

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL: DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS
SUBTIPOS E DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AOS ANTI-RETROVIRAIS
EM INDIVÍDUOS SOB FALHA TERAPÊUTICA**

TATIANA GASPERIN BACCIN

Orientadora

Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Saraiva Pereira

Co-orientadora

Dr^a Mariza Gonçalves Morgado

PORTO ALEGRE

2007

TATIANA GASPERIN BACCIN

**GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA TIPO 1 NO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL: DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS
SUBTIPOS E DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRETROVIRAIS
EM INDIVÍDUOS SOB FALHA TERAPÊUTICA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PORTO ALEGRE

2007

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa. Dra. Maria Luiza Saraiva Pereira, pela disposição, apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

À co-orientadora Mariza Gonçalves Morgado pela orientação mais que oportuna.

Aos colegas de labuta, Irina Marieta Becker e Ivete Machado pelo auxílio durante a execução da técnica e pela paciência nas horas extremas de trabalho.

Ao amigo Heitor Moreira Franco por ter auxiliado nas análises filogenéticas.

Ao Laboratório Central do Estado do RGS por proporcionar todo aparato físico para realização deste estudo.

A este Programa de Pós-Graduação por ter oportunizado meus estudos.

Ao corpo docente pela inesgotável fonte de conhecimento.

Aos pacientes e familiares que foram os principais protagonistas desta pesquisa.

A todos os amigos os quais são indispensáveis à sobrevivência da alma.

E principalmente a minha família por todo amor que nunca tardou ou faltou.

RESUMO

As mutações de resistência aos anti-retrovirais e a diversidade genética do HIV-1 são os principais obstáculos na luta contra a AIDS. O objetivo deste estudo foi descrever a diversidade genética do gene *pol* do HIV-1 bem como determinar o perfil de mutação de resistência às drogas em indivíduos infectados e sob falha terapêutica no estado do Rio Grande do Sul. Foram colhidas 183 amostras de plasma de pacientes infectados com HIV-1 durante o período de outubro de 2004 a setembro de 2005 para a realização do teste de resistência genotípica no Laboratório da Rede Nacional de Genotipagem do Rio Grande do Sul (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde). Para a genotipagem foi utilizado o sistema ViroseqTM (Celera Diagnostic-Abbott, EUA). A subtipagem e a avaliação das mutações de resistência para o HIV-1 foram baseadas no gene *pol* (região da protease e da transcriptase reversa). O subtipo B (53,2%) foi o mais prevalente nos pacientes HIV-1 acompanhados para avaliação de falha terapêutica no Rio Grande do Sul, seguido pelo subtipo C (31,6%) e subtipo F (6,5%). Dos genomas que formaram um grupo monofilético com o subtipo C, 32% tiveram um segmento curto do subtipo B na região da transcriptase reversa, formando um subgrupo com um padrão similar de recombinação e carregando uma nova assinatura de aminoácidos para a região da transcriptase reversa. Outros padrões de recombinação também foram observados (8,2%). Nenhum parâmetro laboratorial ou características sócio-demográficas foi associado a qualquer subtipo específico. Todos os pacientes infectados com vírus recombinantes foram provenientes da região metropolitana. O perfil genotípico das mutações de resistência associadas aos inibidores da transcriptase reversa mostrou uma alta frequência da mutação M184V seguida das mutações associadas à timidina. A mutação K103N foi a mais prevalente para os inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos e o perfil de mutações associado aos inibidores da protease, mostrou as mutações L63P, M36I/V, e L10V/I como as mais prevalentes. Uma clara associação entre os subtipos e mutações de resistência e polimorfismos associados aos inibidores da protease e da transcriptase reversa foi observada. A manutenção do programa de genotipagem para pacientes infectados pelo HIV-1 é importante para o manejo da terapia anti-retroviral e para o monitoramento da peculiar epidemia molecular do HIV-1 nesta região do Brasil.

ABSTRACT

The anti-retroviral resistance mutations and viral genetic diversity are the main obstacles in the fight against AIDS. The objectives of the present study are to describe the genetic diversity of HIV-1 *pol* gene and to determine the drug resistance profile among infected individuals failing highly active antiretroviral therapy in the state of Rio Grande do Sul, Brasil. Plasma samples from 183 patients were collected during the years 2004 and 2005 to perform the viral resistance genotyping at RENAGENO Laboratory from Rio Grande do Sul (Fundação de Produção e Pesquisa em Saúde). Viral resistance genotyping was performed using Viroseq™ Genotyping System (Celera Diagnostic-Abbott, US). The subtyping and evaluation of the anti-retroviral resistance mutations were based on *polymerase* gene (*pol*) sequences (protease and reverse transcriptase-RT regions). The subtype B was the most prevalent (53.2%) in HIV-1 patients from Rio Grande do Sul failing HAART, followed by subtype C (31.6%) and subtype F (6.5%). Thirty-two percent of the genomes clustering in clade C have a small clade B segment at the reverse transcriptase, forming a sub-cluster within clade C with a similar CB recombinant structure and carrying new amino acid signatures. Other mosaic genomes were also observed (8,2%). No laboratory parameter or social-demographic issues was associated with any specific subtype. However the infected individuals with *pol* recombinants viruses were founded only in metropolitan region. The genotyping profile associated to the reverse transcriptase inhibitors showed a high frequency of the M184V mutation followed by the thymidine-associated mutations. The K103N mutation was the most prevalent for the non-nucleoside RT inhibitor and the resistance associated to protease inhibitor showed the minor L63P, M36I/V and L10V/I mutations as the most prevalent. A clear association between subtype and drug resistance mutations or molecular polymorphisms was observed in this study at protease and transcriptase genes. The maintenance of resistance genotyping programs for HIV-1 patients failing HAART is of great importance for the management of ARV therapies and to monitor the peculiar HIV-1 molecular epidemy in this region of Brazil.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 PARÂMETROS VIROLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS NA PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HIV-1. (CONFORME PANTALEO <i>ET AL.</i> , 1993).....	5
FIGURA 2 ESTRUTURA GENÔMICA DO HIV-1 E LOCALIZAÇÃO DOS GENES EM RELAÇÃO À CEPA REFERÊNCIA HXB2.....	7

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

- FIGURA 1: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *NEIGHBOR JOINING* DE SEQÜÊNCIAS REPRESENTATIVAS DO ESTUDO EM GERAL PARA A DETERMINAÇÃO DOS SUBTIPOS...45
- FIGURA 2: ÁRVORE DE *NEIGHBOR JOINING* INCLUINDO O SUBTIPO C MUNDIAL E SEQÜÊNCIAS DO SUBTIPO C DESTE ESTUDO.....46
- FIGURA 3: IMAGENS DE BOOTSCANNING DE SEQÜÊNCIAS *POL* REPRESENTANDO DIFERENTES MOSAICISMOS.....47
- FIGURA 4: ALINHAMENTOS DOS CONSENSOS DE AMINOÁCIDOS DA REGIÃO DA PROTEASE E DA TRANSCRIPTASE REVERSA NOS DIFERENTES SUBTIPOS ENCONTRADOS.....48
- FIGURA 5: PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES ASSOCIADAS À RESISTÊNCIA VIRAL NO GENE DA TRANSCRIPTASE REVERSA E DA PROTEASE, COMPARADOS À REFERÊNCIA HXB2.....49

LISTA DE TABELA DO ARTIGO

TABLE 1 EPIDEMIOLOGIC AND LABORATORIAL CHARACTERISTICS OF HIV-1 POSITIVE INDIVIDUALS ACCORDING TO VIRAL SUBTYPES.....	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

ARV: Anti-retrovirais

CRF: *Circulating Recombinant Forms*

Env: gene que codifica para as proteínas estruturais do envelope viral

Gag: gene que codifica para as proteínas estruturais do capsídeo viral

HAART: *Highly Active Anti-retroviral Therapy*; terapia altamente potente

HIV-1: *Human Immunodeficiency Viruses type 1*

INNTR: inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa

INTR: inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa

IP: Inibidores da protease

LTR: *long terminal repeats*; terminações repetitivas longas

ORF: *open reading frame*; fase aberta de leitura

PCR: *Polymerase chain reaction*; reação em cadeia da polimerase

Pol: gene que codifica para as enzimas virais

PR: enzima protease viral

Rev: *regulator of viral expression*

RT: *reverse transcriptase*; enzima transcriptase reversa

TAM: *thymidine-associated mutation*

Tat: *trans-acting transcriptional activator*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	II
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
INTRODUÇÃO	1
1. HISTÓRICO	1
2. EPIDEMIOLOGIA	2
3. HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1	3
4. MORFOLOGIA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV-1	5
5. CICLO DE INFECÇÃO E REPLICAÇÃO DO HIV-1	8
6. PATOGÊNESE DA INFECÇÃO DO HIV-1	9
7. DROGAS ANTI-RETROVIRAIS	12
<i>7.1 DROGAS QUE AGEM NA ETAPA DA TRANSCRIÇÃO REVERSA</i>	12
<i>7.2 DROGAS QUE ATUAM NA MATURAÇÃO VIRAL</i>	13
8. RESISTÊNCIA VIRAL ÀS DROGAS	13
9. TESTE GENOTÍPICO PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA ÀS DROGAS ANTIRETROVIRAIS	14
10. DIVERSIDADE DAS SEQÜÊNCIAS VIRAIS	15
OBJETIVOS	20
RESULTADOS	21
<i>ARTIGO 1</i>	21
CONCLUSÕES	50

REFERÊNCIAS.....	51
ANEXOS	57

INTRODUÇÃO

1. Histórico

Durante toda a história da humanidade, os microorganismos têm suscitado um constante desafio à sobrevivência das espécies. Todavia, ocasionalmente, a emergência ou re-emergência de um microorganismo resulta em catastróficas pandemias com conseqüências sérias para a saúde pública mundial. No século XX, a pandemia causada pelo influenza A (1918) foi devido a um já conhecido, mas re-emergente, micróbio o qual causou a morte de aproximadamente 25 milhões de pessoas em todo o mundo (Fauci, 1999). A outra pandemia, a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), foi primeiramente descrita em 1981 em homens homossexuais jovens que apresentavam uma redução dramática dos linfócitos T e diminuição da relação linfócitos T auxiliares e linfócitos T supressores (Prusiner, 2002). A divulgação desta imunodeficiência concomitantemente à explosão de novos casos em diferentes grupos de pessoas, deu início à busca incessante pela descoberta da sua causa. Em 1983, Barré-Sinoussi e colegas do Instituto Pasteur em Paris, foram os primeiros a publicar a etiologia viral da AIDS e, após receber uma série de denominações diferentes, hoje o vírus é conhecido como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Robert Gallo e seus colegas do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos foram igualmente importantes por mostrar que o vírus encontrado pelos pesquisadores franceses era a causa da AIDS (Gallo *et al.*, 1984; Schüpbach, 2003).

2. Epidemiologia

Passados mais de vinte anos desde a identificação da etiologia viral da AIDS, ocorreram aproximadamente 25 milhões de mortes devido a esta síndrome (UNAIDS 2005). Estima-se que mais de 50 milhões de indivíduos estejam hoje infectados pelo HIV em todo o mundo. Cerca de 12000 novas infecções ocorreram diariamente no ano de 2006 e 95% destes novos casos estão localizados nos países em desenvolvimento. Destes novos casos, 86% abrangeram pessoas com idade entre 15 e 49 anos, dos quais quase 50% são mulheres e cerca de 50% têm idade entre 15 e 24 anos (UNAIDS, 2006). Portanto, o impacto negativo desta pandemia no desenvolvimento econômico e social, especialmente nestes países, atinge hoje proporções sem precedentes.

No Brasil, segundo os registros do Ministério da Saúde, foram notificados entre janeiro de 1980 e junho de 2006, 433.067 casos de infecção pelo HIV (Ministério da Saúde, 2007). A evolução da epidemia da AIDS no Brasil entre a última década do século XX e os primeiros anos do século XXI, caracteriza-se por variações nas taxas de transmissão em relação aos modos de transmissão corrente. Durante a primeira fase da epidemia, a transmissão do HIV-1 ocorreu principalmente entre homossexuais masculinos. Na segunda fase, uma via de transmissão adicional, a do uso endovenoso de drogas, assumiu uma posição de destaque no processo de disseminação da infecção. A compilação das tendências sócio-demográficas da epidemia de AIDS no Brasil aponta como principais eventos o aumento da incidência da infecção em jovens, mulheres, heterossexuais, indivíduos de menor poder aquisitivo, bem como a interiorização da doença no País (Ministério da Saúde, 2007). O desenvolvimento da multiterapia anti-HIV altamente ativa (*Highly Active Anti-retroviral Therapy* -

HAART) baseada na administração concomitante de drogas pertencentes à classe dos inibidores de protease e da RT, teve um grande avanço para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes infectados. No Brasil, a distribuição gratuita de drogas anti-retrovirais como a zidovudina, tem sido feita desde 1987, e os inibidores da protease desde 1996, sendo o Brasil um dos raros países que adotaram este tipo de programa de distribuição gratuita. Porém, os freqüentes casos de intolerância e a emergência de mutações de resistência aos anti-retrovirais, somando-se ao alto custo do tratamento, constituem fatores limitantes para a contenção da evolução da epidemia. A supressão incompleta da replicação viral e a natureza não corretiva da enzima viral transcriptase reversa são os principais motivos para o aparecimento destas cepas resistentes (Coffin, 1992; Ho *et al.*, 1995; Schacker *et al.* 1998).

3. História Natural da Infecção pelo HIV-1

O HIV-1 infecta preferencialmente os linfócitos T CD4 e as demais células que apresentam esta molécula de membrana, como monócitos/macrófagos, células dendríticas, entre outras (Dalglish *et al.*, 1984).

