2003).

A distribuição de subtipos de HIV-1 no Brasil vem sendo estudada em várias regiões. Avaliações filogenéticas sugerem que a introdução do subtipo B ocorreu mais precocemente, seguido pelos subtipos não B (SOARES et al., 2007). Estudos mais recentes apontam uma grande proporção de subtipo não B nos estados do sudeste (MACHADO et al., 2004) e sul e se questiona um atual aumento da prevalência do subtipo C e formas recombinantes (BF e BC) no país, sobretudo nos estados da região sul (MARTINEZ et al., 2002).

1.1.2 Fatores que Determinaram a Escolha do Tema

O avanço no combate da epidemia causada pelo HIV-1 no mundo deve-se a interrelação de fatores como a grande aquisição de conhecimento sobre a patogênese da doença, entendimento do comportamento viral, disponibilização de drogas antirretrovirais potentes e o desenvolvimento e aprimoramento de testes mais precisos para diagnóstico e monitoramento do tratamento (DIAZ, 2006). O inegável benefício da grande disponibilidade de antiretrovirais pode trazer um potencial prejuízo com o crescimento da resistência àqueles medicamentos. No Brasil, em 1996, uma lei garantiu acesso gratuito a ARVs para todo brasileiro infectado pelo HIV que necessitasse de medicação de acordo com os consensos de tratamento da época (TEIXEIRA et al., 2004). A grande maioria dos ARVs aprovados pelo FDA está disponível para uso gratuito no país, sendo que há mais de 140.000 indivíduos em tratamento com tais medicações. Estima-se que a cobertura ARV no Brasil seja 100% (SUCUPIRA et al., 2007).

Uma parcela significativa dos estudos conduzidos na área de HIV é procedente dos Estados Unidos da América (EUA) e oeste europeu. Nestas regiões, a grande maioria dos indivíduos infectados por HIV-1 possui o subtipo B (POND; SMITH, 2009). Após dados de possível comportamento distinto entre as cepas de HIV-1 não B, tem-se dado maior importância à investigação do comportamento de tais vírus em outras populações.

No Brasil foram identificados aproximadamente 433 mil casos de aids, desde o primeiro caso em 1980 até dados de junho de 2006, sendo que 80% deles estão localizados nas regiões sudeste e sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009), locais onde há uma maior prevalência de subtipos não-B.

A maioria dos dados publicados sobre epidemiologia do subtipo não B da região sul do Brasil é constituída de pacientes procedentes dos estados Rio Grande do Sul (SOARES et al., 2007) e Santa Catarina (LOCATELI et al., 2007), com raros casos do Paraná (SOARES et al., 2003). Além disso, o aumento da disponibilização de testes de resistência pela rede nacional de genotipagem (RENAGENO) e a participação do Brasil em estudos clínicos internacionais fez com que pesquisadores tivessem acesso a exames mais sofisticados de identificação genômica do HIV, como genotipagem, fenotipagem e fenotipagem virtual, evidenciando novos padrões mutacionais, o que também contribuiu para despertar o interesse em estudar melhor tais pacientes com subtipos não B procedentes de Curitiba, Paraná.

1.1.3 Contribuição para o Conhecimento Científico

A possibilidade de comportamento distinto do HIV-1 de subtipos diferentes aliada a grande diversidade geográfica dos subtipos faz com que grande interação científica internacional seja fundamental no sucesso do combate à epidemia de aids no mundo.

Dados publicados no Brasil mostram uma diversidade genética viral, com ocorrência de subtipos não B especialmente nas regiões sudeste e sul do país. Em particular, publicações estudando pacientes do Paraná são particularmente raras. Assim, esse trabalho poderá contribuir com informações de pacientes procedentes

do Paraná quanto aos subtipos de HIV nesta região, suas características demográficas e epidemiológicas, além de seu padrão mutacional, podendo servir como referência para estudos acadêmicos nacionais e internacionais.

2 PROBLEMA DE PESQUISA

2.1 DEFINIÇÃO DO PROBLEMA DE PESQUISA

São escassos os dados de caracterização de subtipos de HIV-1 no Brasil, em especial do Paraná. Há relatos da região sul do país incluindo Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Poucos casos procedentes do Paraná foram incluídos em levantamentos da região sul. Não há nenhum relato de perfil de subtipos particularmente das instituições envolvidas neste projeto.

Pode-se definir o problema de pesquisa deste projeto como a necessidade de se conhecer e documentar o perfil de distribuição de subtipos de HIV-1 em Curitiba, bem como relatar e avaliar os dados epidemiológicos encontrados nesta população. Este perfil engloba sexo, raça, faixa etária, fatores de risco para aquisição do HIV, contagens de células T CD4, carga viral do HIV, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV, classificação clínica revisada de 1993 do CDC no momento da realização da genotipagem, história de uso de ARV, classes de ARVs às quais os pacientes foram submetidos e descrição das mutações encontradas, com avaliação da relação padrão mutacional e subtipos encontrados.

2.2 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

Qual é o perfil de subtipos de HIV-1 na população de Curitiba em tratamento no ambulatório de infectologia do Centro Médico São Francisco?

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O HIV NO MUNDO

Embora vários vírus sejam capazes de infectar humanos, a disseminação do HIV nas últimas 4 décadas representa em particular um dos mais catastróficos exemplos de transmissão, emergência, propagação e expansão genômicas já descrito (STEBBING et al., 2007). No início da década de 80, o aparecimento da aids foi o primeiro sinal de uma pandemia que acometeria um imenso número de pessoas causando devastação social e econômica em algumas regiões do mundo. Na África sub-Saariana, por exemplo, no final do século 20, níveis em torno de 30% da população economicamente ativa foi infectada pelo HIV, reduzindo não só sua expectativa de vida, mas também diminuindo o poder econômico dos países acometidos (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

Hoje, mais de 40 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV no mundo (UNAIDS, 2009). No Brasil, maior país da América do Sul, em 2006, foram notificados 7.1 casos de aids por 100.000 habitantes. No Paraná, por sua vez, 5.4 casos por 100.000 habitantes foram relatados no mesmo ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Apesar do grande avanço no entendimento da patogênese do HIV, no uso da terapia antirretroviral, bem como sua ampla disponibilidade especialmente em países desenvolvidos, além dos progressos atingidos na tentativa de elaboração de vacinas, a emergência de resistência viral tem assombrado a estimativa de erradicação da infecção. Exposição a múltiplos regimes ARVs, especialmente os pacientes tratados no início da década de 90 expostos a terapia ARV com apenas uma classe e antes da disponibilização da terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART), faz com que hoje vários pacientes apresentem infecção por vírus com mutações de resistência a múltiplas classes de ARVs (RODRIGUES et al., 2005).

Apesar dos avanços, até o presente momento, estima-se que o HIV continuará por alguns anos impondo à humanidade um fardo de morte e morbidade (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

3.2 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (HIV)

Há 2 retrovírus humanos distintos, HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 o responsável pela epidemia global da aids (KANTOR; KATZENSTEIN, 2006). O HIV-2, por sua vez, é restrito a áreas definidas do oeste da África e região central, além de pessoas de outros locais do mundo que possuam algum evento epidemiológico relacionado com essa região do continente africano (POND; SMITH, 2009).

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero Lentivírus. Os retrovírus compreendem vários vírus encontrados em todos os vertebrados. Além dos retrovírus humanos, existem pelo menos 18 vírus causadores da Imunodeficiência dos Símios que acometem primatas não humanos (FAUCI¹, apud KANTOR, 1997, p-152). São características importantes dos retrovírus: sua capacidade de passar informação genética de RNA para DNA e integrar o DNA no genoma do hospedeiro. Assim, os retrovírus são capazes de estabelecer infecção persistente no hospedeiro mesmo frente a sua resposta imunológica bem como penetrar na linhagem germinativa, permitindo então transmissão vertical do vírus (GOFF, 2004).

O HIV é um retrovírus atípico, já que vários retrovírus são relativamente benignos e raramente matam as células infectadas. O HIV, por sua vez, é citopático e citotóxico, e altos níveis de expressão genética viral resultam em morte das células infectadas e algumas vezes até das células vizinhas (GOFF, 2004).

O genoma dos Lentivírus possui como característica comum a presença de três genes estruturais, *gag*, *pol*, *env*. O gene *gag* é responsável pela codificação das proteínas do capsídeo viral, o gene *pol*, pelas enzimas envolvidas no ciclo de replicação e o gene *env*, pelas proteínas do envelope viral. Ainda, os Lentivírus possuem além dos genes estruturais descritos, genes adicionais regulatórios e acessórios, sendo, no HIV-1, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

Na prática clínica, a variabilidade genética do HIV pode ser avaliada por métodos laboratoriais. A genotipagem é um exame com coleta de amostra sanguínea que demonstra sequências específicas de nucleotídeos que determinam os genes do HIV-1. A fenotipagem é um exame laboratorial com coleta de sangue e avaliação do comportamento replicativo do vírus em cultura, frente a diferentes

1 FAUCI, A. S.; DESROSIERS, R. C. Pathogenesis of HIV and SIV. In: Coffin, J. M.; Hughes, S. H.; Varmus, H. E. **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 587-636.

concentrações de ARVs. Já a fenotipagem virtual é um teste de genotipagem cujo resultado é submetido a bancos de dados que contêm amostras que possuem resultados de genotipagem e fenotipagem. O sistema de informática é capaz de procurar no banco de dados a sequência que mais se assemelhe à sequência genômica testada. Como cada sequência do banco de dados possui uma fenotipagem equivalente, o resultado da resistência fenotípica do banco de dados é atribuído ao paciente em teste. Fornece-se então o resultado do teste no formato de fenotipagem (DIAZ, 2006).

3.3 ORIGEM DO HIV

O estudo filogenético dos retrovírus de primatas permitiu que a história evolutiva dos HIV-1 e 2 fosse reconstruída de forma detalhada nos últimos anos. Foi demonstrado que os vírus HIV são relacionados com vírus da imunodeficiência dos símios (SIV) distintos, sendo o HIV-1 relacionado com o SIV de chimpanzés (SIVcpz) e o HIV-2 semelhante ao SIV de macacos fulgentos ou *Sooty Mangabey* (SIVsm) (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

O SIVcpz é prevalente em algumas espécies de chimpanzés que habitam partes da África Ocidental (*Pan troglodytes troglodytes*) e Central (*Pan troglodytes schweinfurthii*). Este vírus possui uma relação filogenética muito próxima ao HIV-1 grupo M e habita a mesma área do continente africano onde existe a maior diversidade genética do vírus HIV-1, com a presença dos grupos M (*main*), N (*new*) e O (*outlier*). O SIVsm infecta macacos que habitam regiões da África Ocidental, local de onde mais provavelmente o HIV-2 emergiu (STEBBING et al., 2007).

Vários fatores participam no estabelecimento de uma nova doença emergente, podendo ser divididos em aqueles fundamentais para a transmissão de um determinado patógeno para um novo hospedeiro e aqueles necessários para o estabelecimento da infecção no novo hospedeiro, com possibilidade de transmissão e desencadeamento de uma epidemia (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

A similaridade genética é um fator importante na transmissão de um patógeno entre hospedeiros. Assim, a chance de transmissão de um determinado

agente entre espécies evolutivamente próximas é maior que nas distantes (LEAL; JANINI, 2006).

Outros fatores ambientais também são necessários para favorecer a transmissão do patógeno ao novo hospedeiro, como migrações, destruição de colonização de ambientes naturais, falta de infra-estrutura sanitária, crescimento populacional desordenado e conflitos populacionais. Um exemplo disso é a suposição do surgimento do HIV-2 entre 1940 e 1945 na África Ocidental pela transmissão zoonótica do SIVsm, num período que coincide com a Guerra da Independência (1963-1974) da Guiné-Bissau, antiga colônia portuguesa. A participação do conflito na disseminação do HIV-2 poderia ser atribuída pela desestruturação sócio-econômica estabelecida pelo conflito, fazendo com que pessoas buscassem recursos energéticos em espécies de fauna nativa, incluindo primatas infectados pelo SIVsm (LEAL; JANINI, 2006).

Os vírus HIV-1 e HIV-2 foram transmitidos aos humanos através de hospedeiros diferentes. Análises de sequências mostram que muito provavelmente existiram vários eventos de transmissão entre espécies no estabelecimento da infecção por HIV em populações humanas. Estima-se que para o HIV-2 tenham ocorrido pelo menos 4 cruzamentos, enquanto que para o HIV-1, pelo menos 3. Esses 3 cruzamentos distintos supostamente ocorridos poderiam explicar os 3 grupos de HIV-1 em humanos, com origens evolutivas distintas (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

De acordo com características filogenéticas, o HIV pode ser dividido em 3 grupos principais, nomeados M (*main, major*), O (*outlier, outlying*) e N (*new, novel* ou *non-M, non-O*) (WAINBERG, 2004, STEBBING et al., 2006).

Estudos de sequenciamento e filogenéticos estimam que o HIV-1 grupo M tenha surgido em torno de 1930. O uso de amostras-arquivo demonstrou que a sequência de HIV-1 do grupo M mais antiga disponível foi obtida de amostra da República Democrática do Congo em 1959. Ainda, espera-se que a diversificação do HIV-1 grupo M em 9 subtipos filogeneticamente equidistantes, com distâncias genéticas de 10 a 30%, tenha ocorrido antes de 1959 (LEAL; JANINI, 2006).

Novas avaliações de amostras colhidas em regiões de todo mundo, sobretudo na África, mostraram que determinados vírus não poderiam ser classificados como nenhum subtipo descrito até o momento, sendo classificados

entre os subtipos, também chamados de sub-subtipos, reforçando hipóteses de que a árvore contemporânea da filogenética do HIV é influenciada por limitações de amostragem das sequências virais (RAMBAUT et al., 2001).

3.4 A DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV

A extensa diversidade genética do HIV é decorrente de múltiplos fatores, alguns próprios do patógeno, outros dependentes do hospedeiro. O HIV possui como característica elevada taxa de mutação, na ordem de 10^{-3} a 10^{-5} por nucleotídeo, por ciclo de replicação, o que equivale à incorporação de um nucleotídeo errado a cada mil ou cem mil bases copiadas. Isto ocorre à ausência de atividade revisora das enzimas RNA polimerase e transcriptase reversa viral (JANINI, 2006).