A progressão da infecção pelo HIV-1 encontra-se resumida na figura 1. As primeiras manifestações clínicas podem aparecer entre 3 e 6 semanas após a infecção e constitui a chamada fase aguda (Schüpbach, 2003; Pantaleo *et al.*, 1993). As manifestações clínicas nesta fase são transientes e aparecem em 50 a 70% dos pacientes infectados, caracterizando-se por sinais clínicos de imunoinativação e disfunção sistêmica (Schüpbach, 2003). Os pacientes costumam procurar assistência médica devido à aparente sintomatologia de quadro viral ou Mononucleose Infeciosa (Schüpbach, 2003). A disseminação hematológica leva

a infecção a todos os tecidos linfóides do corpo e na ausência de uma resposta imune específica, ocorre um rápido aumento na produção e liberação de partículas virais e no número de células infectadas para o sangue (Schüpbach 2003). Laboratorialmente, a contagem de linfócitos T CD4 decai caracterizando uma linfopenia, seguida de um aumento dos linfócitos T CD8 e um pico de produção viral que pode variar amplamente de 10^4 a 10^7 cópias/mL (Schüpbach, 2003; Pantaleo *et al.*, 1993; Schacker, *et al.*, 1998). É logo após a fase aguda que ocorre a soroconversão do portador, ou seja, produção de anticorpos específicos pelo hospedeiro, direcionados contra o envelope viral, os quais são detectáveis por meio de testes imunoenzimáticos. Com o estabelecimento de uma resposta imune ativa, ocorre uma queda significativa nos níveis de carga viral plasmática, aproximadamente após o segundo mês de infecção, mantendo-se em níveis estáveis durante um período de tempo que pode variar desde alguns meses até alguns anos. Este período é conhecido como assintomático ou de latência clínica. A média de tempo para a progressão à AIDS, em pacientes adultos não tratados, é de 10 a 11 anos, mas o tempo de incubação é consideravelmente variável (Schüpbach, 2003; Pantaleo *et al.*, 1993). Em 5 a 10% dos pacientes considerados progressores rápidos, a AIDS se desenvolve entre 2 e 3 anos após a infecção. Por outro lado, 5 a 10% dos pacientes não progressores são assintomáticos após 7 a 10 anos de infecção, com contagem de linfócitos T CD4 estável embora abaixo dos níveis normais (Schüpbach, 2003). Durante todo o período assintomático, ocorre uma tentativa de equilíbrio dinâmico entre produção de anticorpos e a proliferação do patógeno nas células T. O deslocamento deste equilíbrio em favor do vírus, por esgotamento da resposta imune ou qualquer outro fator que propicie ao mesmo tempo sobrepujar as defesas orgânicas, põe fim ao período assintomático havendo uma elevação significativa da carga viral.

Nesse momento, inicia-se o período sintomático com aparecimento das infecções oportunistas e tumores, caracterizando um quadro clínico de AIDS (Schüpbach, 2003). Além disso, a infecção no sistema nervoso central pode levar a doenças associadas ao HIV, como demência, mielopatia vacuolar e neuropatia sensorial (Petito *et al.*, 1999).

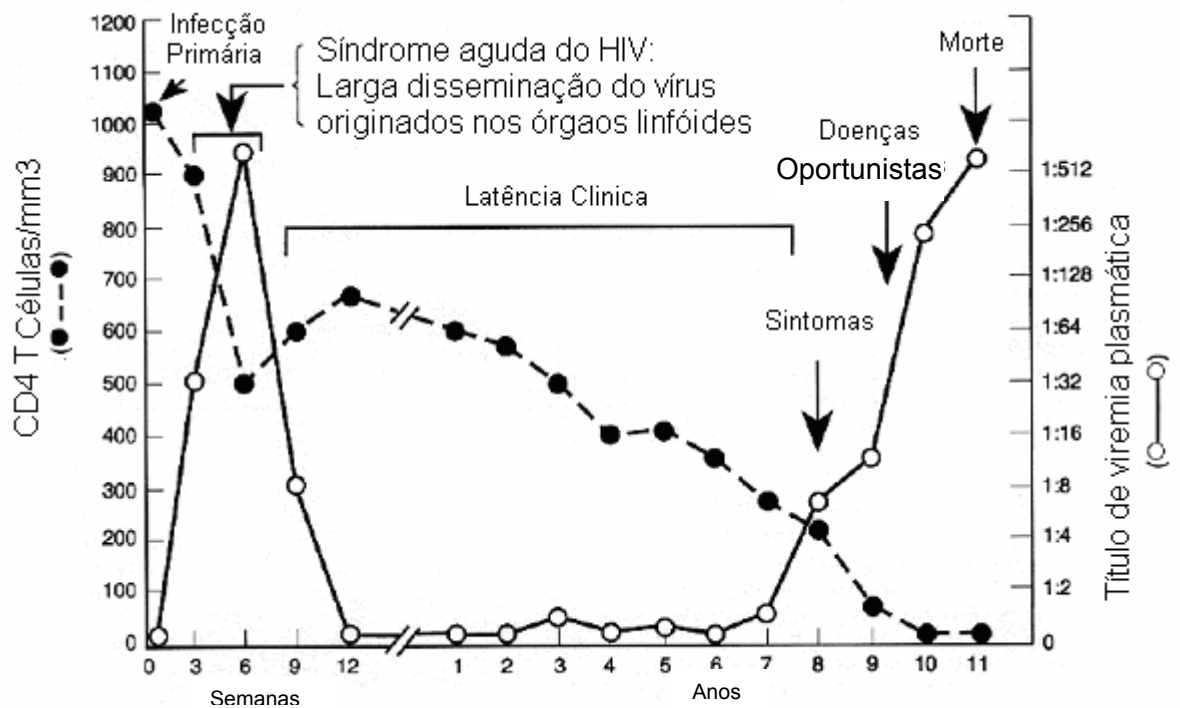


Figura 1 Parâmetros virológicos e imunológicos na progressão da infecção pelo HIV-1. (conforme Pantaleo *et al.*, 1993).

4. Morfologia e Organização Genômica do HIV-1

O HIV-1 é um vírus do gênero *Lentivirinae* da família *Retroviridae*. Este grupo dos retrovírus está associado às infecções persistentes com longos períodos de latência clínica (Gelderblon *et al.*, 1987). A principal característica dos membros desta família é a complexidade de sua organização genética contida em

duas cópias idênticas de fitas simples de RNA de polaridade positiva (Schüpbach, 2003). As partículas infecciosas (*virions*), são esféricas, têm diâmetro médio de 100 nanômetros e são constituídas externamente por um envoltório de natureza lipoprotéica, associado às glicoproteínas do envelope, cujo massa molecular de suas unidades é de 120 KDa (*gp120*) para a proteína externa e 41 KDa (*gp41*) para a porção transmembranar (Schüpbach, 2003). Internamente, as proteínas que integram a matriz (*p17*, 17 KDa) circundam o nucleocapsídeo, o qual alberga o genoma viral, incluindo as enzimas associadas: a transcriptase reversa, a integrase e as proteases (Schüpbach, 2003).

Embora possua genes comuns a todos os retrovírus, como os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, os membros desta família apresentam diversos genes envolvidos com o controle de sua replicação e de suas funções celulares (figura 2). Estes genes, somados aos genes estruturais, formam os 9,8 Kb do genoma HIV-1 (Schüpbach, 2003). A primeira região estrutural *gag* codifica para duas poliproteínas precursoras: uma de 160 KDa e outra de 55 KDa, sintetizadas a partir de um único RNA mensageiro (mRNA), que não sofre processamento de corte e junção. No momento da incorporação destas proteínas às novas partículas infecciosas, a poliproteína *p55* é clivada pela protease viral em três subunidades distintas que incluem a proteína de matriz (*p17 MA*), a maior proteína do capsídeo (*p24 CA*) e a proteína do nucleocapsídeo (*p7/9 NC*). A segunda região é a *pol*, a qual codifica todas as enzimas virais necessárias para a replicação do HIV.

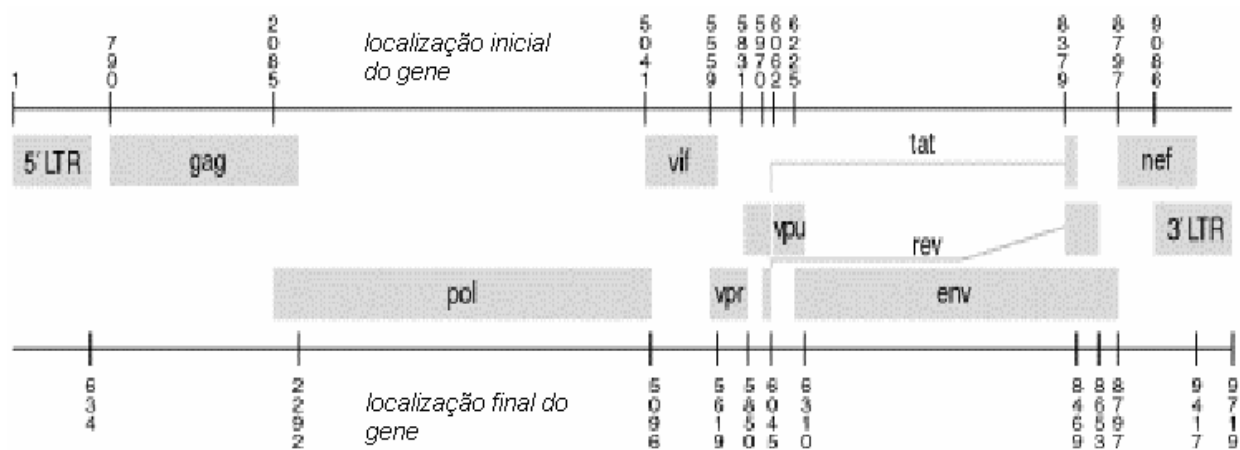


Figura 1 Estrutura genômica do HIV-1 e localização dos genes em relação à cepa referência HXB2.

A protease (*p11*) (PR), a transcriptase reversa (*p66/p51*) (RT) e a integrase (*p32*) são inicialmente sintetizadas sob a forma de um precursor $Pr160KDa^{gag/pol}$ que, no momento da montagem de novos vírions, sofre autocatálise da PR viral, liberando-a do restante do precursor. A PR irá clivar todas as demais proteínas contidas no precursor, iniciando o processo de maturação viral. Assim como todos os outros retrovírus, o HIV-1 possui a enzima transcriptase reversa (RT). A função desta enzima é múltipla e consiste em sintetizar uma molécula de DNA complementar (cDNA) ao RNA viral, degradar o RNA do heteroduplex cDNA-RNA, bem como agir na duplicação da fita de cDNA.

A terceira região gênica estrutural, *env*, codifica a porção mais externa da partícula viral, cujo precursor é uma glicoproteína de 160 KDa, o qual é clivado para originar as glicoproteínas do envelope *gp120* e *gp41*.

Uma sobreposição de fases abertas de leitura (ORFs) codifica para o trans-ativador transcricional *tat* e para o regulador da expressão viral *rev*. Os genes tidos como acessórios, *vif*, *vpu*, *vpr* e *nef* têm suas seqüências intercaladas dentro de outros genes do HIV-1 e são transcritos por meio de complexos processos de

corte e junção (*splicing*) diferencial. Todos estes genes são delimitados por regiões denominadas LTR-3' e LTR-5' (*Long Terminal Repeats*) as quais desempenham importante função de integração entre o genoma viral e o celular, durante o ciclo replicativo do vírus. Além disso, as LTR 5' e 3' (U3-R-U5) contêm seqüências promotoras e aceleradoras dos genes virais (Schüpbach, 2003).

5. Ciclo de Infecção e Replicação do HIV-1

A entrada do vírus na célula hospedeira inicia-se com a ligação das proteínas de superfície viral (*gp120* e *gp41*) aos co-receptores celulares de quimiocinas (CCR5, CXCR4) e ao antígeno de diferenciação celular (CD4) presentes em linfócitos T, monócitos/macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e células da microglia do sistema nervoso central, entre outras (Dalglish *et al.*, 1984; Deng *et al.*, 1996). A interação da *gp120* com CD4 induz uma mudança conformacional e exposição de outros sítios da *gp120* para tornar possível uma interação eficiente da alça V3 da *gp120* com o respectivo co-receptor (Deng *et al.*, 1996). A ligação da *gp120* ao CD4 não é apenas um passo crucial para a adsorção do vírus na superfície celular, mas também interfere com as vias intracelulares de transdução de sinal e promove a apoptose das células T CD4⁺. Após esta ligação, ocorre a inserção do domínio de fusão hidrofóbico da proteína viral transmembrana (*gp41*) com a membrana celular, permitindo a união da membrana celular e o envelope viral e a conseqüente internalização do nucleocapsídeo contendo o genoma e as enzimas virais, no citoplasma celular (Schüpbach, 2003). Neste compartimento, a enzima transcriptase reversa transcreve o RNA viral em uma fita negativa de cDNA, etapa crucial no ciclo de replicação viral. O cDNA é transportado ao núcleo da célula para integrar-se ao

genoma celular através da ação da enzima integrase, recebendo agora o nome de pró-vírus. A partir deste momento, fazendo uso da maquinaria biossintetizadora da célula além da sua própria maquinaria, o pró-vírus é repetidamente traduzido em suas proteínas. Os precursores das proteínas virais são clivados pela ação das PRs, migrando em seguida para os sítios de maturação, nas imediações da membrana plasmática, de onde brotam as partículas virais maduras.

6. Patogênese da Infecção do HIV-1

Apesar das promissoras descobertas quanto à biologia viral e à patogênese da infecção pelo HIV-1, estas ainda não foram suficientes para determinar as razões da falha da resposta imunológica do hospedeiro em suprimir o vírus e por que o sistema imune entra em colapso no final do período de latência clínica, seguida da progressão para o curso terminal da doença (Romano *et al.*, 1999). A característica principal da doença causada pelo HIV-1 é uma imunodeficiência severa resultante de um comprometimento progressivo, qualitativo e quantitativo dos linfócitos T auxiliares, que expressam na sua superfície uma grande quantidade da molécula CD4, que é o receptor primário do HIV-1. Múltiplos são os fatores que determinam a progressão da infecção, conjugando fatores virais e do hospedeiro os quais ainda não estão completamente elucidados.

Sabe-se que a variabilidade fenotípica das diferentes clados virais, isoladas de um mesmo hospedeiro, pode refletir na patogênese da infecção. Esta variabilidade é traduzida no tropismo celular e receptores de quimiocinas, infecciosidade, citopatogenicidade, cinética de replicação, indução da formação

de sincícios e sensibilidade ao CD4 solúvel (Berger *et al.*, 1999). Devido a esta heterogeneidade, tem sido possível demonstrar, no HIV-1, a existência de variantes virais com tropismo para os macrófagos (M-trópicos), para linhas celulares contínuas T-CD4+ (T-trópicos) e com tropismo misto para macrófagos e linhas celulares (M/T-trópicos). Estudos longitudinais envolvendo indivíduos em várias fases da infecção demonstraram a existência de uma evolução do tropismo viral ao longo da infecção. Assim, os vírus M-trópicos são isolados logo após a transmissão e ao longo de todas as fases da infecção. Ao contrário, as variantes T-trópicas e M/T-trópicas são detectadas em cerca de 50% dos indivíduos nas fases mais avançadas da infecção (Picchio *et al.*, 1998). As diferenças de tropismo celular, entre estirpes de HIV-1, correlacionam-se com alterações estruturais das glicoproteínas do invólucro. Pequenas alterações das sequências de amino ácidos da terceira região variável (alça V3) da glicoproteína de superfície gp 120 podem determinar uma alteração no tropismo celular (Picchio *et al.*, 1998).

A partir de estudos usando modelos *in vivo* foi possível propor um modelo no qual os variantes M-trópicos são os responsáveis pela transmissão entre indivíduos, além de desempenharem um papel extremamente importante nos processos patogênicos da infecção pelo HIV. Parecem ser estes variantes os responsáveis pela degradação gradual e irreversível do sistema imunológico durante a fase assintomática da infecção. As variantes T e M/T-trópicas surgem nas fases mais avançadas da infecção como consequência e não como a causa dessa imunodeficiência, associadas a um rápido declínio dos linfócitos T-CD4+ (Picchio *et al.*, 1998; Yurasov *et al.*, 1999).

O uso de receptores de quimiocinas como co-fatores para a infecção celular e o bloqueio da mesma, mediado pelos ligantes naturais destes

receptores, são atualmente duas das linhas de maior impacto nos estudos de fenotipagem do HIV-1, da história natural da infecção, e de novas estratégias profiláticas e terapêuticas (Berger *et al.*, 1999).

A identificação do CXCR4 como co-receptor para os vírus T-trópicos, a sua relação com a família dos receptores das quimiocinas e a descoberta de que as quimiocinas RANTES, MIP-1a e MIP-1b inibiam a infecção pelos vírus com tropismo para os macrófagos, levou à identificação da molécula CCR5 como principal co-receptor para as estirpes M-trópicas (Feng *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996). O CCR5 é expresso em várias células entre elas as células T e os macrófagos (Berger *et al.*, 1999). A importância do CCR5 na infecção *in vivo* do HIV-1 foi reforçada pela descoberta de que aproximadamente 1% dos Caucásios tem uma deleção homozigótica de 32 pares de bases no gene CCR5, que lhes confere resistência à infecção pelo HIV-1. Assim, o CCR5 parece ser o co-receptor mais importante na transmissão *in vivo* do HIV-1 (Liu *et al.*, 1996).

A expressão de co-receptores nos linfócitos T CD4⁺ depende do seu nível de ativação. Além disso, em linfócitos completamente ativados a replicação do HIV-1 é rápida e eficiente e invariavelmente leva as células infectadas à morte. Já as células que se encontram no estágio G₀ do ciclo celular, abrigam vírus em um estado latente ou dormente. Quando esta célula subsequente torna-se ativada, ocorre também a continuidade da replicação viral (Zack *et al.*, 1990). Para além dos monócitos, macrófagos e células da microglia, as células T CD4⁺ quiescentes infectadas, em latência, que contêm DNA proviral não integrado, representam importantes reservatórios celulares de vida longa para o HIV, constituindo o principal obstáculo para a erradicação do vírus na vigência do tratamento anti-retroviral altamente potente (HAART).

7. Drogas Anti-Retrovirais

Para os diversos alvos críticos onde se poderia bloquear a replicação viral, apenas um número restrito de compostos foram aprovados para a comercialização. No Brasil, o Ministério da Saúde passou a distribuir gratuitamente três classes de anti-retrovirais, a partir de 1996. Os anti-retrovirais, atualmente em uso em larga escala, são drogas que agem nas etapas da transcrição reversa e da maturação viral.

7.1 Drogas que agem na etapa da transcrição reversa

Os inibidores da transcriptase reversa representam uma importante estratégia contra o HIV. Estes podem ser subclassificados como:

- A- Inibidores Nucleosídeos da RT (INTR): são moléculas semelhantes aos nucleosídeos em estrutura, porém com a substituição de um radical hidroxila na posição 3' por outro grupamento químico, impedindo a polimerização da cadeia de cDNA. As seguintes drogas pertencentes a esta classe, as quais são distribuídas na rede pública de saúde, são as seguintes: Zidovudina (AZT), Lamivudina (3TC), Didanosina (ddI) Abacavir (ABC), Zalcitabina (ddC), Stavudina (d4T) e Tenofovir (TDF), sendo este último um inibidor nucleotídeo da RT.
- B- Inibidores Não Nucleosídeos da RT (INNRT): são moléculas que entram no sítio ativo da enzima transcriptase reversa, mudando sua conformação e impedindo a elongação da cadeia de cDNA. Os INNTR são derivados da

piridona e das benzodiazepinas. Exemplos: Nevirapina (NVP), Delaverdina (DLV), Efavirenz (EFV).

7.2 Drogas que atuam na maturação viral

Esta classe de drogas tem como alvo a enzima PR viral, ou seja, atua bloqueando o processo de montagem da partícula viral, impedindo a clivagem dos precursores protéicos. Estas drogas estão entre os anti-retrovirais mais usados clinicamente, com diversos compostos comerciais disponíveis. Exemplos: Amprenavir (APV), Indinavir (IDV), Saquinavir (SQV), Lopinavir (LPV), Ritonavir (RTV), Fosamprenavir (FOS), Atazanavir (ATV) e Nelfinavir (NFV).

8. Resistência Viral às Drogas

A resistência viral às drogas é a causa e a consequência inevitável de uma supressão incompleta da replicação do HIV-1 (Shafer *et al.*, 2000). Mesmo a terapia altamente potente, ou seja, regime de três ou quatro drogas, não é capaz de erradicar o vírus, até mesmo em pacientes com aparente supressão completa da replicação viral (viremia abaixo de 50 cópias/mL) (Schrager & Souza, 1998). No caso das drogas anti-retrovirais usadas contra o HIV-1, a resistência é causada mais freqüentemente por mutações nos genes alvo, ou seja, os genes que codificam para as enzimas RT e PR (Schüpbach 2003).

Existem dois tipos de mutações de resistência: as principais e as acessórias. As mutações principais situam-se no sítio ativo da enzima ou em local próximo a ele e alteram a ligação da droga ao seu sítio alvo, reduzindo diretamente a suscetibilidade de uma enzima aos anti-retrovirais, além de serem relativamente específicas para cada droga e aparecer logo após o início da

terapia (Schüpbach, 2003). As mutações secundárias, ou ditas acessórias, aparecem para compensar uma perda da atividade da enzima, causada pela alteração estrutural gerada pelas mutações principais e podem assim restaurar a capacidade replicativa do vírus mutante contribuindo para a resistência (Schüpbach, 2003).

A evolução desta resistência dentro de um indivíduo depende da geração e seleção de variantes genéticas do HIV-1 com suscetibilidade reduzida às drogas durante a terapia (Ho *et al.*, 1995). Quando a droga inibe parcialmente o HIV-1, a pressão evolucionária resultante seleciona as cepas resistentes que possuem uma vantagem adaptativa em relação às cepas selvagens. É evidente que toda e qualquer mutação pode estar presente antes do início da terapia anti-retroviral, numa mistura de variantes genéticas da população infectante chamadas *quasispecies* (Wain-Hobson, *et al.*, 1992).

Outros fatores, tais como baixa aderência, fatores farmacológicos, além das características celulares próprias do paciente podem contribuir para o insucesso terapêutico (Schüpbach, 2003).

9. Teste Genotípico para Determinação de Resistência às Drogas Anti-retrovirais

A complexidade dos esquemas terapêuticos anti-HIV e o crescente número de indivíduos portadores de vírus resistentes tornaram os testes de determinação de resistência importante ferramenta para a manutenção de uma terapêutica eficaz por períodos longos de tempo. Quando combinados com um histórico detalhado do paciente em aderir ao tratamento, este ensaio pode maximizar os benefícios da terapia.

Os testes de genotipagem buscam determinar a resistência às drogas, por meio da investigação de alterações genéticas ocorridas no genoma viral, capazes de modificar substancialmente a estrutura das proteínas resultantes, bloqueando ou diminuindo a eficiência com que as drogas inibitórias ligam-se às mesmas. Neste método, portanto, a determinação da resistência se dá de forma indireta e depende de uma minuciosa análise de mutações para a determinação da resistência. As mutações de resistência são definidas através de estudos cruzados de genotipagem e fenotipagem, os quais fornecem dados mais detalhados sobre as combinações de mutações e os fenótipos de resistência às drogas. No Brasil, foi implementada pelo Ministério da Saúde a Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO) no final de 2001. Na prática clínica, o resgate da terapia parece ser mais significativo quando se tem a informação gerada pelo teste genotípico de resistência às drogas, como já foi comprovado por estudos prospectivos controlados (Shaffer, 2002).

10. Diversidade das Seqüências Virais

No curso da infecção, o elevado índice de replicação do HIV-1, com produção de 10^{10} partículas virais ao dia em condições não inibitórias, leva a uma taxa de mutação do vírus de cerca de $3,5 \times 10^{-5}$ nucleotídeos por ciclo (Coffin *et al.*, 1992). O principal mecanismo gerador destas mutações reside na enzima transcriptase reversa, a qual não é capaz de atuar com revisora corrigindo os nucleotídeos incorporados erroneamente, permitindo assim o aparecimento de diferentes cepas (Coffin *et al.*, 1992). Outro mecanismo que contribui para a diversidade viral é a recombinação genômica, o que pode ocorrer após uma co-infecção de uma célula com dois vírus diferentes e encapsidação de ambos os

RNAs na mesma partícula (Schüpbach, 2003). Durante a transcrição reversa, a enzima pode produzir uma cepa recombinante ao alternar entre um pró-vírus e outro (Schüpbach, 2003).

Esta enorme variabilidade genética, característica do HIV-1, é observada tanto nas populações virais que infectam um único indivíduo quanto entre isolados de diferentes regiões geográficas (Schüpbach, 2003).

A classificação dos isolados virais, baseada nas relações filogenéticas, subdivide o HIV-1 em grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes circulantes (CRFs). Três grandes grupos foram designados: grupo M (*major*), compreende a maioria das cepas responsáveis pela pandemia de AIDS; o grupo O (*outlier*), reúne vírus altamente divergentes dos isolados do grupo M; o grupo N (*new* ou *non-M non-O*) é o grupo que apresenta a menor dispersão dentre os três (Robertson *et al.*, 2000). A maioria dos subtipos de HIV-1 encontra-se no grupo M, os quais foram subdivididos de A-D, F-H, J e K, além das 32 formas recombinantes circulantes (CRFs) (Leitner *et al.*, 2005), incluindo duas recentemente descritas no Brasil (De Sa Filho *et al.*, 2006).

No início desse novo milênio, o subtipo C se alastrou por vastas regiões do mundo, representando hoje o mais importante dos subtipos, por contribuir com 56% do número de casos de AIDS em todo o mundo (Esparza *et al.*, 2000). Este subtipo foi primeiramente detectado no sul da África e Etiópia e recentemente ultrapassou o subtipo A, predominante na década de 80 e início dos anos 90 na África sub-sahariana. Embora o subtipo B provavelmente tenha precedido o subtipo C como o subtipo fundador na Índia e na China, a maioria das novas infecções nestes países é atribuída ao subtipo C ou recombinantes intersubtipos, como por exemplo B/C (Essex, 1999). Uma tendência similar tem sido verificada

em países da América do Sul como Argentina e Brasil (Brindeiro *et al.*, 2003; Soares *et al.*, 2003)

Muitos estudos no Brasil sobre epidemiologia molecular do HIV-1 têm demonstrado a predominância do subtipo B na maioria das regiões brasileiras, seguido pelo subtipo F1, C, D e mais recentemente, a presença do subtipo A (Morgado *et al.*, 1994; Morgado *et al.*, 1996; Morgado *et al.*, 2002; Tanuri *et al.*, 1999a, 1999b, Tanuri *et al.*, 2001; Caride *et al.*, 2001, Soares *et al.*, 2003). Além destes subtipos, formas recombinantes B/F, B/C e F/D já foram descritas (Sabino *et al.*, 1994; Tanuri *et al.*, 1999b; Guimarães *et al.*, 2002; De Sa Filho *et al.*, 2006). Adicionalmente às diferenças encontradas entre subtipos, outro estudo brasileiro identificou um subtipo B variante chamado “B” brasileiro, o qual difere do subtipo B clássico pela presença de um motivo GWGR na parte superior da alça V3 do envelope *gp120*, ao invés da assinatura molecular GPGR (Morgado *et al.*, 1994; Morgado *et al.*, 1996).

A distribuição geográfica destes subtipos apresenta um padrão bastante diverso no Brasil. Um exemplo disso foi demonstrado em um estudo recente, onde foram analisadas amostras da cidade de Porto Alegre, observando-se uma frequência de 37% do subtipo C (Soares *et al.*, 2003). Esses dados contrastam com o padrão da distribuição dos subtipos de HIV-1 verificado em outras regiões do país, onde o subtipo não-B mais prevalente é o F1, com prevalência de 10%, seguido do subtipo C, observado em torno de 3% das cepas circulantes (Bongertz *et al.*, 2000). Outro estudo realizado recentemente, o qual analisou quase a totalidade do genoma do subtipo C, confirmou a relação monofilética deste grupo. Uma distância nucleotídica de apenas 5,4% foi verificada, sugerindo uma introdução derivada de uma única fonte ou de uma mistura de cepas muito relacionadas entre si (Sanabani *et al.*, 2006).