Além disso, o HIV possui um tempo de geração muito curto, propensão para recombinação genômica e é capaz de constituir populações virais de tamanho muito grande. Apesar da maioria das mutações produzirem mutantes com desvantagens replicativas, alguns podem apresentar vantagens e replicação mais eficiente do que os que apresentam mutações deletérias, promovendo um equilíbrio seletivo (SPIRA et al., 2003).

3.4.1 Subtipos do HIV

Os vários subtipos do HIV são exemplos de sua grande diversidade genética.

O grupo O do HIV-1 consiste em vírus altamente divergentes, mas geneticamente relacionados. As infecções por patógenos deste grupo são limitadas aos habitantes da África Central, especialmente Camarões e países vizinhos, além de pessoas com conexões epidemiológicas com esta área. Mesmo nesta região, o

grupo O representa a minoria das infecções por HIV e não é dividido em subtipos (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

Somente três genomas completos do HIV-1 grupo N estão disponíveis. Representam casos individuais e não são divididos em subtipos (LEAL; JANINI, 2006).

O grupo M é responsável por mais de 90% das infecções por HIV-1 em todo mundo e é subdividido, por sua vez, em nove principais subtipos (WAINBERG, 2004), também chamados de clades ou subtipos filogenéticos denominados por letras: A, B, C, D, F, G, H, J e K (ROBERTSON et al.; 2000). As letras E e I não se encontram nessa seqüência pois descobriu-se que na verdade vírus anteriormente assim classificados representavam formas recombinantes e sua nomenclatura foi modificada (SUCUPIRA; JANINI, 2006). O subtipo D também poderia ser considerado um subtipo do B por sua estrutura genômica, porém permanece classificado como um subtipo distinto. (SPIRA et al., 2003).

Para alguns subtipos do grupo M uma subdivisão filogenética ainda é possível, levando a criação dos sub-subtipos, sendo os já descritos A1, A2, F1 e F2 (SUCUPIRA; JANINI, 2006).

Em alguns locais do mundo cepas de grupos e subtipos distintos co-circulam. Com isso, surgimento de cepas chamadas recombinantes vem sendo estudadas, ou seja, cepas que apresentam agrupamentos de diferentes subtipos de acordo com a região do genoma analisada. Na verdade, sabe-se que hoje 25% das novas infecções por HIV ocorrem por vírus de cepas recombinantes (SPIRA et al., 2003).

As formas recombinantes podem ser classificadas em únicas e circulantes. As formas recombinantes únicas (URFs) foram descritas em indivíduos com história epidemiológica comum e não demonstram potencial epidêmico. Já foram descritas aproximadamente 30 URFs globalmente (LEITNER et al., 2005).

Formas recombinantes que apresentam potencial de se estabelecer, serem transmitidas e produzirem novos focos epidêmicos são chamadas de formas recombinantes circulantes (CRFs). São designadas por números, em ordem de descoberta, e letras dos subtipos que as constituem. No caso de serem constituídas por mais de 2 subtipos, dá-se a denominação de CRFs complexas (CRFcp). Existem atualmente 43 CRFs descritas (Los Alamos database, 2009).

A distribuição dos subtipos nas várias regiões geográficas do mundo é heterogênea. A figura 1 demonstra a localização geográfica dos subtipos no mundo, de acordo com o banco de dados Los Alamos (Los Alamos, 2009). Os subtipos A e A/G predominam na África Central e Oeste. Os vírus do subtipo D geralmente encontram-se limitados à África central e leste. O subtipo F foi relatado na África central, leste europeu e América do Sul, incluindo Brasil. Vírus do subtipo G e formas recombinantes A/G vêm sendo observados no oeste e leste africanos, além da sua ocorrência na região central da Europa. Os subtipos H, J e K têm distribuição mais exclusiva em determinadas regiões: África Central, América Central e Congo e Camarões, respectivamente. O subtipo B é o subtipo predominante na Europa e nas Américas, inclusive nos EUA, de onde vem a maioria dos estudos em HIV. No mundo, porém, o subtipo C é o mais prevalente desde o início deste novo milênio, contando com mais de 56% das infecções. É freqüente nos sudeste e leste Africanos e vem ocorrendo com grande freqüência na Índia, país que hoje tem a maior prevalência de HIV-1 subtipo C do mundo (JERE et al., 2004) e estima-se que apresentará a maior prevalência de infecção por HIV de todo mundo no ano 2010 (SPIRA et al., 2003).

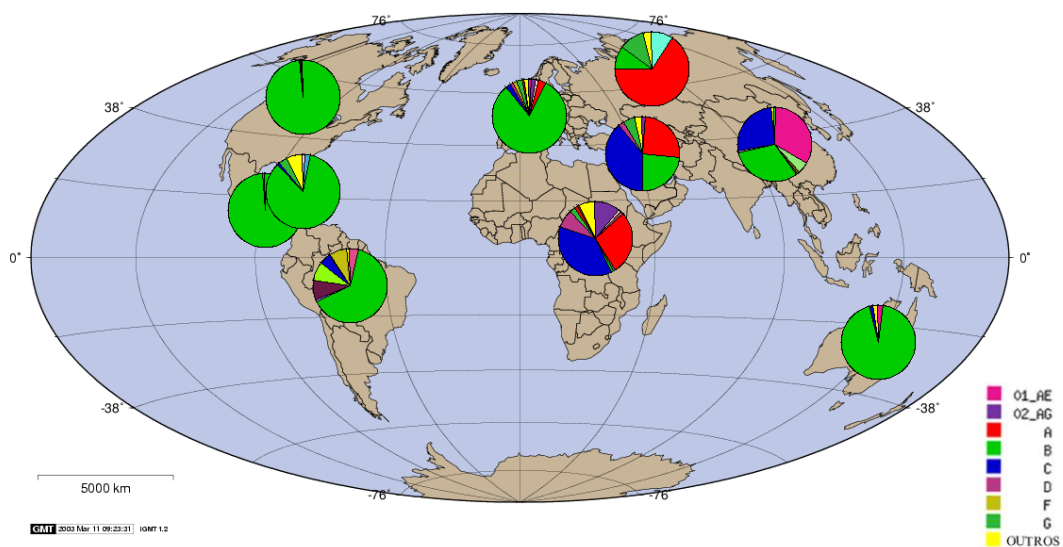


Figura 1: Distribuição dos subtipos de HIV-1 no mundo de acordo com banco de dados Los Alamos / julho de 2009. Adaptado de Los Alamos Database 2009.

3.4.2 Subtipos de HIV no Brasil

A distribuição de subtipos de HIV-1 no Brasil vem sendo estudada e aparentemente é bastante complexa. As principais formas circulantes no país são B (maior prevalência), C, F e formas recombinantes B/C e B/F vêm sendo documentadas (SOARES et al., 2002). Subtipo C foi primeiro relatado nas cidades de Porto Alegre e São Paulo em 1994, porém análises retrospectivas de amostras armazenadas mostram a ocorrência deste subtipo no Brasil já em 1992 (SOARES et al., 2007). O subtipo C têm sido observado em pacientes infectados por HIV-1 no Brasil especialmente procedentes da região sul (SOARES et al., 2003). Um estudo recente, entretanto, observou a ocorrência 28.6% de subtipo C em amostras de pacientes procedentes de estados das regiões Sul e Sudeste. Este estudo incluiu apenas 2 pacientes procedentes do Paraná, ambos subtipo B (SOARES et al., 2003).

Uma vez que múltiplos subtipos circulam no Brasil, estudos têm demonstrado emergência de formas recombinantes (SUCUPIRA et al., 2007; BRENNAN et al., 2007).

Em banco de dados internacionais, a prevalência de subtipo C no Brasil como um todo é baixa, sendo de aproximadamente 8% (Los Alamos database, 2009) (figura 2).

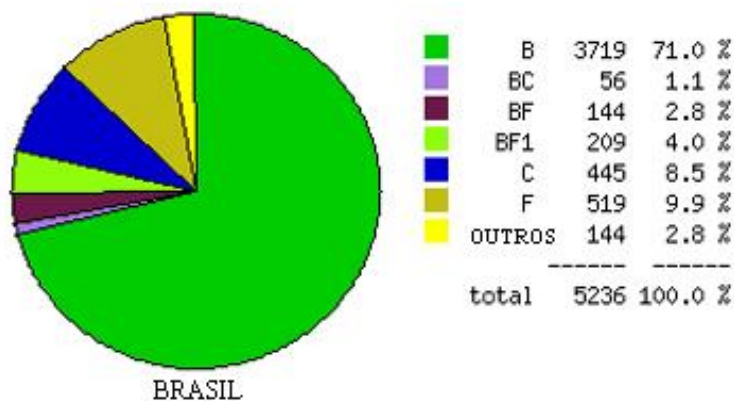


Figura 2: Distribuição dos subtipos de HIV-1 no Brasil de acordo com banco de dados Los Alamos / julho de 2009. Adaptado de Los Alamos Database 2009.

3.5 IMPORTÂNCIA DOS SUBTIPOS NO COMPORTAMENTO CLÍNICO E BIOLÓGICO DO HIV

Não há um consenso se a diversidade genética do HIV-1 tem importância não só para o entendimento da sua mutagenese e origem geográfica distinta, mas se há um impacto maior na diversidade clínica e comportamento biológico “in vivo”. (MERSON; PIOT, 2005) Porém, particularidades do comportamento dos vírus de diferentes subtipos são importantes para o desenvolvimento de vacinas, bem como para o entendimento das diferentes respostas aos antirretrovirais (TAYLOR et al., 2008).

A grande variabilidade genética associada à ocorrência de diferentes subtipos virais pode contribuir para uma grande diversidade fenotípica, tropismos celulares distintos, escapes do sistema imune e padrões individuais de resistência às enzimas protease e transcriptase reversa (CILLIERS et al., 2002). Alguns padrões mutacionais específicos têm sido atribuídos a determinados subtipos (GROSSMAN et al., 2004). No Brasil, um estudo realizado com doadores de sangue HIV positivos (virgens de tratamento) em São Paulo observou mais mutações de resistência em indivíduos infectados com cepas não-B em comparação com B (BARRETO et al., 2006). Outro estudo também brasileiro sugeriu um declínio mais rápido da contagem de células T CD4 e conseqüentemente evolução mais rápida para aids nos pacientes infectados por vírus do subtipo B (SANTORO-LOPES et al., 2000). Alguns ainda têm sugerido pior resposta virológica na infecção por subtipo F em comparação com B (ACCETTURI et al., 2000), enquanto alguns sugerem que a infecção pelo subtipo C pode ser menos agressiva que a causada por HIV-1 subtipo B (SUCUPIRA et al., 2001).

Há evidência de que alguns subtipos tenham vantagens quanto à transmissibilidade, enquanto outros apresentam maior capacidade replicativa (GERETTI, 2006). Uma tendência maior de transmissão intra-útero tem sido atribuída a cepas de HIV-1 grupo M subtipo C (RENJIFO et al., 2004), assim como evidência de que cepas do subtipo C tenham vantagens replicativas em células do epitélio cervical, quando comparado com subtipo A. Este fato poderia ser uma das explicações possíveis para o recente aumento de infecções por subtipo C no mundo,

já que a grande maioria das novas infecções são decorrentes de transmissão heterossexual (IVERSEN et al., 2005). No Reino Unido, em especial, nota-se um aumento nos casos de infecções por subtipo não B em grupos étnicos específicos, heterossexuais (GERETTI et al., 2009).

3.5.1 Subtipos e Inibidores de Protease (IPs)

Estudos usando diferentes métodos de fenotipagem têm avaliado a susceptibilidade dos subtipos não-B aos diferentes IPs. Em alguns trabalhos, a IC₅₀ dos pacientes virgens de tratamento ARV é de 3 a 40% maior nos pacientes infectados por HIV-1 não-B comparando-se com os infectados por HIV-1 subtipo B (HOLGUIN et al., 2006).

A substituição E35D foi associada à diminuição da susceptibilidade ao nelfinavir (NFV) no subtipo CRF02_AG. Ainda, alguns relatos de pacientes da África infectados pelos vírus variantes CRF02_AG apresentando naturalmente 20I e 36I no gene da protease, tiveram diminuição da susceptibilidade aos IPs NFV e lopinavir (LPV), além de, em menor intensidade, a indinavir (IDV), ritonavir (RTV) e amprenavir (APV) (SUCUPIRA et al., 2001). Essa mesma CRF não mostrou a presença da mutação D30N na falha a NFV (MARTINEZ-CAJAS et al., 2009).

Baixa freqüência de D30N foi notada em vírus subtipo C de Israel com falha a NFV em comparação aos vírus do subtipo C de Botsuana (DOUALLA-BELL et al., 2006; GROSSMAN et al., 2004).

Mudanças nos códons 20, 36 e 82 ocorrem naturalmente em alguns vírus não B e podem influenciar a resposta virológica ao LPV/r. As substituições V82A/F/T/S foram significativamente mais frequentes em subtipos F1 que nos vírus de subtipo B em amostras do Brasil (SOARES et al., 2003). Ao contrário das substituições V82A/F/T/S do subtipo B, a mutação 82M é relacionada a falha a IP no subtipo G (DUMANS et al., 2004).

Foi observado que mudanças nos códons 20I e 36I ocorrem geralmente juntas nos vírus subtipo G e CRF02_AG e são fortes preditoras de falha a esquema ARV com IPs em 40% dos pacientes que foram submetidos a um primeiro esquema

ARV não reforçados com RTV (HOLGUIN et al., 2006). A mutação M36I ocorre em 12% dos pacientes infectados por HIV-1 M subtipo B, mas em até 80% dos não-B, podendo ser considerado um marcador genético do subtipo não-B (HOLGUIN et al., 2002). No Brasil, foi demonstrada alta frequência da mutação M36I na protease de vírus subtipo C em pacientes não expostos a terapia ARV e, para o subtipo B, ela é considerada uma mutação acessória ou menor que pode contribuir para resistência a alguns ARVs (SOARES et al., 2003.; JOHNSON et al., 2008).

Sugere-se que a probabilidade de acúmulo da 90M após uma falha com IP seja associada à presença da 36I no período pré-tratamento e, possivelmente, 10I/V. Assim, a presença da 36I poderia prever o surgimento da 90M na ocorrência de uma falha virológica (PERNO et al., 2004).