O fenômeno de recombinação genética entre as cepas circulantes pode ter tido papel chave na evolução recente do HIV-1 uma vez que a mistura de subtipos locais tem fomentado a emergência de uma maior variedade de cepas recombinantes. Apesar dos diversos esforços na tentativa de se relacionar o polimorfismo do HIV-1 com suas características fenotípicas, ainda não está clara a associação entre os componentes genéticos dos diferentes subtipos com atributos biológicos, tais como aumento da transmissibilidade e infectividade, velocidade de progressão para AIDS, sensibilidade a agentes neutralizantes e terapêuticos e demais relações entre vírus e hospedeiro, embora muitos estudos tenham relatado diferenças genotípicas entre eles (Ball *et al.*, 2003). Portanto, não se pode descartar que esta diversidade do HIV-1 possa representar um fator limitante tanto à efetividade da resposta imune normal do hospedeiro à infecção, quanto à eficácia de vacinas e agentes terapêuticos. Há evidências de que certas alterações na seqüência genômica podem alterar a capacidade replicativa do vírus. Por exemplo, a maioria dos isolados do subtipo C apresentam um terceiro centro promotor NF-Kappa β nas regiões LTR, fator este que pode levar a um aumento na transcrição e conseqüentemente na replicação viral (Sanabani *et al.*, 2006).

A ocorrência de micro-epidemias envolvendo o subtipo C, além de outros subtipos não-B e seus recombinantes, como vêm ocorrendo na nossa região (em consonância com outros países como China e Índia), aponta para a necessidade de um monitoramento sistemático e contínuo da epidemia na região Sul do Brasil, para um melhor entendimento da dinâmica de evolução dos vírus circulantes. Todavia, faz-se necessária uma avaliação da emergência do aparecimento e/ou recrudescimento de mutações de resistência em indivíduos infectados com subtipos não-B do HIV-1. Não se sabe ao certo o efeito dos subtipos de HIV-1 e

da terapia na evolução de resistência genotípica, principalmente em regiões onde predominam cepas não-B e onde o acesso à terapia anti-retroviral expandiu, como é o caso da região sul do Brasil.

A avaliação de isolados virais de uma população que está sob falha terapêutica é particularmente importante para uma análise da evolução do HIV-1 sob pressão exercida pela terapia multi-drogas (HAART). Tais dados podem fomentar a elucidação dos mecanismos genéticos de resistência às drogas, os quais são difíceis de serem avaliados através de testes de susceptibilidade *in vitro*.

OBJETIVOS

Principal

Descrever a diversidade genética do HIV-1 no gene *pol*, bem como identificar perfis de mutações de resistência aos anti-retrovirais em pacientes sob falha terapêutica no Estado do Rio Grande do Sul.

Específicos

- Identificar os diferentes subtipos do HIV-1 através de inferência filogenética;
- Identificar a presença de cepas candidatas a recombinantes;
- Determinar as mutações de resistência às três classes de drogas anti-retrovirais, associando-as aos diferentes subtipos e formas recombinantes encontrados.

RESULTADOS

ARTIGO 1

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio Grande do Sul, Brazil: high prevalence of non-B subtypes and polymerase drug-resistance mutations among infected individuals failing highly active anti-retroviral therapy

A ser submetido ao periódico *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio Grande do Sul, Brazil: high prevalence of non-B subtypes and polymerase drug-resistance mutations among infected individuals failing highly active antiretroviral therapy

Tatiana Gasperin Baccin^{a,b}, Mariza Morgado^c, Maria Luiza Saraiva Pereira^{b,d}

^aMolecular Biology Unit, Central Laboratory of Public Health, IPB, State Foundation of Production and Research in Health, Porto Alegre, Brazil;

^bDepartment of Biochemistry, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

^cDepartment of Immunology, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil;

^dMolecular Genetics Laboratory, Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Corresponding author:
Maira Luiza Saraiva-Pereira
Serviço de Genética Médica
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre – RS – Brazil
CEP 90035-903
Telephone: + 5 51 21018011
FAX: + 55 51 21018010
email: mlpereira@hcpa.ufrgs.br

Financial Support:

National Program of STD/AIDS, Ministério da Saúde, and FEPPS, Instituto de Pesquisas Biológicas, Laboratório Central do Estado do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Resistance mutations to antiretroviral drugs associated to the complex diversity of viral genetics is one of the main obstacles in the fight against Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). The aims of present study were to describe the HIV-1 subtypes in 183 viral sequences of the *pol* gene and to determine the resistance profile in infected individuals, who live in the state of Rio Grande do Sul, Brazil failing highly active antiretroviral therapy (HAART). The viral genotyping test was performed using Viroseq™ Genotyping System. Subtype B (54%) was the most prevalent in this population, followed by subtype C (24%) and subtype F (6.5%). Of the genomic sequences that clustered with subtype C, 32% showed a small segment belonging to subtype B located in the gene of the reverse transcriptase forming a subcluster with a similar recombinant structure characterized by a likely amino acid signature. No laboratorial parameter or social-demographic features were subtype-specific; however, there was a clear association between subtypes and prevalence of resistance mutations. The maintenance of the genotyping program for patients failing therapy is essential for monitoring both resistance to antiretroviral drugs (ARV) and the peculiar molecular epidemic of HIV-1 in the south of Brazil.

Keywords: HIV-1, subtype C, recombinant, resistance mutations.

INTRODUCTION

Subtype B of HIV-1 remains the predominant subtype in AIDS epidemic in developed countries, and the antiretroviral drugs used in the treatment of infected individuals have been developed using characteristics of this subtype only. However, the pandemic in developing countries is represented by non-B subtypes, mainly subtype C, which presently is the most prevalent subtype in the world (1). In the south region of Brazil, the prevalence of a monophyletic subtype C and the emergence of recombinant genomes have increased throughout the years (2-5). Highly active antiretroviral therapy (HAART) has revolutionized the treatment of infected individuals (6). Moreover, not all treated patients respond to therapy, and one of the most difficult obstacles for maintaining HIV-1 suppression is the appearance of resistance mutations associated to drug resistance (7, 8). Also, genetic diversity may generate virus with greater resistance to drugs (9), increased replication capacity (9), or change the expression of antigenic epitopes (10). The monitoring of HIV resistance through the genotyping test guides the rescue of the antiretroviral therapy and allows the vigilance of the genetic diversity of HIV-1 in different geographic regions. In Brazil, the public health network provides access to antiretroviral therapy. Moreover, the Ministry of Health, through the National STD and AIDS Program, has established a network for viral genotyping that includes patients with therapeutic failure. In the present study, we analyzed the resistance profile to antiretroviral drugs of 183 patients living in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. These patients were selected according to the criteria of therapy failure in order to correlate patients' profile to the different circulating subtypes.

METHODS

Population and Sample Collection

Sample population was composed by patients who live in Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. Inclusion criteria was therapy failure (HAART) according to parameters pre-established by the national genotyping network, i.e., for those patients whose quantification of viral load remained high ($>5,000\text{cp/mL}$) despite the use of three or more antiretroviral drugs including at least one protease inhibitor (PI). Details on treatment criteria and definition of therapy failure established for the public network in the country are available on the page of the PN-DST/AIDS, MS (<http://www.aids.gov.br>).

Blood samples were collected in the Central Laboratory of Rio Grande do Sul (LACEN) between September 2004 and October 2005. Blood was collected in two 5ml tubes containing EDTA and plasma was obtained, aliquoted and stored at -70°C until the genotypic test was performed.

All patients were followed in public health centers where they had free access to antiretroviral drugs financed by the Ministry of Health. Each patient signed a free and informed consent. Laboratorial and sociodemographic parameters were obtained from a form completed in the health unit where each patient was followed.

The National Research Ethical Committee (CONEP) under approval number 00020118165-05 approved this study.

Genotypic Resistance Test for HIV-1, Determination of Viral Subtypes, and Phylogenetic Analysis

ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System version 2.6 (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, USA) was used to determine the resistance mutations located in the *pol* gene following manufacturer's instructions. In short, viral RNA was isolated in a pellet by ultracentrifugation (21.000g x 120min), followed by cDNA synthesis and genomic amplification by PCR. Fragments were sequenced in an ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc, Foster City, USA).

ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System import sequences automatically and those are compared to the reference HXB2 cepa. Following a manual edition and the establishment of a consensus sequence, software analyses mutations and generate resistance mutation profiles according to different drugs classes. These results are analyzed based on a algorithm that determine mutation impact transcriptase reverse and protease in open reading frame in the development of anti-retroviral drugs.

All sequences were submitted to quality control using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool Analysis) to certify the absence of sample mixtures or contamination (<http://aids.gov.br/renageno>).

Qui-square test was applied to estimate association of mutations and sub-types. Multiple comparisons were performed using PEPI program. Yates corrected or Fisher's test (SPSS14evaluation™) were used when appropriate; $P < 0.05$ was considered significant.

All subtype classifications were screening with an automatic method (11) and to genetic subtyping confirmation all sequences were aligned by ClustalX v.1.83 program (12) against a reference set extracted from Los Alamos National Laboratory (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/mainpage.html>). BioEdit v. 5.0.9.1 software was used for manual edition. To phylogenetic inference the Neighbor-Joining (NJ) trees were built over HKY 85 matrixes by means of PAUP* 4.10b (13) and visualized with Treeview program (Rod Page, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). HIV-1 group O was used as an outgroup to root the trees. Bootstrap values (1,000 replicates) higher than 70% were considered significant. In addition, maximum likelihood trees were also constructed to corroborate the neighbor-joining trees (14), and the nucleotide substitution model was suggested through Modeltest 3.7 (15).

Sequences that showed an outlier behavior in the NJ tree were selected for bootscanning analysis using Simplot software v.3.5.1 (16) (Stuart Ray, <http://www.med.jhu.edu/deptmed/sray/download/>). Recombination points were also defined using this program. These points were more precisely mapped by signature inspection of subtype-specific amino acids through alignments built by BioEdit v. 5.0.9.1 software. Signatures that discriminated local subtypes B and C, were defined as those amino acids found in at least 50% of the isolates.

RESULTS

Frequencies of subtypes classified in the *pol* region

Majority of sequences analyzed (54%) grouped with subtype B, followed by subtype C (24%), and subtype F (6%). Figure 1 illustrates the phylogenetic relations found among samples, whose topography was built including samples representative of the casuistic of this study. Moreover, many of the sequences that grouped with subtype C (32%) also formed among themselves a monophyletic subgroup with a confidence level of 83% (Figure 2). Bootscanning showed that this subgroup has a mosaic structure that is similar in itself, with a small portion related to subtype B in the RT region. These mosaics had coinciding intersection points (Figure 3a), located between nucleotides 2953-3162 approximately (relative to HXB2) of the RT region. One sequence (0.6%) grouped with the Argentine CRF12_BF (Figure 1). A sample (highlighted in Figure 1 and 3c) showed intersection points related to the CRF07_BC and grouped with the reference sequence of the Chinese recombinant. Other mosaics presented different recombinant patterns (URF, unique recombinant form) between clade C and F (n=3; 1.6%), C and B (n=4; 2.5%), and between clade B and F (n=6; 3.3%). Alignments of consensus amino acid sequences against isolates of this study are represented in Figure 4. The sequence of mosaics Cb in the protease region, that is, the C portion where there was no recombination, retained the signature specific for the Brazilian C, such as S12T, I19L, N37K, and K41N, with the selection of one L63P resistance polymorphism in over 50% of C isolates (Figure 4a). In the RT region of subtype C and in the portion C of mosaic Cb, sequences also showed

polymorphisms present in over half of the isolates, such as E39D and G123D. For mosaics Cb, in the portion that supposedly belongs to clade B (beginning indicated by the big arrow in Figure 4c), same polymorphisms present in the consensus of isolates B of the present study were observed, with an additional T215F polymorphism. Besides, 90% of the Cb isolates presented the consensus motif for subtype B, FRKQNP (indicated by the small arrow in Figure 4c).

Lack of association between HIV-1 subtype infections and epidemiological or laboratory parameters

Table 1 shows a comparative analysis of epidemiological and laboratorial characteristics of patients included in the present study; patients were distributed according to their infection by subtypes B and C and mosaic Cb, and classified based on the *pol* region most frequently found in the studied population. None population characteristic was statistically associated with any of the three subtypes compared. Curiously enough, no subtype classified as mosaic Cb was from the interior of the state.

Profiles of genotypic resistance

The profile of mutations defined by this study is represented in Figure 5. Three samples (1.6%) did not show any resistance mutation, and other three samples (1.6%) were multiresistant, that is, showed resistance to three classes of antiretroviral drugs. Main substitutions in the RT region of HIV-1, which are related with resistance to the nucleoside inhibitors of the reverse transcriptase (NRTI), were M184V/I (68%), T215F/Y (50%), D67N/G (48%), M41L (39%), T219Q/E/N

(33%), L210W (29%), K70R (28%), and V118I (28%) (Figure 4). In general, 35% of the strains from subtypes B, C or Cb showed an association of D67N/G + M184V/I + T215F/Y. Mutations V118I ($P = 0.012$), M184V ($P = 0.007$), and L210W ($P = 0.045$) were associated to subtype B. No resistance mutation for that drug class was associated with subtype C and mosaics Cb. For the class of non-nucleoside inhibitors of RT (NNRTI), mutation K103N/S, which provides a high level of resistance to all NNRTI, was the most prevalent (39%), followed by mutations Y181C/I/V (12%), I188L (9%), V106M (6%), F227L (5%), and P225H (5%). Mutation V106M ($P = 0.004$), which provides high resistance to nevirapine and efavirenz, was associated to subtypes C and mosaic Cb, while mutation F227L, which contributes to the resistance to nevirapine ($P = 0.01$), was associated to subtype C only. Resistance mutations for NNRTI to subtype B were not associated.