Um estudo com 556 amostras de vírus não B em pacientes não-experimentados a esquema ARV mostrou que 20% (subtipos C, D, CRF01_AE) a 70% (subtipos G, J e CRF02_AG) apresentavam mais substituições menores do gene da protease comparados com os vírus do subtipo B ($p < 0.001$), influenciando a resposta terapêutica a NFV, ATV e RTV (VAN DE VIJVER¹ apud HOLGUIN, 2006, p-99).

Um exemplo de diminuição de barreira genética foi observado com resposta a tipranavir (TPV) nos pacientes com subtipos não-B. Várias mutações no gene da protease, incluindo os resíduos 20 e 36, aumentariam o escore mutacional do TPV nos subtipos filogenéticos A, C, F e G (POVEDA et al., 2008).

KANTOR et al relatou que as posições mais frequentemente mutadas da protease dos vírus subtipos não-B incluem a posição 14 no subtipo A, 13 e 64 no subtipo C, 37 e 65 no subtipo F, 71 no subtipo G, 62 e 64 no subtipo CRF01_AE e 15 e 17 no subtipo CRF02_AG. Por outro lado, posições menos frequentemente mutadas em subtipos não-B após exposição a ARVs incluem as posições da protease 10, 20 e 63 no subtipo A, 20, 53, 63, 74 e 82 no subtipo C, resíduos 13 e 20 no subtipo D, 10, 14, 20 e 77 no subtipo F, 20, 67, 73, 82 e 88 no subtipo G, 20, 63, 82 e 89 no subtipo CRF_01AE e 20 no subtipo CRF_02AG (KANTOR, 2005).

¹ VAN DE VIJVER, D.; WENSING, A.; ANGARANO, G. Differences in the frequency of minor substitutions between HIV-1 subtypes and their potential impact on the genetic barrier for resistance to PI. **Antiviral Therapy**, London, v. 10, p. S145, 2005.

Determinadas assinaturas moleculares distintas das observadas internacionalmente foram relatadas por SOARES et al em 2003 como específicas do subtipo C procedente do Brasil. As mutações S12T, I19L, N37K e R41N se mostraram específicas do subtipo C do Brasil, não sendo vistas em subtipos C de outros países. Ainda, para o subtipo B do Brasil, notou-se alta frequência da mutação L63P/H/A.

Hiper-susceptibilidade também tem sido observada de acordo com o subtipo avaliado. O teste de fenotipagem da Virco® observou aumento da sensibilidade do vírus a NFV na CRF02_AG com a presença da K70R, sendo que esse polimorfismo apareceu naturalmente nestas cepas (HOLGUIN et al., 2006).

3.5.2 Subtipos e Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos (ITRNs) e Não-análogos aos Nucleosídeos (ITRNNs)

Os dados de comportamento genético dos vírus não-B em relação aos ITRNs são controversos. Alguns estudos notaram maior frequência de mutações associadas aos timidínicos (TAMs) M41L e L210W em vírus subtipo B que cepas C em um estudo realizado no sul do Brasil (SOARES et al., 2003). Por outro lado, pacientes de Botsuana tratados com AZT e ddl infectados por HIV-1 subtipo C apresentaram uma via distinta de aquisição de TAMs, com mutações 67N, 70R, 215Y (NOVITSKY et al., 2007).

A incidência de K65R in vitro é maior em pacientes do subtipo C comparado ao subtipo B. Um estudo de Botsuana observou 30% de prevalência da mutação K65R em pacientes infectados pelo HIV-1 subtipo C falhados a esquema com d4T e ddl, com NVP ou EFV (DOUALLA-BELL et al., 2007). Outros estudos da Índia, Israel, África do Sul e Botsuana não demonstraram essa alta ocorrência de K65R, sendo também rara em vírus do subtipo A (BARTH et al., 2008; DESHPANDE et al., 2007; GROSSMAN et al., 2007; GUPTA et al., 2005; SUNPATH et al., 2008; SEM et al., 2007).

Algumas mutações foram observadas pré e pós-tratamento em pacientes com infecção por subtipo C na Índia, sendo mais frequentes pós-tratamento,

sugerindo um papel de resistência naquele subtipo. São elas: E203D/K/V/N/A, H208Y e H221Y (DESHPANDE et al., 2007).

A V106M é a mutação-assinatura do subtipo filogenético C após a exposição a efavirenz (EFV), ao contrário da V106A do subtipo B (GROSSMAN et al., 2004). Uma explicação para a facilidade de ocorrência desta substituição é o uso diferente do aminoácido valina pelos subtipos B e C (GTG e GTA respectivamente). Os vírus do subtipo filogenético C precisam apenas de uma substituição de nucleosídeo (ATG) enquanto os B precisam de duas (POND; SMITH, 2009).

Em pacientes infectados pelo HIV-1 procedentes de Israel notou-se que a mutação G190A/S foi considerada um polimorfismo natural (DESHPANDE et al., 2007). Essa mutação contribui para resistência a NVP, ETR e EFV nos vírus do subtipo B (JOHNSON et al., 2008). Na Índia, essa mutação foi mais freqüente nos vírus subtipo C de pacientes falhados a esquemas com ITRNNs (GROSSMAN et al., 2004). No Brasil, não foi demonstrada a presença dessa mutação como freqüente em pacientes com infecção por subtipo C não experimentados ou tratados com ARVs (SOARES et al., 2003).

3.5.3 Subtipos e novas classes: inibidores de entrada (inibidores de fusão, de co-receptores e integrase)

Apesar da grande variação genética da gp41 nos vírus do grupo O, a atividade da enfuvirtida (T20) não parece ser comprometida, tendo sido demonstrada susceptibilidade *in vitro* da T20 em vírus dos subtipos A, C, D, F, G, J e CRF02_AG (SUCUPIRA et al., 2006).

Recentemente, foram avaliadas cepas de HIV-1 subtipo B, C e F do Brasil para verificação de resistência em pacientes nunca expostos a ARVs e presença de polimorfismos que poderiam diminuir a resposta ao tratamento com essa nova classe de medicamentos. As mutações V72I e V201I foram observadas, consideradas polimorfismos, sem impacto na resposta aos inibidores de integrase, reforçando seu uso no Brasil (PASSAES et al., 2009).

4 OBJETIVOS, HIPÓTESES E VARIÁVEIS

4.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Analisar a ocorrência de diferentes subtipos de HIV-1 em uma amostra de pacientes que disponham de testes de genotipagem de amostras colhidas em Curitiba e relatar os dados epidemiológicos e demográficos.

4.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar o subtipo de HIV-1 encontrado nos exames dos prontuários analisados;

Relatar o perfil epidemiológico dos pacientes através de dados contidos nos prontuários, com informações sobre sexo, idade, raça, data do diagnóstico do HIV, fator de risco para aquisição do HIV, contagem de CD4, CV, tempo de uso de ARVs, classificação clínica da doença de acordo com o CDC (classificação revisada de 1993);

Relatar a frequência das principais mutações de resistência nos genes da protease e transcriptase reversa nos subtipos encontrados;

Comparar os dados epidemiológicos e demográficos dos pacientes com infecção por HIV-1 subtipos B e não B;

Comparar a frequência das mutações de resistência nos genes protease e transcriptase reversa nos subtipos B e não B experimentados a 3 classes de ARVs;

Comparar a utilização das vias mutacionais D30N e L90M nos pacientes falhados a nelfinavir com infecção por subtipos B e não B;

4.3 HIPÓTESE PRINCIPAL

Há em uma população procedente de Curitiba subtipos distintos de HIV-1.

4.4 HIPÓTESES SECUNDÁRIAS

Há uma população de pacientes com subtipo não-B procedente de Curitiba

Há diferenças epidemiológicas e demográficas entre os pacientes com infecções por diferentes subtipos em Curitiba

Há diferenças nas frequências de determinadas mutações de resistência entre os pacientes com infecção por HIV-1 subtipo B e não B procedentes de Curitiba

Há diferenças no padrão de uso de via mutacional na falha a nelfinavir para os pacientes com subtipos B e não B

4.5 VARIÁVEIS INDEPENDENTES

Faixa etária dos pacientes

Sexo dos pacientes

Fatores de risco para aquisição do HIV-1

Grau de classificação do CDC

Contagem de células T CD4

Tempo de uso de ARV

Carga viral do HIV-1

Subtipos de HIV-1

Método da genotipagem

Tempo de infecção pelo HIV

Mutações no gene da transcriptase reversa

Mutações no gene da protease

4.6 VARIÁVEIS DEPENDENTES

Prevalência dos subtipos de HIV-1 na população estudada
Relação entre presença de mutações e subtipos

5 MÉTODOS

5.1 LEVANTAMENTO DE DADOS

Pacientes com diagnóstico de infecção pelo HIV-1 atendidos no ambulatório de infectologia do Centro Médico São Francisco que apresentaram exame de genotipagem com determinação de subtipo do HIV-1 entre janeiro de 2003 a janeiro de 2009 foram selecionados. Estes pacientes eram procedentes de serviços de atendimento de infectologia públicos e privados.

Duzentos e dezenove pacientes foram inicialmente avaliados. Os critérios de elegibilidade foram idade maior que 18 anos, diagnóstico prévio de infecção pelo HIV-1, apresentar exames de genotipagem disponível, apresentar prontuário com dados demográficos e clínicos (sexo, idade, risco para aquisição do HIV-1, classificação pelo CDC, contagem de células T CD4, carga viral, história de uso de antirretrovirais) completos.

A genotipagem e determinação do subtipo foi realizada por análise do gene *pol*, pelos métodos VircoType HIV-1® e PhenoSense GT® , com seqüenciamento de toda a protease e posições 1 a 400 da transcriptase reversa.

Dados clínicos e demográficos dos pacientes foram analisados (sexo, idade, fator de risco para aquisição do HIV-1, contagem de CD4, carga viral, data do diagnóstico da infecção pelo HIV-1, classificação da infecção pelo CDC, histórico detalhado de uso de antirretrovirais).

Os pacientes foram avaliados quanto ao uso prévio de ARVs. Apenas os pacientes com história prévia de exposição a três classes de ARVs (inibidores da

transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos, não-análogos e inibidores de protease) e falha virológica foram avaliados quanto à frequência de mutações associadas a resistência (MAR) aos ARVs. Falha virológica foi definida como carga viral acima do limite de detecção do método utilizado em duas coletas distintas, após período de supressão virológica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

5.2 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias e desvios padrões (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis qualitativas). Para a avaliação da associação entre duas variáveis qualitativas considerou-se o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Para a comparação de dois subtipos em relação a variáveis quantitativas foi usado o teste t de Student para amostras independentes. O nível de significância adotado foi de 0,05, sendo corrigido por Bonferroni para as comparações múltiplas.

6 RESULTADOS

Das 211 genotipagens disponíveis, 191 exames foram selecionados pois correspondiam a pacientes com dados epidemiológicos completos. Pacientes que apresentavam mais de um teste de resistência foram avaliados pelo total de mutações apresentadas nas genotipagens históricas e atual.

Os pacientes foram diagnosticados para infecção pelo HIV entre 1987 e 2008, apresentando de 20 a 72 anos, sendo 140 do sexo masculino e 51 do sexo feminino.

Na tabela 1 são apresentadas as estatísticas descritivas das variáveis idade, sexo, risco, raça, classificação clínica pelo CDC, tempo de diagnóstico da infecção

pelo HIV-1, contagem de CD4 e carga viral para cada um dos subtipos observados na amostra.

Dos 191 pacientes, 132 (69.1%) apresentavam infecção por subtipo B e 59 (30.9%) por subtipo não-B. Destes, 41 (21.5%) apresentam subtipo C, 10 (5.2%) subtipo F, 7 (3.7%) recombinante BF e 1 (0.5%) recombinante CF (figura 3).

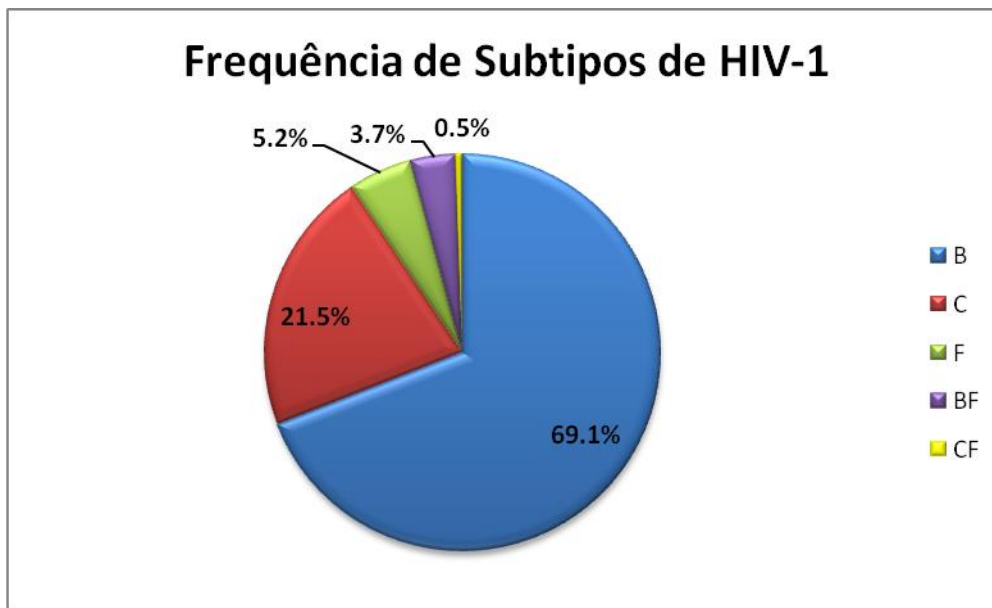


Figura 3: Frequência de subtipos de HIV-1 observada

Tabela 1: Subtipos de HIV-1 encontrados e suas características clínicas e demográficas

Variável	Classificação	Subtipo				
		B (n=132)	C (n=41)	F (n=10)	BF (n=7)	CF (n=1)
Idade	Média±dp	42,0 ± 9,7	40,6 ± 8,7	43,2 ± 8,4	36,9 ± 8,1	24
Sexo (%)	Masculino	108 (81,8)	24 (58,5)	4 (40,0)	4 (57,1)	0
	Feminino	24 (18,2)	17 (41,5)	6(60,0)	3 (42,9)	1
Risco (%)	HSH	68 (51,5)	9 (22)	2 (20,0)	1 (14,3)	0
	Hetero	63 (47,7)	31 (75,6)	8 (80,0)	6 (85,7)	1 (100)
	DIV	0	1 (2,4)	0	0	0
	Congênito	1 (0,8)	0	0	0	0
Raça (%)	Branca	118 (89,4)	38 (92,7)	10 (100)	7 (100)	1 (100)
	Negra	14 (10,6)	3 (7,3)	0	0	0
Classificação pelo CDC (%) (estadio clínico)	A	60 (45,4)	23 (56,2)	6 (60,0)	1 (14,3)	1 (100)
	B	31 (23,5)	9 (21,9)	2 (20,0)	2 (28,6)	0
	C	41 (31,1)	9 (21,9)	2 (20,0)	4 (57,1)	0
Tempo de diagnóstico (anos)	Média±dp	9,0 ± 5,0	7,0 ± 3,8	8,0 ± 4,0	7,1 ± 3,4	4,0
CD4 (cél/mm ³)	Média±dp	222 ± 134	237 ± 130	263 ± 133	236 ± 163	498
Carga Viral (cópias/mL)	Média±dp	99,700 ± 210,344	114,853 ± 224,916	132,536 ± 238,279	59,165 ± 97,861	782

Resultados expressos por frequência (percentual) ou por média ± desvio padrão

Na tabela 2 são apresentadas estatísticas descritivas das variáveis idade, sexo, risco, raça, classificação clínica pelo CDC, tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV-1, tempo de uso dos ARVs, contagem de CD4 e carga viral para os subtipos B e não B (chamados de “não B” o conjunto formado pelos pacientes com subtipos C, F, BF e CF). Também são apresentados os valores de p das comparações entre os subtipos B e não B.

Equiparando-se as características clínicas e demográficas entre pacientes com infecção por HIV-1 subtipo B e não B (tabela 2), houve maior frequência de mulheres no grupo de pacientes com infecção por subtipo não B (18.2% de mulheres com subtipo B e 45.8% subtipo não B, $p < 0.001$). Entre os fatores de risco para aquisição de HIV, 47.7% dos pacientes com subtipo B e 78% dos pacientes com subtipo não B apresentavam exposição heterossexual como único fator de risco ($p < 0.001$).

Tabela 2: Comparação dos dados demográficos e clínicos entre Subtipo B e não B

Variável	Classificação	Subtipo		P (B x não B)
		B (n=132)	Não B (n=59)	
Idade	Média±dp	42,0 ± 9,7	41,0 ± 8,5	0,480 ^a
Sexo	Masculino	108 (81,8)	32 (54,2)	<0,001 ^c
	Feminino	24 (18,2)	27 (45,8)	
Risco	HSH	68 (51,5)	12 (20,3)	<0,001 ^{c *}
	Heterossexual	63 (47,7)	46 (78,0)	
	DIV	0	1 (1,7)	
	Congênito	1 (0,8)	0	
Raça	Branca	118 (89,4)	56 (94,9)	0,278 ^c
	Negra	14 (10,6)	3 (5,1)	
Classificação pelo CDC (estágio clínico)	A	60 (45,4)	31 (52,5)	0,635 ^b
	B	31 (23,5)	13 (22,0)	
	C	41 (31,1)	15 (25,4)	
Tempo de diagnóstico (anos)	Média ± dp	9,0 ± 5,0	7,1 ± 3,8	0,005^a
CD4 (célis/mm ³)	Média ± dp	222 ± 134	225 ± 120	0,458 ^a
Carga Viral (cópias/mL)	Média ± dp	99.700 ± 210.344	114.853 ± 224.916	0,653 ^a
Tempo de uso de ARVs (anos)	Média ± dp	6,59 ± 2,83 (n=115)	6,16 ± 3,10 (n=45)	0,395 ^a

Resultados expressos por frequência (percentual) ou por média ± desvio padrão

a Teste t de Student para amostras independentes, p<0,05

b Teste de Qui-quadrado, p<0,05

c Teste exato de Fisher, p<0,05

* HSH x Heterossexual

Os pacientes apresentaram diagnóstico da infecção pelo HIV-1 entre 1983 a 2008. O paciente apresentando infecção por subtipo C mais antigo teve seu diagnóstico em 1991, BF em 1992 e F em 1993. O único paciente recombinante CF teve diagnóstico em 2004. O tempo de diagnóstico de infecção pelo HIV foi maior nos pacientes com subtipo B comparados aos dos subtipos não B (p=0.005).

Contagem de CD4, carga viral e estágio clínico da infecção pelo CDC foram semelhantes nos grupos.

6.1 MUTAÇÕES NA TRANSCRIPTASE REVERSA, DE ACORDO COM SUBTIPO

Os pacientes com história de uso de inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo, não-análogos e inibidores de protease dos subtipos B e não-B foram avaliados quanto a presença de mutações de resistência. Cento e

quinze pacientes do subtipo B, 30 subtipo C, 8 subtipo F e 7 subtipo BF foram avaliados. As mutações consideradas clinicamente significativas foram selecionadas de acordo com recomendações da literatura (JOHNSON, et al., 2008; SHAFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M., 2008), sendo o critério utilizado que todas alterem a resposta algum antirretroviral a uma das três classes citadas. Para cada mutação, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença da mutação para o subtipo B é igual à probabilidade de presença da mutação para o subtipo não B, versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. Na tabela 3 são apresentadas as freqüências e percentuais de casos com a presença da mutação de resistência e os valores de p das comparações.

A figura 4 mostra a freqüência das mutações associadas aos ITRN(t)s, de acordo com os subtipos. Na tabela 3, observamos a comparação de freqüência entre subtipo B e não B.

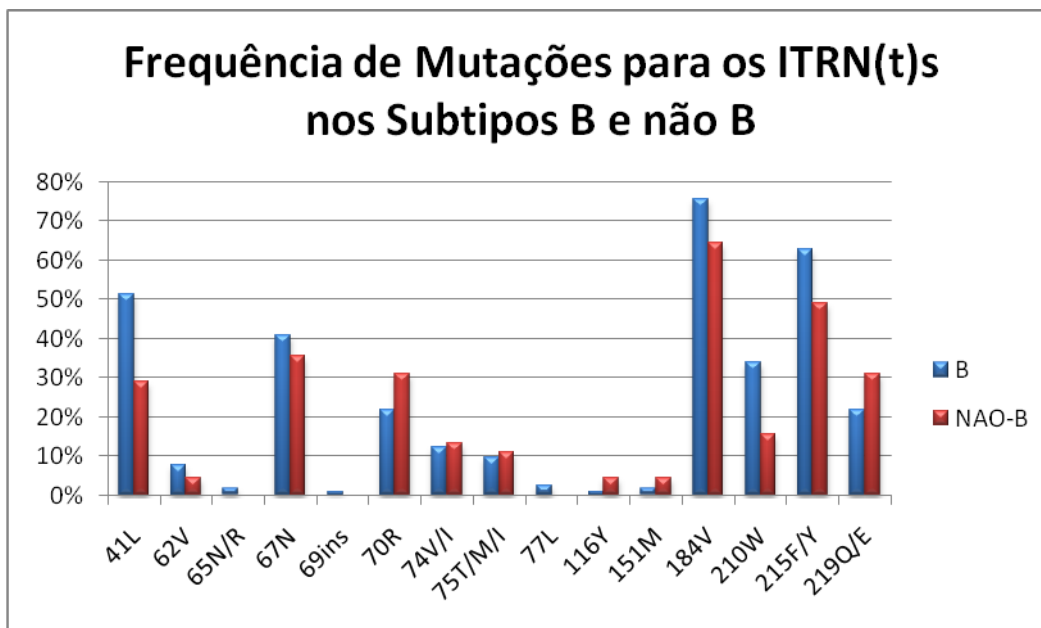


Figura 4: Freqüência de mutações para ITRN(t)s nos subtipos B e não B

Tabela 3: Frequência das Mutações para ITRN(t)s nos Subtipos B e não B

Mutação	B (n=115)	Não-B (n=45)	P*
41L	59 (51,3)	13 (28,9)	0,013
62V	9 (7,8)	2 (4,4)	0,729
65N/R	2 (1,7)	0 (0)	1
67N	47 (40,9)	16 (35,6)	0,592
69ins	1 (0,9)	0 (0)	1
70R	25 (21,7)	14 (31,1)	0,225
74V/I	14 (12,2)	6 (13,3)	0,796
75T/M/I	11 (9,6)	5 (11,1)	0,773
77L	3 (2,6)	0 (0)	0,560
116Y	1 (0,9)	2 (4,4)	0,191
151M	2 (1,7)	2 (4,4)	0,314
184V	87 (75,7)	29 (64,4)	0,171
210W	39 (33,9)	7 (15,6)	0,021
215Y/F	72 (62,6)	22 (48,9)	0,153
219Q/E	25 (21,7)	14 (31,1)	0,225

Resultados expressos por frequência (percentual)

* Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

A mutação para nucleosídeos mais comum nos subtipos foi 184V, ocorrendo em 75.7% no subtipo B, 56.7% no subtipo C, 87.5% no subtipo F e 71.4% no subtipo BF. As mutações 70R, 219Q/E, 74V/I, 151M, 75T/M/I e 116Y ocorreram com maior frequência nos pacientes do subtipo não-B, sem diferença estatisticamente significativa (Figura 2). As mutações M41L e L210W foram mais comuns no subtipo B que não B ($p=0.013$ e 0.021 , respectivamente). Quando verificada a frequência entre cada subtipo, houve diferença estatística apenas entre B e C para a mutação 41L (51.3% no subtipo B e 16.7% no subtipo C, $p=0.0008$), não havendo diferença estatística entre os subtipos para a L210W (tabela 4). Nota-se que apenas 2 pacientes apresentaram mutação 65R, ambos do subtipo B (figura 5).

Tabela 4: Comparação entre as mutações de ITRNs entre os subtipos encontrados

Mutação	B (n=115)	C (n=30)	F (n=8)	BF (n=7)	P*					
					BxC	BxF	BxBF	CxF	CxBF	FxBF
184V	87 (75,7)	17 (56,7)	7 (87,5)	5 (71,4)	0,067	0,679	0,990	0,216	0,677	0,569
41L	59 (51,3)	5 (16,7)	4 (50,0)	4 (57,1)	0,0008	1	1	0,071	0,045	1
210W	39 (33,9)	3 (10,0)	1 (12,5)	3 (42,9)	0,012	0,272	0,691	0,976	0,068	0,202
67N	47 (40,9)	13 (43,3)	2 (25,0)	1 (14,3)	0,837	0,475	0,243	0,440	0,217	1
70R	25 (21,7)	11 (36,7)	3 (37,5)	0 (0)	0,102	0,380	0,343	0,998	0,080	0,200
215Y/F	72 (62,6)	13 (43,3)	4 (50,0)	5 (71,4)	0,064	0,480	1	1	0,232	0,608
219Q/E	25 (21,7)	12 (40,0)	2 (25,0)	0 (0)	0,059	0,987	0,343	0,684	0,072	0,467
65N/R	2 (1,7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	-	-	-
74V/I	14 (12,2)	3 (10)	2 (25,0)	1 (14,3)	1	0,277	0,961	0,279	0,984	1
69ins	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	-	-	-
151M	2 (1,7)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	0,189	1	1	1	1	-
62V	9 (7,8)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	1	1	-
75T/M/I	11 (9,6)	4 (13,3)	0 (0)	1 (14,3)	0,513	1	0,504	0,560	0,963	0,467
77L	3 (2,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	-	-	-
116Y	1 (0,9)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	0,109	1	1	1	1	-

Resultados expressos por frequência (percentual)

* Teste exato de Fisher, $p < 0,008$ (corrigido por Bonferroni)

- : teste não-aplicável

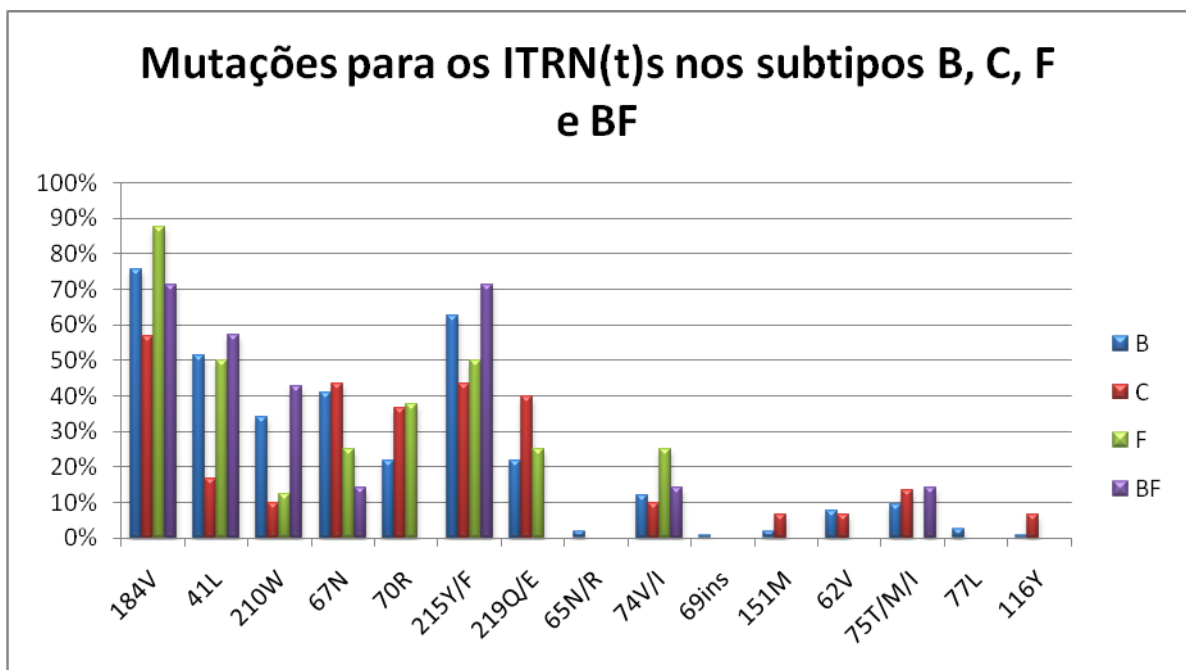


Figura 5: Frequência de mutações para ITRN(t)s nos subtipos B, C, F e BF

Tabela 5: Frequência de mutações para não-análogos de nucleosídeos nos subtipos B e não B

Mutação	B (n=115)	Não-B (n=45)	P*
101E/P	10 (8,7)	7 (15,6)	0,254
98G	11 (9,6)	3 (6,7)	0,759
100I	5 (4,3)	1 (2,2)	1
103N/S	44 (38,3)	21 (46,7)	0,373
106A/M	1 (0,9)	1 (2,2)	0,485
108I	15 (13)	6 (13,3)	0,999
179D/E/F	5 (4,3)	0 (0)	0,323
181C/I/V	21 (18,3)	7 (15,6)	0,819
188L/H/C	6 (5,2)	2 (4,4)	1
190A/S/E	29 (25,2)	9 (20)	0,541
225H	11 (9,6)	3 (6,7)	0,759
227L/C	1 (0,9)	1 (2,2)	0,485
230L	0 (0)	1 (2,2)	0,281
236L	1 (0,9)	0 (0)	1
238N/T	9 (7,8)	2 (4,4)	0,729

Resultados expressos por frequência (percentual)

* Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

Para as mutações relacionadas aos não-análogos de nucleosídeo, novamente, para cada mutação, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença da mutação para o subtipo B é igual à probabilidade de presença da mutação para o subtipo não B, versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. São apresentadas na tabela 5 as frequências e percentuais de casos com a presença da mutação de resistência para os ITRNNs e os valores de p das comparações.