The resistance profile associated to protease gene for subtypes C, B and mosaics Cb (Figure 5a) was polymorphism L63P, present in 62% of samples, followed by polymorphisms M36I/V (53%), L10V/I (36%), A71V/T (33%), V77I (28%), and K20M/R (19%), and by secondary mutations M46I/L (21%), N88D (12%), and G73C/S/T/A (12%). The most frequent primary resistance mutation was L90M (29%), followed by mutation D30N (21%), which acquires high resistance to nelfinavir, and I54V (18%), which acquires resistance to most protease inhibitors. An association of M36I/V + L63P + L90M was observed in 30% of samples. There was a clear association of mutations L10V ($P < 0.001$), M46I ($P = 0.001$), L63P ($P < 0.001$), A71V ($P = 0.001$), and G73C ($P = 0.01$) with subtype B. The association of mutation M36I ($P < 0.001$) and subtype C and mosaic Cb was also clear. No resistance mutation was associated exclusively to mosaic Cb. In general, the main

mutations together with the mutations of secondary importance to PI resistance were around three times more prevalent in subtype B when compared to subtype C. Mosaic Cb showed an intermediary number of resistance mutations when compared to previous groups.

DISCUSSION

In the present study, a high frequency of non-B subtypes for *pol* genomic region of HIV-1 was observed among individuals with therapy failure followed in Rio Grande do Sul, Brazil. Of a total of 183 strains sequenced, 46% were classified as non-B. This percentage is different from other regions in the country; for instance, in the southeast region frequency of these subtypes is around 15% (17,18), while in the northeast and center-west regions frequency of non-B stains is less than 10% (19). Frequency of clade C found in this study (36%) was slightly lower than frequencies of this subtype in other studies performed in Rio Grande do Sul carried out with recently diagnosed HIV-1 positive individuals (2,3,5). One possible explanation is that HIV-1 subtype C viruses are at least 100-fold less fit than any HIV-1 A, B, D, F, CRF01_AE, CRF02_AG, and CRF12_BF isolates and, as a consequence, disease progression would probably be slower for subtype C infected individuals (20).

Moreover, recombinant forms of F1 and cepas B of HIV-1 was observed in seven cases, but only one case showed the same pattern of recombination of CRF12_BF (Figure 1) from Argentina, country whose epidemiological profile has shown to be similar to that of Brazil (21). Another quimeric form found in one individual who lives on the border between Uruguay and Argentina was the CR07_BC that was previously described in China (22). The epidemiological impact of the introduction of these variants in low prevalence regions remains unknown.

The phylogenetic analyses in the *pol* region allowed finding an independent group within subtype C (Figures 1 and 2). A more detailed analysis of that region was performed aiming to confirm mosaicism and to determine recombinant points (Figures 3a and 4c). A recombinant region was defined that represented coincident intersection points with all mosaics Cb, in other words, a region of approximately 210 nucleotides within the 3' portion of the RT gene belonging to subtype B. During the time we were preparing this paper, a new Brazilian CRF31_BC was described (23), which presents exactly these same breakpoints observed in our study at the RT region. This recombinant group accounted for 32% of the total of group C, and for 14% of the total, which shows that a large number of recombinant events are taking place between the two most frequent subtypes in that geographical region. This can suggest that these recombinant events can reach epidemic proportions in a near future, as it happened with CRF08_BC in China (22). These findings are in agreement to another study performed with samples from city of Porto Alegre, which found 43% of recombinants within group C (5). Based on the fact that half of infected individuals with these mosaics Cb virus included in this study was diagnosed in the 1990s and that the other half was infected more recently (data not showed), we can suggest a not so recent introduction of these recombinant strains between virus C and B in the state of Rio Grande do Sul. An additional analysis of the amino acids located in the protease region of subtype C and of portion C of mosaic Cb showed the presence of specific mutations that match to the signature previously published for the Brazilian subtype C, such as S12T, I19L, N37K, and K41N. However, in the present study, an additional polymorphism, L63P, was found in isolates C, which is not present in reference sequences of subtype C and is more frequently found in subtype B (9). This polymorphism contributes to resistance only when is present in

combination with other resistance mutations. The presence of a specific signature of subtype C in the C portion of the quimeric form found in this study supports the evidence that a recombinant event occurred between locally circulating subtypes B and C; therefore, it does not represent an introduction via migration of strains that recombined outside the country. A specific signature for subtype C in the protease region could contribute to greater enzymatic vitality for this subtype when compared to subtype B in *in vitro* assays. Moreover, these substitutions in the protease gene may be involved in the process of viral resistance to PI. Additionally to the polymorphisms found in the protease region for subtype C, 4 substitutions located in the RT gene were found that were present in over half of the C isolates of this study (A36E, E39D, G123 D, A173T). The high prevalence of these polymorphisms in the RT region might be a result of the selection exerted by antiretroviral drugs through genetic mechanisms still unknown. Data on the specific phenotypic or biochemical role of these substitutions remains unknown; consequently, studies to define the impact that those substitutions in the viral resistance to ARV are required. Polymorphisms in mosaics Cb were also found and could represent a signature for this recombinant, characterized by mutations E39D, G123D, I135T, A173K, E177D, A200T, E207Q, and T215F. Analyzing polymorphisms that belong to portion B, coinciding amino acids with circulating B consensus were identified, such as 135T, 173K, 177D, 200T, and 207Q. Moreover, 90% of the mosaics presented the motif of isolates B consensus, FRKQNP (Figure 4b), which supports the observation that the recombinant phenomenon happened between locally circulating subtypes B and C. No association between specific subtypes and patients characteristics, such as sex, number of therapeutic failures, place of origin, and well as laboratorial parameters of viral load and CD4 cells count, was found. This finding is in agreement to data

from previously conducted study (3). However, the absence of mosaics in inland of the state may suggest that the phenomenon of recombination tends to happen in regions of greater demographic concentration.

The present study also defined the profile of resistance mutations (when compared to the wild strain HXB2) for each class of antiretroviral drug for a population exposed to highly potent therapy. It has to be highlighted that this profile of mutations is associated to continuous viral replication with selective influence of antiretroviral therapy. Several studies have demonstrated that the test of resistance to drugs generates substantial benefits for therapeutic management of HIV-1 infected patients (24, 25). According to Kantor *et al.*, around 80% of resistance mutations in non-B subtypes are selected by antiretroviral therapy and do not happen spontaneously (26). In the present study, it was possible to detect a high prevalence of mutations related to resistance to antiretroviral drugs in the *RT* gene and/or in the protease gene, and differences between the profiles of mutation for specific subtypes were found. Of the 21 sites located in the protease gene and associated to resistance to treatment, 8 showed significant differences between the specific subtypes, although all sites are considered only secondary, that is, they must be associated to other mutations in order to lead to resistance. However, the presence of multiple accessory mutations may lead to a decrease in the genetic barrier and allow for a rapid selection of resistance, when compared to wild isolates. Still for protease region, the secondary residue M36I/V was clearly associated to subtype C (84%) and was found in all isolates of the quimeric group Cb. These substitutions have been previously reported by other studies, but experimental evidences with non-B isolates are still required in order to evaluate their impact in resistance (25, 27). In a worldwide study that compared thousand of

non-B isolates and B isolates, polymorphism M36I was considered subtype-specific and represented a consensus for groups A, C, D, F, G, CRF01_AE, as well as CRF02_AG and B, isolated from naïve persons (26). Nevertheless, when treated patients and non-treated patients were compared, this polymorphism was not associated to treatment (26). On its turn, polymorphism L63P, which was the most frequent in subtypes C and B in the present study, seems to be a substitution selected by the use of PI broadly used by the population of this study (data not shown).

For the RT region, 31 sites related to resistance to NRTI and NNRTI were analyzed, and polymorphisms and mutations specific for each subtype were found. The most frequent substitution found in this region was M184V for both subtypes C and B. This substitution is present in around 70% of isolates and is associated to early virological failure due to the widespread use of lamivudine (3TC) in this population (data not shown). The second most prevalent group of substitutions in the RT region was the thymidine associated mutations (TAM), which are selected predominantly by drugs analogue to thymidine, such as zidovudine (AZT), and stavudine (d4T), but cause cross-resistance to most NRTI. Mutations V118I, M184V, and L210W were associated to subtype B; however, no resistance mutation was associated to NRTI subtype C and mosaics Cb.

Mutation K103N/S (39%) was the most prevalent within NNRTI class and leads to high resistance to these drugs. Mutation V106M was associated to subtypes C and Cb, while mutation F227L was associated to subtype C only. No NNRTI mutations were associated to subtype B. This difference in associated resistance mutations among subtypes is probably due to different genetic mechanisms that

lead to resistance during treatment selective pressure; therefore, these mechanisms may influence resistance progression. In general, an association between HIV-1 subtypes and different profiles of resistance mutations as to PI and RTI was clearly observed in the present study. Moreover, a high prevalence of these mutations was found in 98.4% of the patients in this study. Nevertheless, a relevant piece of data is the incidence of resistance mutations for PI, which was around three times higher for subtype B. Another finding was a group of polymorphisms still not associated to resistance in the RT region.

Further studies in order to evaluate the impact of these mutations in viral replication or vitality and in the progression of resistance to antiretroviral drugs in non-B subtypes are required. These studies may contribute to improve the knowledge on resistance mechanisms.

Acknowledgments: The authors would like to thank patients and their relatives, who kindly agreed to participate in this study. The authors are also grateful to José Carlos Couto Fernandez and Heitor Moreira Franco by their valuable help in this work. The Brazilian Ministry of Health and the Foundation of Health Production and Research financed this study.

REFERENCES

1. Esparza J, Bhamarapavati N. Accelerating the development and availability of HIV-1 vaccines: Why, when, where and now? *The Lancet* 2000; 355: 2061-66.
2. Soares MA, De Oliveira T, Brindeiro RM, et al. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003; 17: 11-21.
3. Soares EA, Martinez AM, Souza TM, et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19 Suppl 4:S81-6.
4. Guimarães LM, Moreira AS, Loureiro R, Galvão-Castro B. High Frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2002; 18(17): 1261-69.
5. Rodrigues R, Scherer L, Oliveira CM, et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at *polymerase* gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res.* 2006; 116: 201-07.
6. Pallela FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 1998; 338: 853-60.
7. Shaffer RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002; 5: 247-77.
8. D'Aquila RT, Achapiro JM, Brun-Vézinet F, et al. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 2002; 10:21-25.

9. Gonzalez LM, Brindeiro RM, Aguiar RS, et al. Impact of nelfinavir resistance mutations on in vitro phenotype, fitness, and replication capacity of human immunodeficiency virus type 1 with subtype B and C proteases. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3552-55.
10. Tumas KM, Poszgay JM, Avidan NK, et al. Loss of antigenic epitopes as the result of *env* gene recombination in retrovirus-induced leukemia in immunocompetent mice. *Virology* 1993; 192: 587-95.
11. Oliveira T, Deforche K, Cassol S, et al. An automated HIV-1 subtyping tool. Presented at: XV International AIDS Conference; 2004; Bangkok.
12. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997; 25: 4876-82.
13. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4: 406-25.
14. Rogers JS, Swofford DL. Multiple local maxima for likelihoods of phylogenetic trees: a simulation study. *Mol Biol Evol.* 1999; 16:1079-85.
15. Posada D, Crandall KA. Modeltest: test the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998; 14:817-18.
16. Salmien MO, Carr JK, Burke DS, et al. Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by bootscanning. *AIDS Research and Human Retroviruses* 1995; 11: 1423-25.
17. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, et al. A. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F. *Aids Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 569-75.

18. Tanuri A, Swanson P, Devare S, et al. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 60-66.
19. Morgado MG, Guimaraes ML, Galvao-Castro B. HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:143-50.
20. Arts E, Demers K, Nankya I, et al. Infection with subtype C HIV-1 of lower replicative fitness as compared to subtypes A and D leads to slower disease progression in Zimbabwean and Ugandan women. TUA0204 abstract. Presented at: *XVI International AIDS Conference*; 2006; Toronto.
21. Thomson MM, Delgado E, Herrero J, et al. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2003;83:107-19.
22. Su L, Graf M, Zhang Y, et al. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *Journal of Virology* 2002; 74:11367-76.
23. Santos AF, Sousa TM, Soares EA, et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS* 2006, 20(16):2011-19.
24. Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, et al. Drug-Resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *The Lancet* 1999; 353: 2195-99.
25. Kuritzkes D. Progress in drug-resistance testing in the management of antiretroviral therapy. *The PRN Notebook* 1999. 4(4): 14-18.

26. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, et al. Impact of HIV-1 subtype and a retroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *Plos Medicine* 2005; 2(4): 325-29.
27. Couto-Fernandez JC, Jesus CS, Veloso VG, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Feb; 100: 73-78.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Neighbor joining tree of sequences representative of subtypes of this study. Phylogenetic tree constructed with HKY distance matrix implemented in PAUP 4.10b and based in the *pol* region of HIV-1 of some representative set. Reference sequences were extracted from the Los Alamos database. Sample designation started with country of origin followed by year of collection (BR for Brazil). Reliability was tested with 1000 replicates bootstrap; values considered significant (above 70%) are shown. Branch sizes are relative to the scale. The scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide.

Figure 2: Neighbor joining tree including reference subtype C sequences and subtype C sequences of this study. Reference sequences were extracted from the Los Alamos database. Branch sizes are relative to the scale. The scale bar represents 0.1 substitutions per nucleotide.

Figure 3: Bootscanning plot of *pol* sequences representing different mosaicism. (a) Bootsclanning plot (SIMPLLOT) of a *pol* sequence representative of a mosaic Cb (query 169) against the references of subtypes of the HIV-1 M group represented in the legend by different colors and letters. Recombination points are observed in lines intersection, and probability of correspondence with subtype specified by the line color is shown on x axis. (b) Bootsclanning plot (SIMPLLOT) of a sequence representative of BF mosaic which showed recombination points coinciding with the Argentine CRF12 that is represented by number 1 in brown. (c) Bootsclanning plot (SIMPLLOT) of a sequence representative of a mosaic CB which showed recombination points coinciding with the Chinese CRF 7.

Figure 4: Alignments of amino acid consensus of protease and reverse transcriptase regions in different subtypes. Alignment (Bioedit 5.0.9.1) of the amino acids of: (a) consensus of the protease of subtype C (Cons C), representative of the Brazilian subtype C (CBR92), consensus of isolates C and Cb of the present study; (b-d) consensus of the reserve transcriptase with the same sequences than the previous plus one consensus of subtype B of this study (B) and a representative of subtype B (HXB2). The red arrow indicates the amino acid shift closest to the beginning of the recombination, suggested by bootsclanning; the blue arrow indicates the beginning of the amino acids shifts in the FRKQNP functional domain that supports the relation with subtype B (local). The amino acids represented in consensus C, Cb, and B follow the rule of the minimum 50%.

Figure 5: Prevalence of mutations associated to viral resistance in the reverse transcriptase and protease genes compared to the HXB2 reference. Mutations associated with the specific subtypes are marked with an asterisk.

Table 1 Epidemiologic and laboratorial characteristics of HIV-1 positive individuals according to viral subtypes.

Characteristics	Subtype B	Subtype C	Subtype Cb	<i>P</i> ^a
Sex				
Female	34 (34.7%)	17 (38.6%)	6 (42.9%)	0.791
Male	64 (65.3%)	27 (61.4%)	8 (57.1%)	
Median viral load ^b (copies/mL)	16.488 (7.162-57.413)	28.094 (8.940-134.810)	17.048 (8.034-44.832)	0.156
Median CD4-T cell count ^b (mm ³)	251 (112-371)	193 (90-378)	308 (205-461)	0.160
Number of triple therapy failure (SD)	2.3 (1.06)	2.0 (1.21)	1.8 (0.72)	0.184
Origin				
Greate Porto Alegre	69 (60.0%)	33 (28.7%)	14 (11.3%)	0.072
Inland of State	29 (72.5%)	11 (27.5%)	0 (0.0%)	
Subtypes frequencies ^c	98 (53.6%)	44 (24.0%)	14 (7.7%)	<0.01

a. *P* values were calculated for a confidence interval of 95%.

b. The last viral load and CD4 were performed at most two months before the genotyping test; percentis of 25 and 75%, respectively.

c. The remaining 27 sequences analyzed (14.7%) had other classifications for the *pol* gene.

Figure 1

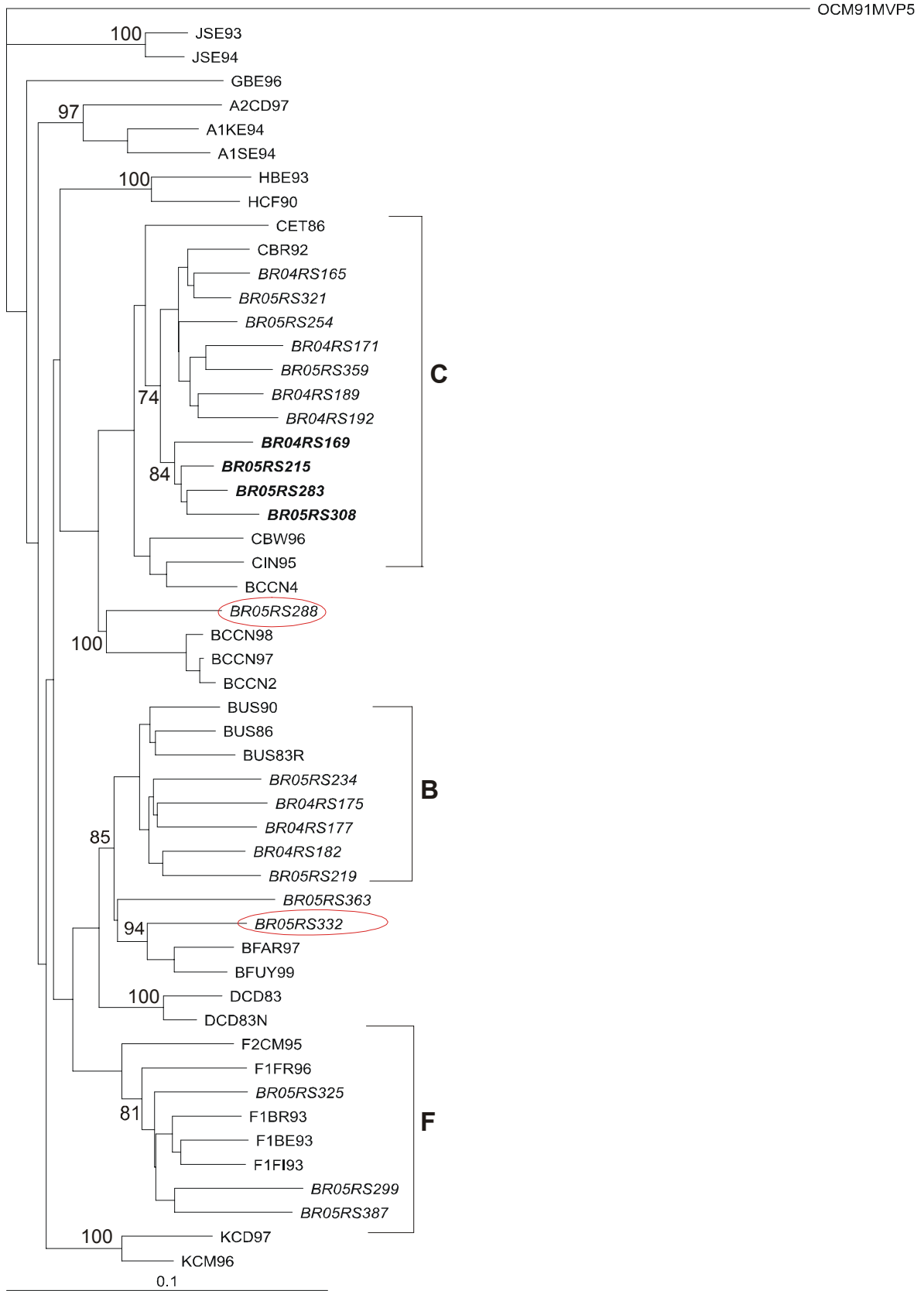


Figure 2

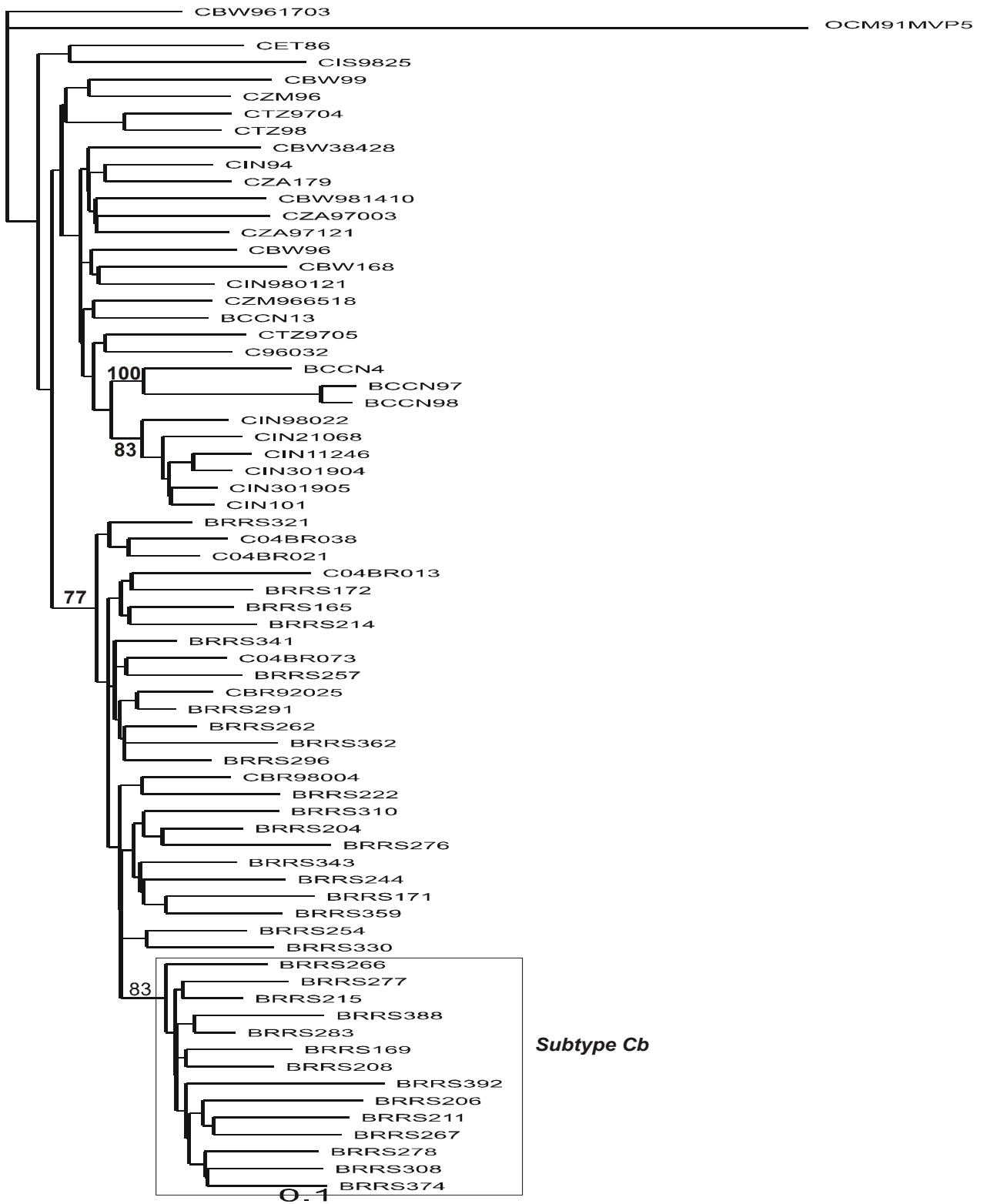


Figure 3

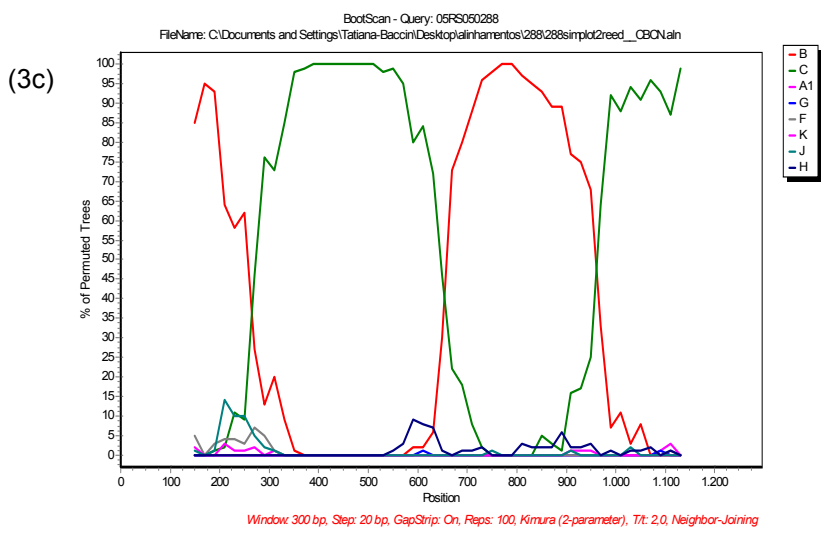
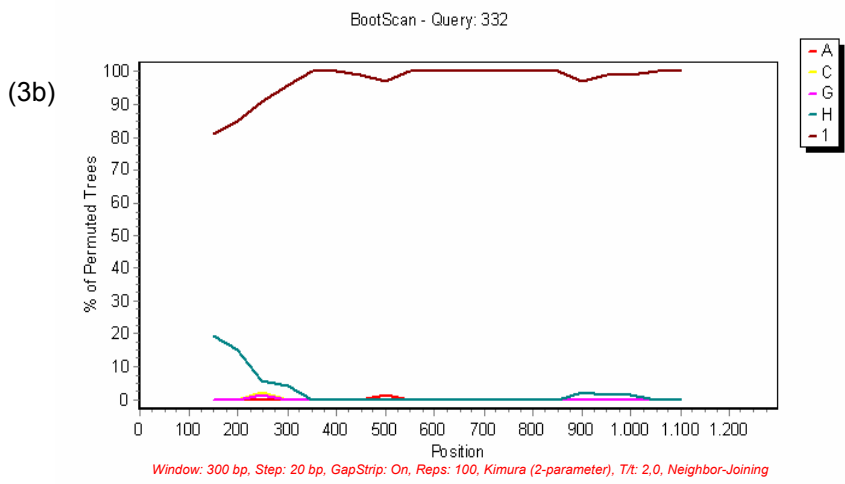
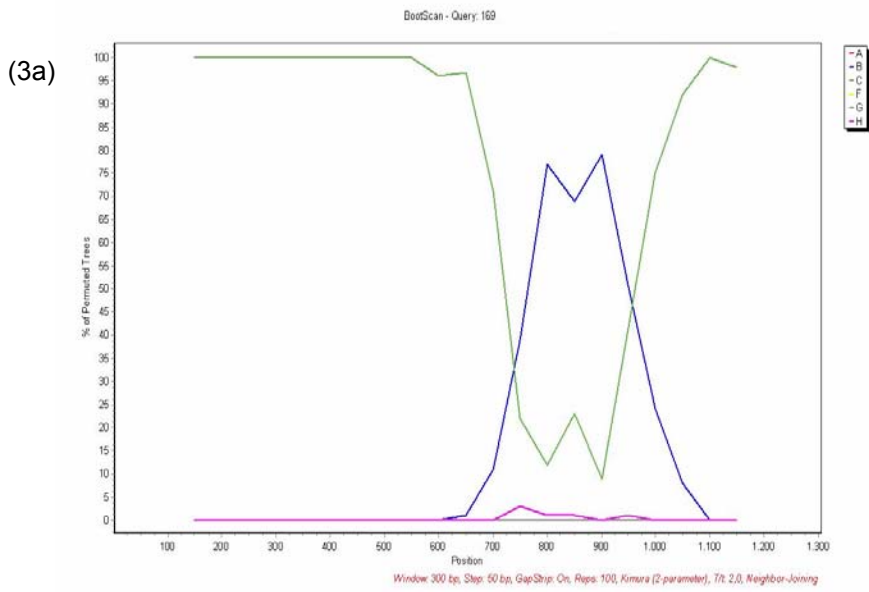