Observa-se que, quanto às mutações para ITRNNs, as substituições nas posições 101, 103, 106, 108, 227 e 230 avaliadas ocorreram com maior frequência nos subtipos não-B, sem diferença estatística. Apenas 1 paciente falhado a não-análogo apresentou a mutação V106M (subtipo C) (figura 6). A figura 4 mostra as mutações para ITRNNs de acordo com os subtipos.

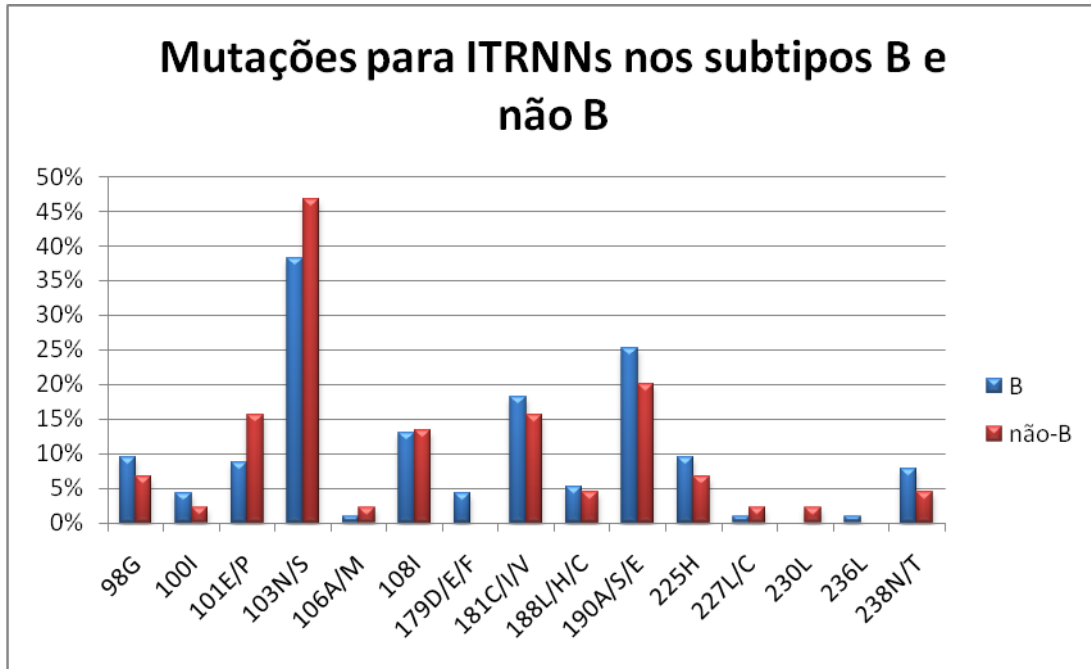


Figura 6: Mutações para os ITRNNs nos subtipos B e não B

Tabela 6: Comparação das mutações para ITRNNs entre os subtipos encontrados

Mutação	B (n=115)	C (n=30)	F (n=8)	BF (n=7)	P*					
					BxC	BxF	BxBF	CxF	CxBF	FxBF
98G	11 (9,6)	3 (10,0)	0 (0)	0 (0)	0,990	1	1	1	1	-
100I	5 (4,3)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	1	1	-
101E/P	10 (8,7)	6 (20,0)	0 (0)	1 (14,3)	0,100	1	0,477	0,309	1	0,467
103N/S	44 (38,3)	13 (43,3)	3 (37,5)	5 (71,4)	0,677	1	0,116	0,133	0,232	0,315
106A/M	1 (0,9)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0,372	1	1	1	1	-
108I	15 (13,0)	2 (6,7)	3 (37,5)	1 (14,3)	0,526	0,092	0,953	0,053	0,476	0,569
179D/E/F	5 (4,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,584	1	1	-	-	-
181C/I/V	21 (18,3)	4 (13,3)	2 (25,0)	1 (14,3)	0,786	0,637	1	0,586	0,963	1
188L/H/C	6 (5,2)	1 (3,3)	0 (0)	1 (14,3)	1	1	0,342	1	0,347	0,467
190A/S/E	29 (25,2)	8 (26,7)	0 (0)	1 (14,3)	1	0,196	1	0,164	0,656	0,467
225H	11 (9,6)	2 (6,7)	0 (0)	1 (14,3)	1	1	0,504	1	0,473	0,467
227L/C	1 (0,9)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0,372	1	1	1	1	-
230L	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	-	-	0,057	-	0,189	0,467
236L	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	-	-	-
238N/T	9 (7,8)	1 (3,3)	1 (12,5)	0 (0)	0,688	0,485	1	0,381	1	1

Resultados expressos por frequência (percentual)

* Teste exato de Fisher, $p < 0,008$ (corrigido por Bonferroni)

- : teste não-aplicável

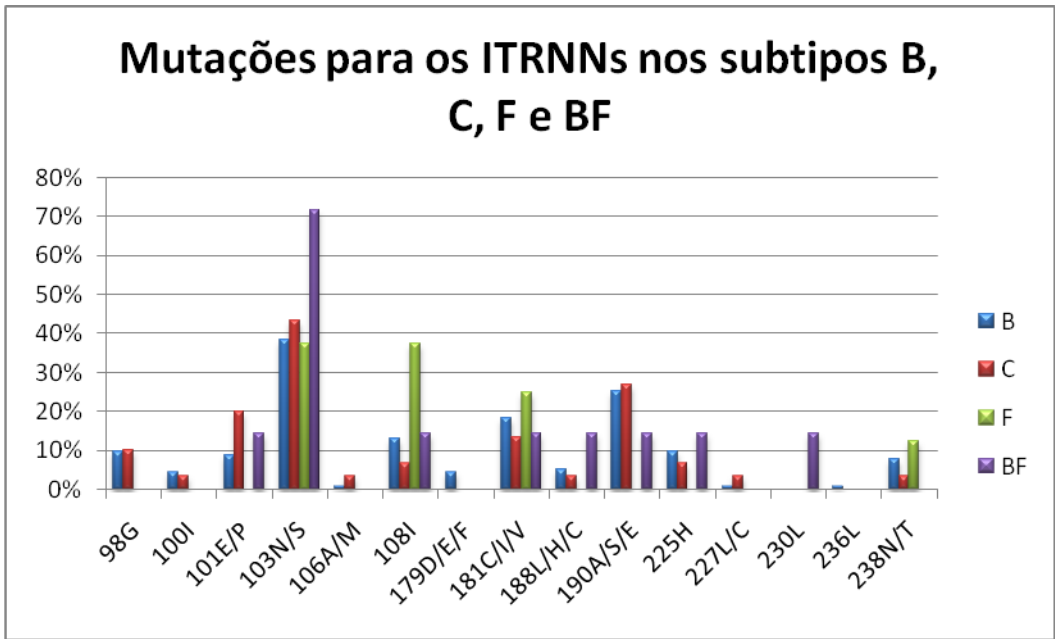


Figura 7: Mutações para ITRNNs nos subtipos B, C, F e BF

6.2 MUTAÇÕES NA PROTEASE, DE ACORDO COM SUBTIPO

As figuras 8 e 9 mostram as principais mutações de resistência associada aos inibidores de protease encontradas nas amostras, de acordo com os subtipos B e não-B.

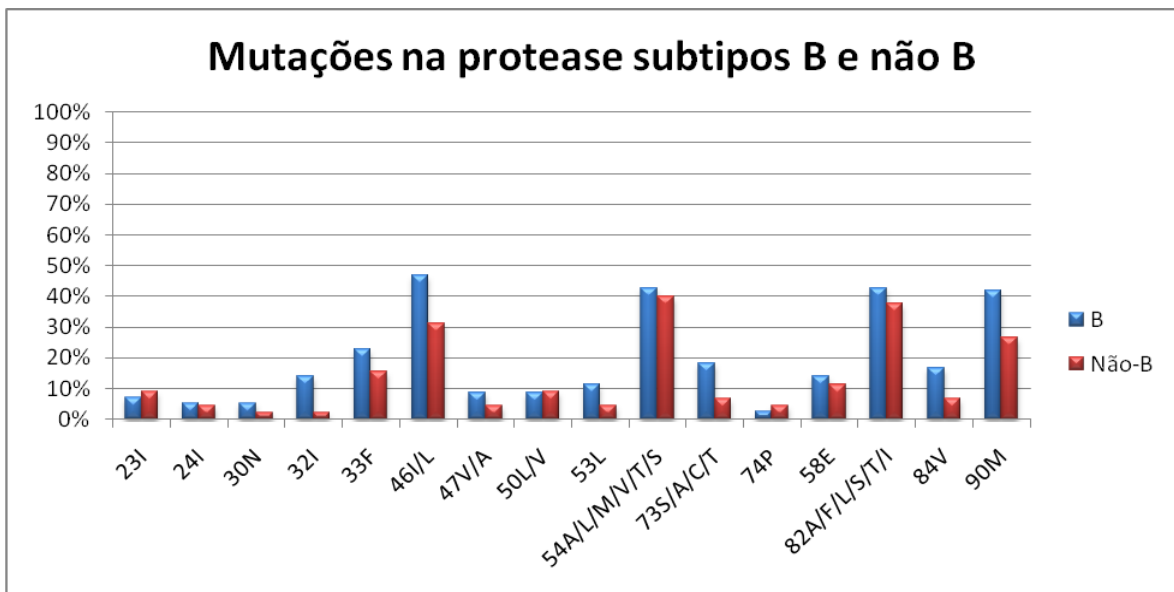


Figura 8: Mutações na protease nos subtipos B e não B

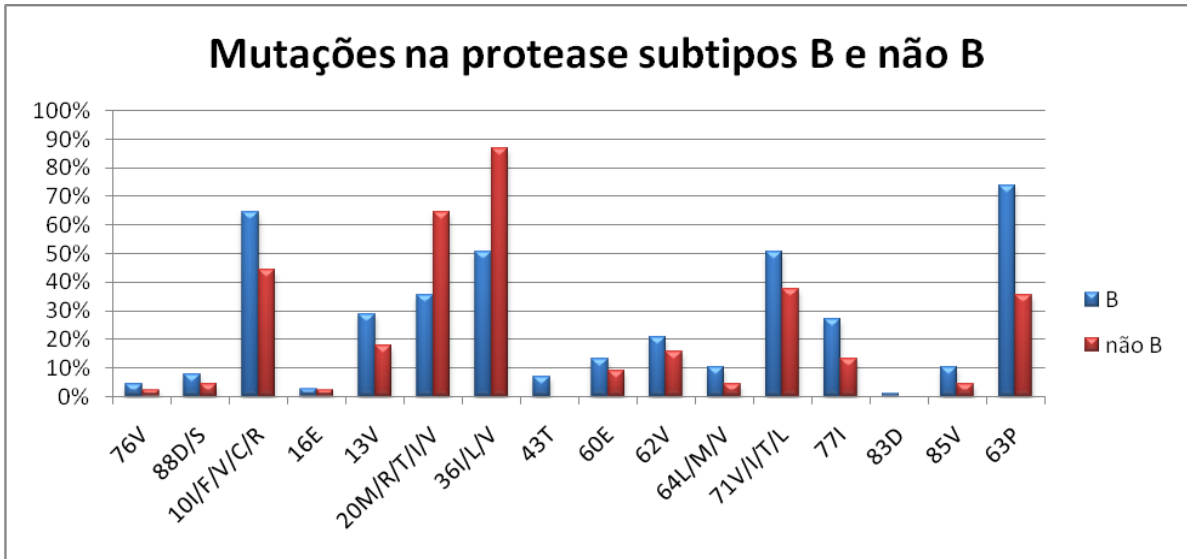


Figura 9: Mutações na protease nos subtipos B e não B

Para cada mutação da protease, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de presença da mutação para o subtipo B é igual à probabilidade de presença da mutação para o subtipo não B, versus a hipótese alternativa de probabilidades diferentes. A tabela 7 apresenta as freqüências e percentuais de casos com a presença da mutação e os valores de p das comparações.

As mutações nas posições 20, 36, 23, 50 e 74 foram mais freqüentes nos subtipos não B, porém apenas as diferenças nas posições 20 (35.7% subtipo B e 64.4% subtipo não B, $p=0.031$) e 36 (50.4% em B e 86.7% subtipo não B, $p<0.001$) foram significativas. No subtipo B, as mutações nas posições 10 (64.3% subtipo B e 44.4% subtipo não B, $p=0.031$), 32 (13.9% subtipo B e 2.2% subtipo não B, $p=0.042$) e 63 (73.9% subtipo B e 35.6% subtipo não B, $p<0.001$) foram mais freqüentes de maneira significativa.

Tabela 7: Mutações na protease e comparações entre os subtipos B e não B

Mutação	B (n=115)	Não-B (n=45)	P*
58E	16 (13,9)	5 (11,1)	0,797
16E	3 (2,6)	1 (2,2)	1
60E	15 (13,0)	4 (8,9)	0,592
10I/F/V/C/R	74 (64,3)	20 (44,4)	0,031
13V	33 (28,7)	8 (17,8)	0,226
20M/R/T/I/V	41 (35,7)	29 (64,4)	0,001
23I	8 (7,0)	4 (8,9)	0,740
24I	6 (5,2)	2 (4,4)	1
30N	6 (5,2)	1 (2,2)	0,674
32I	16 (13,9)	1 (2,2)	0,042
33F	26 (22,6)	7 (15,6)	0,389
35G	0 (0)	0 (0)	---
36I/L/V	58 (50,4)	39 (86,7)	<0,001
43T	8 (7)	0 (0)	0,107
46I/L	54 (47)	14 (31,1)	0,077
47V/A	10 (8,7)	2 (4,4)	0,512
48V/M	0 (0)	0 (0)	---
50L/V	10 (8,7)	4 (8,9)	0,996
53L	13 (11,3)	2 (4,4)	0,237
54A/L/M/V/T/S	49 (42,6)	18 (40,0)	0,859
62V	24 (20,9)	7 (15,6)	0,511
63P	85 (73,9)	16 (35,6)	<0,001
64L/M/V	12 (10,4)	2 (4,4)	0,353
71V/I/T/L	58 (50,4)	17 (37,8)	0,163
73S/A/C/T	21 (18,3)	3 (6,7)	0,084
74P	3 (2,6)	2 (4,4)	0,619
76V	5 (4,3)	1 (2,2)	1
77I	31 (27,0)	6 (13,3)	0,094
82A/F/L/S/T/I	49 (42,6)	17 (37,8)	0,598
83D	1 (0,9)	0 (0)	1
84V	19 (16,5)	3 (6,7)	0,129
85V	12 (10,4)	2 (4,4)	0,353
88D/S	9 (7,8)	2 (4,4)	0,729
90M	48 (41,7)	12 (26,7)	0,102

Resultados expressos por frequência (percentual)

* Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

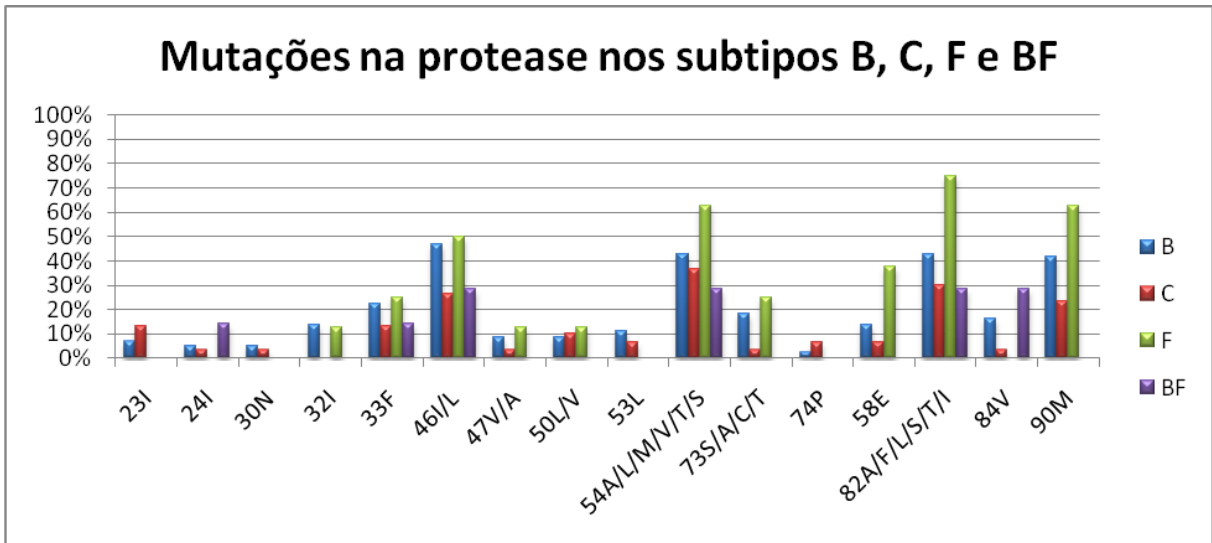


Figura 10: Mutações na protease nos subtipos B, C, F e BF

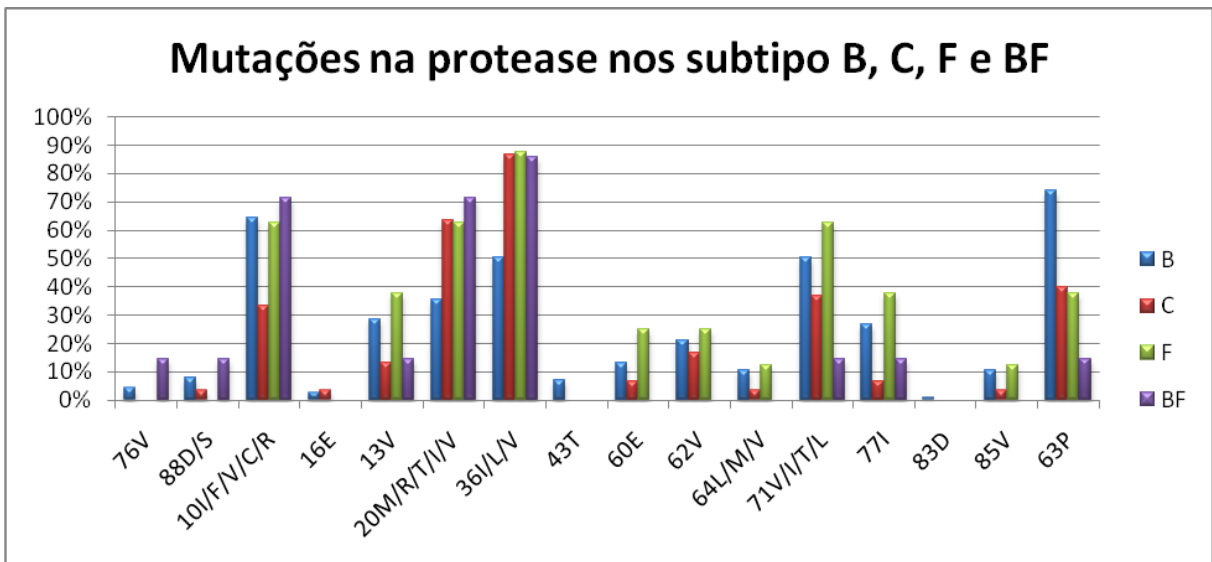


Figura 11: Mutações na protease nos subtipos B, C, F e BF

Foram comparados os subtipos entre si para determinação de maior frequência de terminada mutação de resistência em um dado subtipo. A tabela 8 mostra resultados das comparações.

Tabela 8: Mutações no gene da protease e comparações entre os subtipos

Mutação	B (n=115)	C (n=30)	F (n=8)	BF (n=7)	P*					
					BxC	BxF	BxBF	CxF	CxBF	FxBF
23I	8 (7,0)	4 (13,3)	0 (0)	0 (0)	0,271	1	1	0,560	0,570	-
24I	6 (5,2)	1 (3,3)	0 (0)	1 (14,3)	1	1	0,342	1	0,347	0,467
30N	6 (5,2)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	1	1	-
32I	16 (13,9)	0 (0)	1 (12,5)	0 (0)	0,043	1	0,592	0,210	-	1
33F	26 (22,6)	4 (13,3)	2 (25,0)	1 (14,3)	0,320	0,985	1	0,586	0,963	1
46I/L	54 (47,0)	8 (26,7)	4 (50,0)	2 (28,6)	0,062	1	0,451	0,232	0,991	0,608
47V/A	10 (8,7)	1 (3,3)	1 (12,5)	0 (0)	0,460	0,515	1	0,381	1	1
48V/M	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-	-
50L/V	10 (8,7)	3 (10,0)	1 (12,5)	0 (0)	0,726	0,515	1	0,976	1	1
53L	13 (11,3)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	0,737	0,598	1	1	1	-
54A/L/M/V/T/S	49 (42,6)	11 (36,7)	5 (62,5)	2 (28,6)	0,678	0,297	0,698	0,243	1	0,315
73S/A/C/T	21 (18,3)	1 (3,3)	2 (25,0)	0 (0)	0,046	0,637	0,603	0,106	1	0,467
74P	3 (2,6)	2 (6,7)	0 (0)	0 (0)	0,275	1	1	1	1	-
58E	16 (13,9)	2 (6,7)	3 (37,5)	0 (0)	0,366	0,106	0,592	0,053	1	0,200
82A/F/L/S/T/I	49 (42,6)	9 (30,0)	6 (75,0)	2 (28,6)	0,295	0,138	0,698	0,039	1	0,132
84V	19 (16,5)	1 (3,3)	0 (0)	2 (28,6)	0,076	0,356	0,344	1	0,089	0,200
90M	48 (41,7)	7 (23,3)	5 (62,5)	0 (0)	0,090	0,289	0,041	0,081	0,306	0,026
76V	5 (4,3)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	0,584	1	0,302	-	0,189	0,467
88D/S	9 (7,8)	1 (3,3)	0 (0)	1 (14,3)	0,688	1	0,447	1	0,347	0,467
10I/FN/C/R	74 (64,3)	10 (33,3)	5 (62,5)	5 (71,4)	0,003	0,997	1	0,223	0,095	1
16E	3 (2,6)	1 (3,3)	0 (0)	0 (0)	0,972	1	1	1	1	-
13V	33 (28,7)	4 (13,3)	3 (37,5)	1 (14,3)	0,103	0,690	0,672	0,146	0,963	0,569
20M/R/T/I/V	41 (35,7)	19 (63,3)	5 (62,5)	5 (71,4)	0,007	0,149	0,102	0,998	1	1
35G	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-	-	-
36I/L/V	58 (50,4)	26 (86,7)	7 (87,5)	6 (85,7)	0,0003	0,065	0,117	1	0,963	1
43T	8 (7,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,206	1	1	-	-	-
60E	15 (13,0)	2 (6,7)	2 (25,0)	0 (0)	0,526	0,304	0,595	0,189	1	0,467
62V	24 (20,9)	5 (16,7)	2 (25,0)	0 (0)	0,799	0,665	0,343	0,622	0,560	0,467
64L/M/V	12 (10,4)	1 (3,3)	1 (12,5)	0 (0)	0,304	0,962	1	0,381	1	1
71V/I/T/L	58 (50,4)	11 (36,7)	5 (62,5)	1 (14,3)	0,220	0,718	0,116	0,243	0,389	0,119
77I	31 (27,0)	2 (6,7)	3 (37,5)	1 (14,3)	0,026	0,683	0,675	0,053	0,473	0,569
83D	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1	1	1	-	-	-
85V	12 (10,4)	1 (3,3)	1 (12,5)	0 (0)	0,304	0,962	1	0,381	1	1
63P	85 (73,9)	12 (40,0)	3 (37,5)	1 (14,3)	0,0009	0,041	0,003	1	0,383	0,569

Resultados expressos por frequência (percentual)

* Teste exato de Fisher, $p < 0,008$ (corrigido por Bonferroni)

- : teste não-aplicável

Na posição 10, 64.3% dos pacientes do subtipo B apresentavam mutação, enquanto que no subtipo C, apenas 33.3% havia mutação ($p=0,003$). A mutação 63P foi mais frequente no subtipo B que nos subtipos C e BF, quando comparados

individualmente (73.9% no B, 40% no C, 14.3% no BF, $p=0.0009$ e 0.003 , respectivamente). Os resíduos 20 e 36, mais frequentemente mutados nos subtipos não B, foram especificadamente mais frequentes nos vírus do subtipo C (10I/F/V/C/R 64.3% no B e 33.3% no C, $p=0.003$, e 36I/L/V 50.4% no B e 86.7% no C, $p=0.0003$).

Em particular, 81 pacientes (61 subtipo B, 20 subtipo C e 11 subtipo F) apresentavam história de falha em esquema contendo nelfinavir (tabela 9). Destes, 60 apresentavam a mutação 90M (48 subtipo B, 7 subtipo C e 5 subtipo F). Apenas 7 pacientes apresentavam a mutação 30N, sendo 6 do subtipo B e 1 subtipo C. A figura 12 mostra a freqüência das vias mutacionais para NFV conforme os subtipos.

Tabela 9: Pacientes com falha virológica em uso de NFV, frequência das mutações 30N e 90M de acordo com subtipo

Mutação	Subtipo B	Subtipo C	Subtipo F	Subtipo Não B
D30N (%)	6 (9.8)	1 (5)	0 (0)	1 (3.2)
L90M (%)	48 (78.7)	7 (35)	5 (45.5)	12 (38.7)

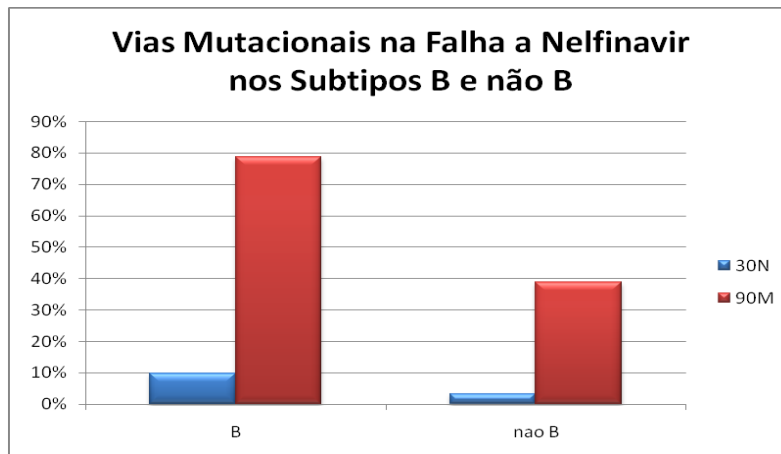


Figura 12: Vias mutacionais na falha a NFV, de acordo com o subtipo

7 DISCUSSÃO

A maioria das pessoas infectadas pelo HIV-1 no mundo apresentam infecção por subtipo não-B. Nas áreas do mundo onde há ampla disponibilidade de ARVs, como USA e Europa, a maioria dos pacientes apresentam infecção por subtipo B. Há um grande interesse internacional em estudar o impacto da diversidade genética do HIV e sua possível consequência na resposta aos tratamentos ARVs, especialmente nos subtipos não B, localizados nos países com acesso mais restrito aos novos ARVs. O Brasil fornece ARVs gratuitamente aos pacientes com infecção por HIV-1 desde 1996 e apresenta uma diversidade de subtipos de HIV e pode servir de cenário para o estudo das diferenças entre os vírus circulantes no País na presença dos ARVs.