Figure 4

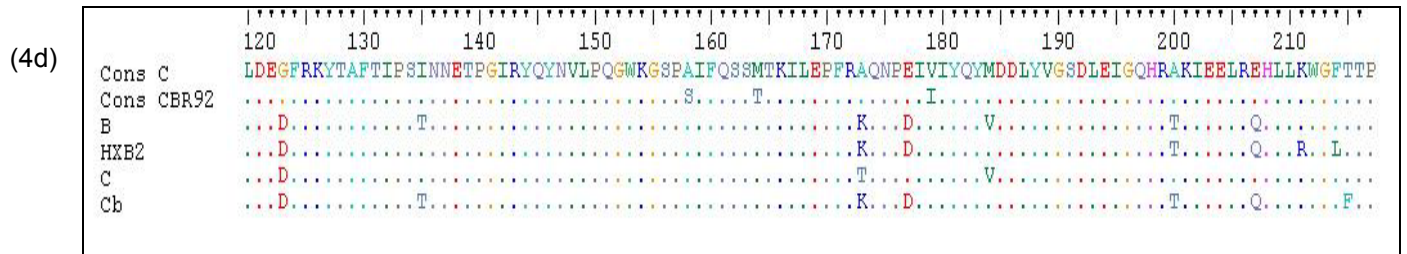
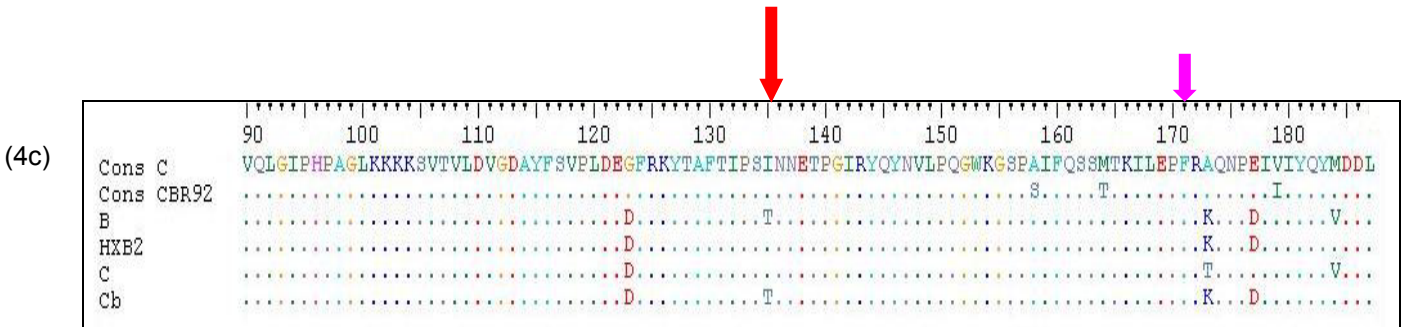
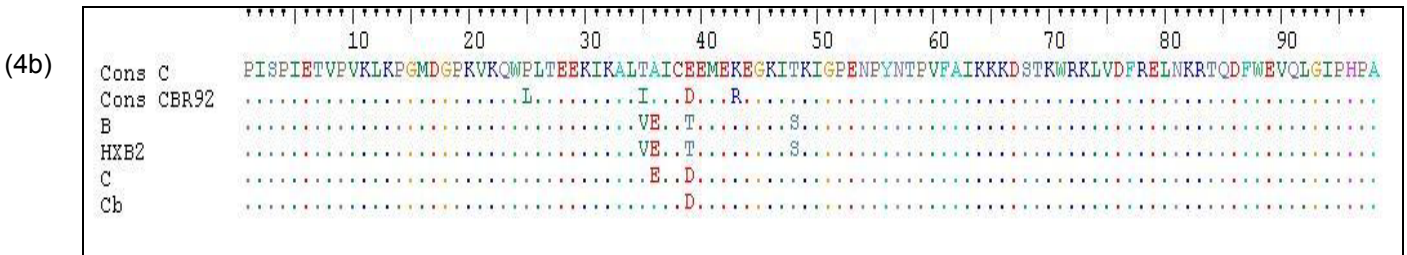
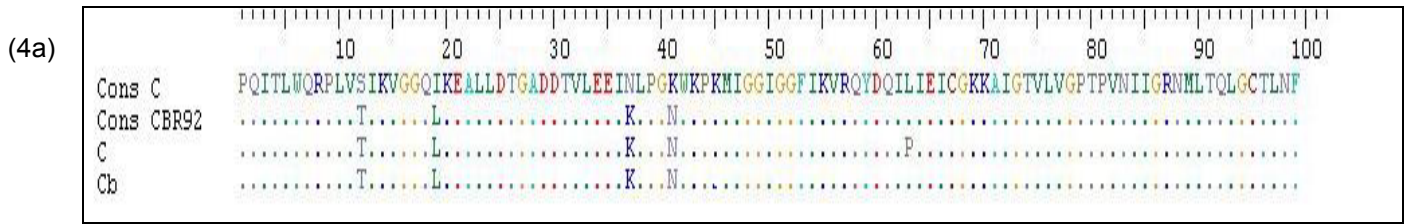
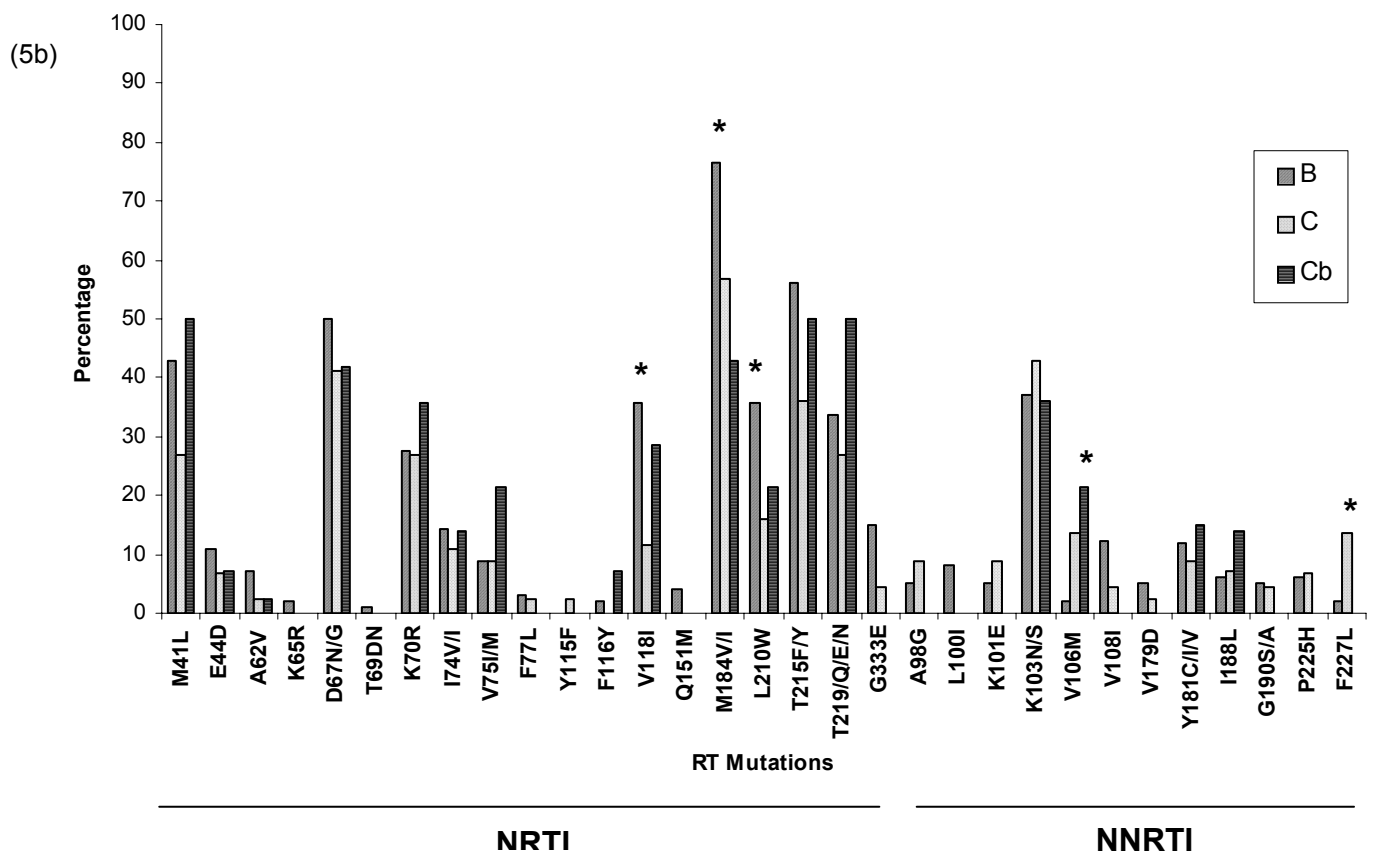
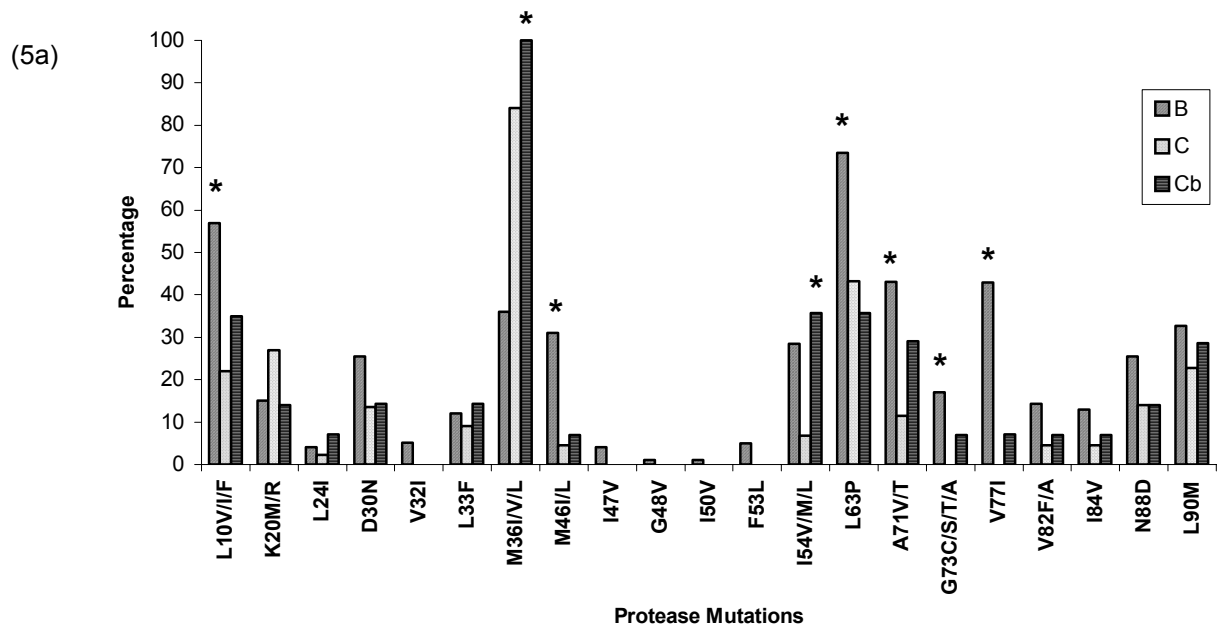


Figure 5



CONCLUSÕES

- Houve prevalência do subtipo B, seguido do subtipo C na população sob falha terapêutica, no estado do Rio Grande do Sul. É provável que o subtipo C não esteve majoritariamente presente devido à introdução e fixação mais recente deste na população estudada ou ainda devido às diferenças biológicas entre os dois subtipos;
- Comparativamente com outras regiões do país, os subtipos não-B (46%) presentes nesta população tiveram uma prevalência significativamente maior;
- A presença de um grupo de seqüências que estão recombinando localmente indica a insurgência de uma microepidemia causada por uma nova forma recombinante no estado do Rio Grande do Sul;
- A seleção distinta de polimorfismos entre os subtipos indica que pode haver diferenças nos mecanismos genéticos que envolvem a aquisição da resistência viral às drogas e conseqüentemente na progressão da doença;
- Em geral, as diferenças apresentadas neste estudo quanto à prevalência dos diversos subtipos e entre o perfil de resistência aos fármacos anti-retrovirais contribui para um melhor entendimento da dinâmica de evolução dos vírus circulantes e ressalta a importância do monitoramento epidemiológico e de resistência do HIV-1 devido ao comportamento distinto da epidemia nas diversas regiões do país.

REFERÊNCIAS

ALKHATIB C, BROTER CC, BERGER EA. Cell type-specific fusion cofactors determine human immunodeficiency virus type 1 tropism for T-cell lines versus primary macrophages. *J Virol*. 1996; 70: 5487–94.

BALL SC, ABRAHA A, COLLINS KR, MAROZSAN AJ, BAIRD H, QUINONES-MATEU ME, PENN-NICHOLSON A, MURRAY M, RICHARD N, LOBRITZ M, ZIMMERMAN PA, KAWAMURA T, BLAUVELT A, ARTS EJ. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J Virol* 2003;77:1021-38.

BARRÉ-SINOUSSE F, CHERMANN JC, REY F, NUGEYRE MT, CHAMARET S, GRUEST J, DAUGUET C, AXLER-BLIN C, VEZINET-BRUN F, ROUZIOUX C, ROZENBAUM W, MONTAGNIER L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;220:868-71.

BERGER EA, MURPHY PM, FARBER JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptor: roles in viral entry, tropism, and disease. *Ann Rev Immunol* 1999;17:657-700.

BONGERTZ V, BOU-HABIB DC, BRIGIDO LF, CASEIRO M, CHEQUER PJ, COUTO-FERNANDEZ JC, FERREIRA PC, GALVAO-CASTRO B, GRECO D, GUIMARAES ML, LINHARES DE CARVALHO MI, MORGADO MG, OLIVEIRA CA, OSMANOV S, RAMOS CA, ROSSINI M, SABINO E, TANURI A, UEDA M. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. Brazilian Network for HIV Isolation and Characterization. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;23:184-93.