Foi demonstrado que os vírus dos subtipos não B foram introduzidos mais tarde no Brasil que o subtipo B (SOARES et al.; 2003; SOARES et al.; 2005). Em nossa amostra, o paciente com subtipo B apresentando mais tempo de infecção foi diagnosticado em 1983. Nos subtipos não B, o paciente com mais tempo de diagnóstico de infecção pelo HIV-1 subtipo C foi diagnosticado em 1991, sugerindo que é possível que, também em nossa amostra, a introdução do subtipo C foi posterior ao B. Estima-se que o subtipo C foi introduzido no Brasil no início dos anos 1980, 10 a 15 anos após introdução do subtipo B (BELLO et al., 2008).

O número de casos de infecção por vírus não B está aumentando na Europa e esses casos vem sendo relacionados a determinados grupos de comportamento e etnicidade. No Reino Unido e nos Estados Unidos, há um predomínio de casos de infecção por subtipo B em homens caucasianos que fazem sexo com homens e usuários de drogas, enquanto os casos de subtipo C ocorrem em homens e mulheres heterossexuais de outros grupos étnicos (FOX et al., 2007; GERETTI et al., 2009). O Brasil é um país com grande diversidade étnica, porém na região sul há maior prevalência de caucasianos. Assim, a grande maioria dos pacientes da nossa amostra eram caucasianos, porém houve maior prevalência de mulheres e heterossexuais nos pacientes com infecção por vírus dos subtipos não B. Há relatos de variações funcionais nos vírus do subtipo C que favoreceriam sua transmissibilidade heterossexual (WALTER et al., 2009).

Com relação às mutações observadas para núcleos(t)ídeos, 41L e 210W foram mais frequentes nos pacientes com infecção por subtipo B que não B ($p=0,013$ e $0,021$ respectivamente). Quando comparados entre os subtipos encontrados, para a 41L essa diferença ocorreu apenas entre B e C ($p=0.0008$) e não houve mais significância para a 210W comparando os subtipos entre si. As mutações 41L e 210W são mutações associadas aos timidínicos (d4T e AZT). Quando ocorre a falha virológica, existe uma dicotomização entre via mutacional para a chamada TAM 1 (aquisição das mutações 41L, 210W e 215Y) ou via TAM 2 (67N, 70R, 219Q) (JOHNSON et al., 2008). A via TAM 1 apresenta mutações que trazem maior risco de resistência não somente aos timidínicos, mas também resistência cruzada aos demais núcleos(t)ídeos (SHAFER et al., 2008). No Brasil o primeiro esquema ARV é comumente composto por 2 nucleosídeos, sendo um deles timidínico (d4T ou AZT) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). O tempo de exposição aos ARVs da amostra foi semelhante entre os subtipos. Outros estudos observaram maior frequência da 41L em pacientes com infecção por subtipo B comparado ao C, sendo um deles do Brasil (GROSSMAN et al.; 2001; SOARES et al.; 2003) e em outros países (MAGGILOLO et al., 2004).

Há outras evidências de que a via mutacional utilizada pelo vírus frente a determinado ARV pode ser influenciada pelo subtipo (NOVITSKY et al.; 2007). Em Botsuana, investigadores notaram que pacientes com infecção por subtipo C tratado com análogo timidínico, como zidovudina, quando falhados, apresentavam HIV com mutações com uma via mutacional própria, caracterizada pela presença das mutações 67N, 70R e 215Y, em comparação às vias mutacionais já descritas para os timidínicos. É possível que a maior ocorrência de 41L e 210W nos vírus B brasileiros mostrem uma tendência a via TAM 1 das cepas do país, havendo necessidade de mais estudos para determinar esse fato.

Alguns autores notaram um aumento de frequência da K65R em vírus subtipo C falhados a esquema com ddl (DOUALLA-BELL et al.; 2006) e há evidências de facilidade do surgimento desta mutação em subtipo C “in vitro” (COUTSINOS et al., 2009). A mutação K65R é chamada de mutação-assinatura para o tenofovir, medicamento que por ter grande segurança em sua utilização, hoje substitui o AZT no primeiro esquema ARV em países desenvolvidos (MASUR; KAPLAN, 2009). A possibilidade de maior ocorrência dessa mutação em subtipos não B poderia ter

impacto em termos de resistência a longo prazo em países em desenvolvimento. A K65R pode surgir em consequência não somente da falha a tenofovir, mas também na falha a abacavir e ddl (JOHNSON et al., 2008). Em nossa amostra, apesar da exposição a ddl e TDF, houve apenas 2 pacientes com essa mutação, sendo ambos do subtipo B. Outros locais com maior prevalência de infecção por subtipo C também não conseguiram demonstrar a ocorrência maior dessa mutação (SUNPATH et al., 2008; SEM et al., 2007). Sabe-se que a presença de TAMs diminui a ocorrência de K65R (PARICH et al., 2006). É possível que no Brasil, como o primeiro esquema ARV contém timidínico, a presença de TAMs na primeira falha seja também responsável pela menor frequência da substituição na posição 65 da protease.

Não houve diferença na frequência de mutações para não-análogos em nossa amostra, nos diferentes subtipos. As posições 106 e 98 mutadas relatadas na literatura como mais frequentes no subtipo C (GROSSMAN et al., 2004; KANTOR et al., 2005) foram pouco frequentes em nossa amostra.

SOARES et al em 2003 demonstraram que um subtipo C específico do Brasil circula no país e esse subtipo apresenta assinaturas moleculares específicas. Foi notada uma elevada frequência de mutação na posição 36 da protease no subtipo C do Brasil, bem como da 63 no subtipo B. Em nosso estudo, as mutações nas posições 20 e 36 foram mais frequentes nos subtipos C, concordando também com outros autores que notaram maior frequência destas mutações em subtipos não-B (KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D., 2003).

A mutação na posição 36 está relacionada com diminuição da susceptibilidade do vírus aos ARVs atazanavir, indinavir, nelfinavir, tipranavir e a mutação na posição 63, a lopinavir (JOHNSON et al., 2008). Questiona-se se mutações consideradas polimorfismos ou mutações menores nos vírus do subtipo B, observadas mais frequentemente nos subtipos não B, poderiam diminuir a barreira genética para determinados IPs nos subtipos não B (POVEDA et al., 2008).

A mutação 90M foi via preferencial de resistência para os vírus B e não B de pacientes falhados a nelfinavir, como previamente notado (KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D., 2003; SOARES et al., 2003). É possível que com a elevada frequência de mutação no resíduo 36 favoreça o surgimento da via 90M, como verificado em nossa amostra e relatado previamente (PERNO et al., 2004).

8 CONCLUSÃO

Nosso resultado demonstra haver em Curitiba, Paraná, assim como nos outros estados da região sul do Brasil, uma grande prevalência de HIV-1 subtipo B (69.1%), seguido porém por uma quantidade significativa de HIV-1 subtipo não B, sendo encontrados subtipos C (21.5%), F (5.2%), recombinantes BF (3.7%) e BC (0.5%). Os vírus do subtipo não B, em especial subtipo C, apresentaram maior ocorrência em heterossexuais e mulheres. Os dados apresentados sugerem que os vírus dos subtipos não B podem ter sido introduzidos no Paraná posteriormente ao subtipo B. Os dados ainda sugerem não haver diferença quanto a contagem de CD4, carga viral e presença de mais doenças oportunistas (avaliada pelo critério clínico do CDC) entre os pacientes com infecção por subtipos B e não B.

As mutações 41L e 210W da transcriptase reversa foram mais frequentes nos vírus dos subtipos não B, sendo a 41L mais frequente no subtipo B em comparação ao C. Quanto à protease, as mutações nos resíduos 10, 32 e 63 foram mais frequentes nos vírus do subtipo B, enquanto as posições 20 e 36 foram mais mutadas nos vírus do subtipo B, de pacientes expostos às mesmas classes de antirretrovirais. Mutações propostas como assinaturas moleculares de subtipos brasileiros estiveram presentes, como 63P na protease do subtipo B e 36I do subtipo C.

Há necessidade de mais estudos para avaliar qual é a implicância fenotípica das características genéticas encontradas na população do Paraná.

REFERÊNCIAS

ACCETTURI, C. A.; PARDINI, R.; NOVAES-PINTO, G. H.; TURCATO, G. Jr.; LEWI, D. S.; DIAZ, R. S. Effects of CCR5 genetic polymorphism and HIV-1 subtype in antiretroviral response in Brazilian HIV-1 infected patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 24, p. 339-400, 2000.

BARRETO, C. C.; NISCHYIA, A.; ARAUJO, L. V.; FERREIRA, J. E.; BUSCH, M. P.; SABINO, E. C. Trends in Antiretroviral Drug Resistance and Clade Distributions Among HIV-1-infected Blood Donors in Sao Paulo, Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 41, n. 3, p. 338-341, 2006.

BARTH, R. E.; WENSING, A. M.; TEMPELMAN, H. A.; MORABA, R.; SCHUURMAN, R.; HOEPELMAN, A. I. Rapid accumulation of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-associated resistance: evidence of transmitted resistance in rural South Africa. **AIDS**, v. 22, p. 2210-2212, 2008.

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

BRENNAN, C. A.; BRITES, C.; BODELLE, P.; GOLDEN, A.; HACKETT, J.; HOLZMAYER, V.; SWANSON, P.; VALLARI, A.; YAMAGUCHI, J.; DEVARE, S.; PEDROSO, C., RAMOS, A.; BADARO, R. HIV-1 strains identified in Brazilian blood donors: significant prevalence of B/F1 recombinants. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, p. 1434-1441, 2007.

CASTRO, K. G.; WARD, J. W.; SLUTSKER, L.; BUHLER, J. W.; JAFFE, H. W.; BERKELMAN, R. L. 1993 Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 41, n. 51, p. 961-962, 1992.

CILLIERS, T.; NHLAPO, J.; COETZER, M.; ORLOVIC, D.; KETAS, T.; OLSON, W. C.; MOORE, J. P.; TRKOLA, A.; MORRIS, L. The CCR5 and CXCR4 Coreceptors Are Both Used by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates from Subtype C. **Journal of Virology**, v. 77, n. 7, p. 4449-4456, 2002.

DESHPANDE, A.; JAUVIN, V.; MAGNIN, N.; PINSON, P.; FAURE, M.; MASQUELIER, B.; AURILLAC-LAVIGNOLLE, V.; FLEURY, H. J. Resistance

mutations in subtype C HIV type 1 isolates from Indian patients of Mumbai receiving NRTIs plus NNRTIs and experiencing a treatment failure: resistance to AR. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, p. 335-340, 2007.

DIAZ, R.S. **Orientações para o manuseio de testes de resistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV**. São Paulo: Europa press, 2006.

DOUALLA-BELL, F.; AVALOS, A.; BRENNER, B.; GAOLATHE, T.; MINE, M.; GASEITSIWE, S.; OLIVEIRA, M.; MOISI, D.; NDWAPI, N.; MOFFAT, H.; ESSEX M.; WAINBERG, M. A. High prevalence of the K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 subtype C isolates from infected patients in Botswana treated with didanosine-based regimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 4182-4185, 2006.

DUMANS, A. T.; SOARES, M. A.; MACHADO E. S.; HUE, S.; BRINDEIRO, R. M.; PILLAY, D.; TANURI, A. Synonymous genetic polymorphisms within Brazilian human immunodeficiency virus type 1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 324-329, 2004.

FOX, J.; DUDAZ, A.; GREEN, H. Epidemiology of non-B clade forms of HIV-1 in MSM in the UK [poster 117]. In: Program and abstracts of the 13th Annual Conference of the British HIV Association (Edinburgh, Scotland). **British HIV Association**, 2007.

GROSSMAN, Z.; PAXINOS, E. E.; AVERBUCH, D.; MAAYAN, S.; PARKIN, N. T.; ENGELHARD, D.; LORBER, M.; ISTOMIN, V.; SHAKED, Y.; MENDELSON, E.; RAM, D.; PETROPOULOS, C. J.; SCHAPIRO, J. M. Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2159-2165, 2004.

GERETTI, A. M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 19, p. 1-7, 2006.

GERETTI, A. M.; HARRISON, L.; GREEN, H.; SABIN, C.; HILL, T.; FEARNHILL, E.; PILLAY, D.; DUNN, D.; UK Collaborative Group on HIV Drug Resistance. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 9, p. 1296-1305, 2009.

GROSSMAN, Z.; VARDINON, N.; CHEMTOB, D.; ALKAN, MICHAEL L.; BENTWICH, ZVI; BURKE, MICHAEL; GOTTESMAN, GIORA; ISTOMIN, VALERY;

LEVI, ITZCHAK; MAAYAN, SHLOMO; SHAHAR, EDUARDO; SCHAPIRO, JONATHAN M. Genotypic variation of HIV-1 reverse transcriptase and protease: comparative analysis of clade C and clade B. **AIDS**, v. 15, p. 1453-1460, 2001.

GROSSMAN, Z.; ISTOMIN, V.; AVERBUCH, D.; LORBER, M.; RISENBERG, K LEVI, I.; CHOWERS, M.; BURKE, M.; YAACOV, N. B.; SCHAPIRO, J. M. Genetic Variation at NNRTI resistance-associated positions in patients infected with HIV-1 subtype C. **AIDS**, v. 18, n. 6, p. 909-915, 2004.

GOFF, S. P. Introduction to Retroviruses. In: WORMSER, G. P. **AIDS and Other Manifestations of HIV Infection**. San Diego: Elsevier, 2004. Páginas 57-93.

GUPTA, R. K.; CHRYSTIE, I. L.; O'SHEA, S.; MULLEN, J. E.; KULASEGARAM, R.; TONG, C. Y. K65R and Y181C are less prevalent in HAART-experienced HIV-1 subtype A patients. **AIDS**, v. 19, p. 1916-1919, 2005.

HIRSCH, M. S.; GUNTARD, H. F.; SCHAPIRO, J. M.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B.; HAMMER, S. M.; JOHNSON, V. A.; KURITZKES, D. R.; MELLORS, J. W.; PILLAY, D.; YENI, P. G.; JACOBSEN, D. M.; RICHMAN, D. D. Antiretroviral Drug Resistance Testing in Adult HIV-1 Infection: 2008 Recommendations of an International AIDS Society–USA Panel. **Clinical Infectious Diseases**, 47:266–85, 2008.

HOLGUIN, A.; ALVAREZ, A.; SORIANO, V. High prevalence of subtype G and spectrum of natural polymorphism at the protease gene among HIV-1 infected immigrants attended in Madrid. **AIDS**, v. 16, p. 1163-1170, 2002.

HOLGUIN, A.; DE ARELLANO, E. R.; RIVAS, P.; SORIANO, V. **AIDS Reviews**, v. 8, p. 98-107, 2006.

IVERSEN, A. K. N.; LEARN, G. H.; SKINHOJ, P.; MULLINS, J. I.; MCMICHAEL, A. J.; RAMBAUT, A. **AIDS**, v. 19, n. 9, p. 990-992, 2005.

JANINI, L. M. A Diversidade Genética dos Vírus de Genoma RNA com Ênfase no Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). **Tendências em HIV•Aids**, v. 1, n. 1, p. 4-11, 2006.

JERE, A. J.; TRIPATHY, S.; AGNIHOTRI, K.; JADHAV, S.; PARANJAPE, R. Genetic Analysis of Indian HIV-1 nef: subtyping, variability and implications. **Microbes and Infection**, v. 6, p. 279-289, 2004.

JOHNSON, V. A.; BRUN-VEZINET, F.; CLOTET, B.; GUNTARD, H. F.; KURITZKES, D. R.; PILLAY, D.; SCHAPIRO, J. M.; RICHMAN, D. D. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1: December 2008. **Topics in Medicine**, v. 16, n. 5, p. 138-144, 2008.

KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D. Drug Resistance in non-subtype B HIV-1. **Journal of Clinical Virology**, v. 29, p. 152-159, 2004.

KANTOR, R.; KATZENSTEIN, D. A.; EFRON, B.; CARVALHO, A. P.; WYNHOVEN, B.; CANE, P.; CLARKE, J.; SIRIVICHAYAKUL, S.; SOARES, M. A.; SNOECK, J.; PILLAY, C.; RUDICH, H.; RODRIGUES, R.; HOLGUIN, A.; ARIYOSHI, K.; BOUZAS, M. B.; CAHN, P.; SUGIURA, W.; SORIANO, V.; BRIGIDO, L. F.; GROSSMAN, Z.; MORRIS, L.; VANDAMME, A. M.; TANURI, A.; PHANUPHAK, P.; WEBER, J. N.; PILLAY, D.; HARRIGAN, P. R.; CAMACHO, R.; SCHAPIRO, J. M.; SHAFER, R. W. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. **PLoS Med**, v. 2, e. 1, 2005.

KELLER, M.; LU, Y.; LALONDE, R. G.; KLEIN, M. B. Impact of HIV-1 viral subtype on CD4R T-cell decline and clinical outcomes in antiretroviral naive patients receiving universal healthcare. **AIDS**, v. 23, p. 731–737, 2009.

LEAL, E.; JANINI, L. M. Interação vírus-hospedeiro e a evolução do HIV. **Tendências em HIV•Aids**, v. 1, n. 3, p. 15-22, 2006.

LEITNER, T.; KORBER, K.; DANIELS, M.; CALEF, C.; FOLEY, B. HIV-1 Subtype and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, in **HIV Sequence Compendium 2005**. Edited by: Thomas Leitner T, Foley B, Hahn B, Marx P, McCutchan F, Mellors J, Wolinsky S, Korber B. Published by: Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. LA-UR 06-0680, p. 41-48, 2005.

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. **Journal of Medical Virology**, v. 79, p. 1455-1463, 2007.

LOS ALAMOS DATABASE, **HIV geographic distribution**. disponível em <<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>> Acesso em 27 jul. 2009.

MACHADO, E. S.; LAMBERT, J. S.; AFONSO, A. O.; CUNHA, S. M.; OLIVEIRA, R. H.; TANURI, A.; SILL, A. M.; SOARES, M. Overview of genotypic and clinical profiles of human immunodeficiency virus type 1-infected children in Rio de Janeiro, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 76, n. 4, p. 727-741, 2004.

MAGGIOLO, F.; CALLEGARO, A.; LAURA, R.; RIPAMONTI, D.; GREGIS, G.; QUINZAN, G.; FIORINA, L.; GOGLIO, A.; SUTER, F. Resistance Conferring Mutations in B versus non-B HIV clades after treatment failure. International Congress on Drug Therapy and HIV 2004, novembro 14 – 18; 7: abstract P104.

MARTINEZ, A. M. B.; BARBOSA, E. F.; FERREIRA, P. C. P.; CARDOSO, F. A.; SILVEIRA, J.; SASSIL, G.; DA SILVA, C. M.; MENDONÇA-SIGNORINI, V.; ANTUNES, C. M. F. Molecular Epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 471-476, 2002.

MARTINEZ, A. M. B.; DA HORA, V. P.; DOS SANTOS, A. L. COLOCAR TODOS OS AUTORES. Determinants of HIV-1 Mother-to-Child transmission in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira Ciências**, v. 78, n. 1, p. 113-121, 2006.

MARTINEZ-CAJAS, J. L.; PAI, N. P.; KLEIN, M. B.; WAINBERG, M. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). **Journal of the International AIDS Society**, v. 12, p. 1-20, 2009.

MASUR, H.; KAPLAN, J. New Guidelines for the management of HIV-related opportunistic infections. **JAMA**, v. 10, n. 301, p. 2378-2380, 2009.

MERSON, M. H.; PIOT, P. Global Perspectives on Human Immunodeficiency Virus and Acquired Immunodeficiency Syndrome. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practices of Infectious Diseases**. Philadelphia: Elsevier, 2005. 1465-1477.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Aids. **Recomendações para Terapia Anti-retroviral em Adultos Infectados pelo HIV 2008**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>> Acesso em 20 jul. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Aids. **AIDS NO BRASIL**. Disponível em: <www.aids.gov.br/data/Pages/LUMIS13F4BF21PTBRIE.htm> Acesso em: 03 jul. 2009.

NOVITSKY, V.; WESTER, C. W.; DEGRUTTOLA, V.; BUSSMANN, H.; GASEITSIWE, S.; THOMAS, A.; MOYO, S.; MUSONDA, R.; VAN WIDENFELT, E.; MARLINK, R. G.; ESSEX, M. The reverse transcriptase 67N 70R 215Y genotype is the predominant TAM pathway associated with virologic failure among HIV type 1 C-infected adults treated with ZDV/ddl-containing HAART in southern Africa. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, p. 868-878, 2003.

PARIKH, U. M.; BACHELER, L.; KOONTZ, D.; MELLORS, J. W. The K65R mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase exhibits bidirectional phenotypic antagonism with thymidine analog mutations. **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 4971-4977, 2006.

PASSAES, C. B.; GUIMARÃES, M. L.; FERNANDEZ, S. L.; LORETE, R. S.; TEIXEIRA, S. L.; FERNANDEZ, J. C.; MORGADO, M. G. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F circulating in Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 51, n. 1, p. 7-12, 2009.

PERNO, C.; COZZI-LEPRI, F.; FORBICI, A. Minor mutations in HIV protease at baseline and appearance of primary mutation 90M in patients whom their first PI antiretroviral regimen failed. **Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 189, p. 1983-1987, 2004.

POND, S. L. K.; SMITH, D. M. Are all Subtypes Created Equal? The Effectiveness of Antiretroviral Therapy Against Non-Subtype B HIV-1. **Clinical Infectious Diseases**, 48:1306-9, 2009.

POVEDA, E.; DE MENDOZA, C.; PARKIN, N.; CHOE, S.; GARCIA-GASCO, P.; CORRAL, A.; SORIANO, V.. Evidence for different susceptibility to tipranavir and darunavir in patients infected with distinct HIV-1 subtypes. **AIDS**, v. 22, p. 611-616, 2008.

RAMBAUT, A.; ROBERTSON, D. L. ; PYBUS, O. G. ; PEETERS, M. ; HOLMES, E. C. Phylogeny and the origin of HIV-1. **Nature**, v. 410, n. 6832, p. 1047-1048, 2001.

RENJIFO, B.; GILBERT, P.; CHAPLIN, B.; MSAMANGA, G. ; MWAKAGILE, D. ; FAWZI, W.; ESSEX, M. Preferential in-utero transmission of HIV-1 subtype C as compared to HIV-1 subtype A or D. **AIDS**, v. 18, n. 12, p. 1629-1636, 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.; International Non Subtype B HIV-1 Working Group. 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. 643-651, 2006.

ROBERTSON, D. L.; ANDERSON, J. P.; BRADAC, J. A.; CARR, J. K.; FOLEY, B.; FUNKHOUSER, R. K.; GAO, F.; HAHN, B. H.; KALISH, M. L.; KUIKEN, C.; LEARN, G. H.; LEITNER, T.; McCUTCHAN, F.; OSMANOV, S.; PEETERS, M.; PIENIAZEK, D.; SALMINEN, M.; SHARP, P. M.; WOLINSKY, S.; KORBER, B. HIV-1 Nomenclature Proposal. **Science**, v. 288, p. 55-57, 2000.

RODRIGUES, R.; VASQUEZ, C. M. P.; COLARES, J. K.; CUSTODIO, R. M.; BONASSER-FILHO, F.; SOUZA, L. R.; GIANNA, M. C.; MARQUES, C. C. A.; BRIGIDO, L. F. M. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at the Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 97-102, 2005.

SANTORO-LOPES, G.; HARRISON, L. H.; TAVARES, M. D.; XEXEO, A.; DOS SANTOS, A. C.; SCHECHTER, M. HIV disease progression and V3 serotypes in Brazil: Is B different from B-Br? **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 16, p. 953-958, 2000.

SEN, S.; TRIPATHY, S. P.; PATIL, A. A.; CHIMANPURE, V. M.; PARANJAPE, R. S. High prevalence of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in antiretroviral treatment-experienced patients from Pune, India. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, p. 1303-1308, 2007.

SHAFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M. HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Update Framework for the Second Decade of HAART. **AIDS Reviews**, v. 10, p. 67-84, 2008.

SOARES, A. S.; DE OLIVEIRA, T.; BRINDEIRO, R. M.; DIAZ, R. S.; SABINO, E. C. BRIGIDO, L.; PIRES, I. L.; MORGADO, M. G.; DANTAS, M. C.; BARREIRA, D.; TEIXEIRA, P. R.; CASSOL, S.; TANURI, A. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. **AIDS**, v. 17, p. 11-21, 2003.

SOARES, E. A. J. M.; 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. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 34, n. 5, p. 520-526, 2003.

SOARES, E. A. J. M.; SANTOS, A. F. A.; SOUSA, T. M.; SPRINZ, E.; MARTINEZ, A. M. B.; SILVEIRA, J.; TANURI, A.; SOARES, M. A. Differential Drug Resistance Acquisition in HIV-1 of Subtypes B and C. **PLoS One**, v. 8, e730, p. 1-8, 2007.

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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 229-240, 2003.

STEBBING, J.; POWLES, T.; NELSON, M.; BOWER, M. Significance of Variation Within HIV, EBV, and KSHV Subtypes. **Journal of International Association Physicians Aids Care**, v. 5, n. 3, p. 93-102, 2007.

SUCUPIRA, M. C. A.; SOUZA, I. E.; COSTA, L. J.; SCHEINBERG, M. A.; DIAZ, R. S. Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in São Paulo, Brazil. **Antiviral Therapy**, v. 6, p. 263-264, 2001.

SUCUPIRA, M. C. A.; JANINI, L. M. R. Subtipos do HIV. **Tendências em HIV•Aids**, v. 1, n. 2, p. 7-14, 2006.

SUCUPIRA, M. C. A.; CASEIRO, M. M.; ALVES, K.; TESCAROLLO, G.; JANINI, L. M.; SABINO, E. C.; CASTELO, A.; PAGE-SHAFFER, K.; DIAZ, R. S. High Levels of Primary Antiretroviral Resistance Genotypic Mutations and B/F Recombinants in Santos, Brazil. **AIDS PATIENT CARE and STDs**, v. 21, n. 2, p. 116-128, 2007.

SUNPATH, H.; FRANCE, H.; TARIN, M.; MARCONI, V. C.; MURPHY, R.; KANEGAI, C.; LU, Z.; LOSINA, E.; WALKER, B. D.; KURITZKES, D. Prospective analysis of HIV-1 Drug Resistance After Virologic Failure on Antiretroviral Therapy (ART): Initial Results from a Paediatric Cohort Study from KZN, South Africa. In **15th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections**: 2008; Boston, MA.

TAYLOR, B. S.; SOBIESZCZYK, M. E.; MCCUTCHAN, F. E.; HAMMER, S. M. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 15, p. 1590-1602.

TEIXEIRA, P. R.; VITORIA, M. A.; BARCAROLO, J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the Brazilian experience. **AIDS**, v. 18, suplemento 3, p. S5-S7.

UNAIDS. Aids Epidemic Update. **GLOBAL SUMMARY OF THE AIDS EPIDEMIC DECEMBER 2006**. Disponível em : <<http://data.unaids.org>> Acesso em: 05 jul.2009.

WAINBERG, M. A. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. S63-S68, 2004.

WALTER, B. L.; ARMITAGE, A. E.; GRAHAM, S. C.; OLIVEIRA, T.; SKINHOJ, P.; JONES, Y.;STUART, D. I.; MCMICHAEL, A. J.; CHESEBRO, B.; IVERSEN, A. K. N. Functional characteristics of HIV-1 subtype C compatible with increased heterosexual transmissibility. **AIDS**, 23:1047–1057, 2009.