BRINDEIRO RM, DIAZ RS, SABINO EC, MORGADO MG, PIRES IL, BRIGIDO L, DANTAS MC, BARREIRA D, TEIXEIRA PR, TANURI A. Brazilian network for drug resistance surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003;17:1063-9.

CARIDE E, BRINDEIRO R, HERTOOGS K, LARDER B, DEHERTOGH P, MACHADO E, SÁ CA, EUER-SILVA WA, SION FS, PASSIONI LF, MENEZES JÁ, CALAZANS A, TANURI A. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients falling HAART. *Virology* 2001;275:107-15.

COFFIN, JM. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:143-67.

D'AQUILA RT, ACHAPIRO JM, BRUN-VÉZINET F, CLOTET B, CONWAY B, DEMETER LM, GRANT RM, JOHNSON VA, KURITZKS DR, LOVEDAY C, SHAFER RW, RICHMANA DD. International AIDS Society-USA. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top HIV Med* 2002;10:21-5.

DALGLEISH AG, BEVERLEY PC, CLAPHAM PR, CRAWFORD DH, GREAVES MF, WEISS RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984;312:763-7.

DE SA FILHO DJ, SUCUPIRA MC, CASIERO MM, SABINO EC, DIAZ RS, JANINI LM. Identification of two type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:1-13.

DENG H, LIU R, ELLMEIER W, CHOE S, UNUTMAZ D, BURKHART M, DI MARZIO P, MARMON S, SUTTON RE, HILL CM, DAVIS CB, PEIPER SC, SCHALL TJ, LITTMAN DR, LANDAU NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-6.

DURANT J, CLEVENBERGH P, HALFON P, DELGIUDICE P, PORSIN S, SIMONET P, MONTAGNE N, BOUCHER CAB, SCHAPIRO JM, DELLAMONICA P. Drug-Resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *The Lancet* 1999;353:2195-9.

ESPARZA J, BHAMARAPRAVATI N. Accelerating the development and availability of HIV-1 vaccines: Why, when, where and now? *The Lancet* 2000;355:2061-66.

ESSEX M. Human immunodeficiency viruses in the developing world. *Adv Virus Res* 1999;53:71-88.

FAUCI AS. The Aids Epidemic--considerations for the 21st century. *N Engl J Med* 1999;341:1046-50.

FENG Y, BROTER CC, KENNEDY PE, BERGER EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7.

FERNANDEZ JCC, JESUS CS, VELOSO VG, RACHID M, GRACIE RSG, CHEQUER-FERNANDEZ SL, OLIVEIRA SM, ARAKAKI-SANCHEZ D, CHEQUER PJN, MORGADO M. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100:73-8.

GALLO RC, SALAHUDDIN SZ, POPOVIC M, SHEARER GM, KAPLAN M, HAYNES BF, PALKER TJ, REDFIELD R, OLESKE J, SAFAI B. Frequent detection of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and risk for AIDS. *Science* 1984; 224:500-3.

GELDERBLON HR, HAUSMANN EHS, ÖZE M, PAULI G, KOCH M. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 1987;156:171-6.

GRAZIOSI C, PANTALEO G, BUTINI L, DEMAREST JF, SAAG MS, SHAW GM, FAUCI ASL. Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA syntheses during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:6405-9.

GUIMARÃES LM, MOREIRA AS, LOUREIRO R, GALVÃO-CASTRO B. High Frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2002;18:1261-9.

HO D, NEUMANN AU, PERELSON AS. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995;373:123-6.

KANTOR R, KATZENSTEIN DA, EFRON B, CARVALHO AP, WYNHOVEN B, CANE P, CLARKE J, SIRIVICHAYAKUL S, SOARES MA, SNOECK J, PILLAY C, RUDICH H, RODRIGUES R, HOLGUIN A, ARIYOSHI K, BOUZAS MB, CAHN P, SUGIURA W, SORIANO V, BRIGIDO LF, GROSSMAN Z, MORRIS L, VANDAMME AM, TANURI A, PHANUPHAK P, WEBER JN, PILLAY D, HARRIGAN PR, CAMACHO R, SCHAPIRO JM, SHAFER RW. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *Plos Medicine* 2005;2:325-37.

KURITZKES D. Progress in drug-resistance testing in the management of antiretroviral therapy. *The PRN Notebook* 1999;4:14-8.

THOMAS LEITNER, BETTE KORBER, MARCUS DANIELS, CHARLES CALEF, BRIAN FOLEY. HIV-1 and Circulating Recombinant Form (CRF) Reference Sequences, 2005. In *HIV Sequence Compendium 2005*, pp41-48, 2005. (<http://www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/reviews.html>).

LIU R, PAXTON WA, CERADINI D, MARTIN SR, HORUK R, MACDONALD ME, STUHLMANN H, KOUP RA, LANDAU NRR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em. <<http://www.aids.gov.br>> . Acesso em: 01 de maio de 2007.

MORGADO MG, GUIMARÃES ML, B GALVÃO-CASTRO. HIV polymorphism: a challenge for vaccine development – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2002;97:143-50.

MORGADO MG, GUIMARÃES ML, NEVES JR I, COSTA CI, SANTOS VGV, LINHARES-DE-CARVALHO MI, GALVÃO-CASTRO B, BONGERTZ V. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazil HIV-1 subtype strains. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1996;91:339-42.

MORGADO MG, SABINO EC, SHPAER EG, BONGERTZ V, BRIGIDO L, GUIMARÃES MDC, CASTILHO EA, GALVÃO-CASTRO B, MULLINS JI, HENDRY RM, MAYER A. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of subtype B strains divergent from the North American/European prototype and detection of subtype F. *Aids Res Hum Retroviruses* 1994;10:569-75.

PANTALEO G, GRAZIOSI C, FAUCI AS. Mechanisms of disease. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *The New England Journal of Medicine* 1993;328:327-35.

PARANJAPE RS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res* 2005; 121:240-55.

PETITO CK, KERZA-KWIATECKI AP, GENDELMAN HE, MCCARTHY M, NATH A, PODACK ER, SHAPSHAK P, WILEY CA. Review: neuronal injury in HIV infection. *J Neurovirol* 1999; 5:327-41.

PRUSINER SB. Discovering the cause of AIDS. *Science* 2002;298:1726-7.

PICCHIO GR, GULIZIA RJ, WEHRLY K, CHESEBRO B, MOSIER DE. The cell tropism of human immunodeficiency virus type 1 determines the kinetics of plasma viremia in SCID mice reconstituted with human peripheral blood leukocytes. *J Virol* 1998;72(9):2002-09.

ROBERTSON DL, ANDERSON JP, BRADAC JA, CARRJK, FOLEY B, FUNKHOUSER RK, GAO F, HAHN BH, KALISH ML, KUIKEN C, LEARN GH, LEITNER T, MCCUTCHAN F, OSMANOV S, PEETERS M, PIENIAZEK D, SALMINEN M, SHARP PM, WLINSKY S, KORBER B. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* 2000;288:55-6.

RODRIGUES R, SCHERER L, OLIVEIRA CM, FRANCO HM, SPERHACKE RD, FERREIRA JLP, CASTRO SM, STELLA IM, BRIGIDO LFM. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. *Virus Res* 2006;116:201-7.

ROMANO G, KASTEN M, GIORDANO A. Current understanding of AIDS pathogenesis. *Anticancer Res* 1999;19:3157-66.

SABINO E, SHPAER E, MORGADO MG, KOBER BT, DIAZ RS, BONGERTZ V, CAVALCANTE S, GALVÃO-CASTRO B, MULLINS JL, MAYER EA. Identification of an HIV-1 proviral genome recombinant between subtype B and F in PBMCs obtained from an individual in Brazil. *Journal of Virology* 1994;68:6340-6.

SANABANI S, NETO WK, KALMAR EM, DIAZ RS, JANINI LM, SABINO EC. Analysis of the near full length genomes of HIV-1 subtypes B, F and BF recombinant from a cohort of 14 patients in Sao Paulo, Brazil. *Infect Genet Evol* 2006; Mar 4 (suplemento).

SCHACKER TW, HUGHES TS, SHEA RW, COOMBS RW, COREY L. Biological and virological characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998;128:613-20.

SCHRAGER L, D'SOUZA P. Cellular and anatomical reservoirs of Hiv-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA* 1998;80: 67-71.

SCHÜPBACH J. Human Immunodeficiency Viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manual of Microbiology*. 8th ed. V2. New York: Pergamon, 2003, p. 1235-81.

SHAFFER RW, KANTOR R, GONZALES MJ. The genetic Basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase reverse and protease inhibitors. *Aids Rev* 2000;2:211-28.

SHAFFER RW. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 2002;5:247-77.

SOARES EA, MARTINEZ AM, SOUZA TM, SANTOS AF, HORA VD, SILVEIRA J, BASTOS FI, TANURI A, SOARES MA. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS* 2005; 19 Suppl 4:S81-6.

SOARES MA, DE OLIVEIRA T, BRINDEIRO RM, DIAZ RS, SABINO EC, BRIGIDO L, PIRES IL, MORGADO MG, DANTAS MC, BARREIRA D, TEIXEIRA PR, CASSOL S, TANURI A. A specific subtype C of human immunodeficiency virus type 1 circulates in Brazil. *AIDS* 2003;17:11-21.

SU L, GRAF M, ZHANG Y, VON BRIESEN H, XING H, KOSTLER J, MELZL H, WOLF H, SHAO Y, WAGNER R. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J Virol* 2002;74:11367-76.

TANURI A, CARIDE E, DANTAS MC, MORGADO M, MELLO DLC, BORGES S, TAVARE M, FERREIRA SB, SANTORO-LOPES G, MERTINS CRF, ESTEVES ALC, DIAZ RS, ANDREO SMS, FERREIRA LAP, RODRIGUES R, REUTER T, CAVALCANTI MAS, OLIVEIRA SM, BARBOSA HB, TEIXEIRA PR, CHEQUER PN. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J Clin Virol* 2002; 25:39-46.

TANURI A, SWANSON P, DEVARE S, BERRO O, SAVEDRA A, COSTA LJ, TELLES JG, BRINDEIRO R, SCHABLE C, PIENIAZEK D, RAYFIELD M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999a; 20:60-6.

TANURI A, VICENTE AC, OTSUKI K, RAMOS CA, FERREIRA OC JR., SCHECHTER M, JANINI LM, PIENIAZEK D, RAYFIELD MA. Genetic variation and susceptibilities to protease inhibitors among subtypes B and F isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 1999b; 43:253-8.

THOMSON MM, DELGADO E, HERRERO I, VILLAHERMOSA ML, VAZQUEZ-DE PARGA E, CUEVAS MT, CARMONA R, MEDRANO L, PEREZ-ALVAREZ L, CUEVAS L, NAJERA R. Diversity of mosaic structures and common ancestry of human immunodeficiency virus type 1 BF intersubtype recombinant viruses from Argentina revealed by analysis of near full-length genome sequences. *J Gen Virol* 2003;83:107-19.

UNAIDS-AIDS epidemic update 2005. Disponível em: <<http://www.unaids.org/epi/2005/index.asp>>. Acesso em: de maio de 2007.

YURASOV SV, PETTOELLO-MANTOVANI M, RAKER CA, GOLDSTEIN H. HIV type 1 infection of human fetal bone marrow cells induces apoptotic changes in hematopoietic precursor cells and suppresses their in vitro differentiation and capacity to engraft SCID mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15(18):1639-52.

ZACK JA, ARRIGO SJ, WEITSMAN SR, GO AS, HAISLIP A, CHEN IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990 Apr 20;61:213-22.

WAIN-HOBSON S. Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies in vivo and ex vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:181-93.

ANEXOS

RESULTADO DA ANÁLISE DE CONTAMINAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS
SEQÜENCIADAS NO ESTUDO

Resultado

Seqüências **COM** contaminação: 0

Seqüências **SEM** contaminação: 183

Laboratório Avançado de Banco de Dados - IME - USP
Quarta, 23/ Novembro / 2005 às 20:01:43 h.



Author Resources

- Instructions for Authors (this page)
- Copyright Transfer (.doc)
- Reprint Ordering
- Permissions Requests

The Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes is a peer-reviewed, multidisciplinary journal directed to an audience of physicians and researchers. The journal publishes original articles in the form of rapid communications, original research reports, short reviews, brief reports, and letters to the editor. JAIDS generally does not publish case reports.

Manuscript Submission

A submitted manuscript must be an original contribution not previously published (except as an abstract or preliminary report), must not be under consideration for publication elsewhere, and, if accepted, must not be published elsewhere in similar form, in any language, without the consent of Lippincott Williams & Wilkins. Each person listed as an author is expected to have participated in the study to a significant extent. Although the editors and referees make every effort to ensure the validity of published manuscripts, the final responsibility rests with the authors, not with the journal, its editors, or the publisher.

All submissions will be rigorously peer-reviewed by members of the Editorial Board, and possibly by other specially qualified individuals as well. In the interests of rapid reviewing of contributions, only one of the Editors-in-Chief will, in general, make the final determination as to the acceptability of a submission, after collecting the referee's comments. Contributors may recommend specific names of reviewers from the Editorial Board, as well as other individuals they deem especially well qualified. However, the Editors-in-Chief will not be bound to follow such suggestions.

In general, the instructions for preparation of manuscripts are essentially the same as those for such journals as Science and Nature. In case of questions, please feel free to call the Editorial Office of any one of the Editors-in-Chief.

Authors must submit their manuscripts through the Web-based tracking system: Basic Science (<http://jaids-basicscience.edmgr.com>), Clinical Science (<http://jaids-clinical.edmgr.com>), or Epidemiology (<http://jaids-epidemiology.edmgr.com>). The site contains instructions and advice on how to use the system, guidance on the creation/scanning and saving of electronic art, and supporting documentation. In addition to allowing authors to submit manuscripts on the Web, the site allows authors to follow the progression of their manuscript through the peer review process. Authors who do submit their manuscripts through the Web-based tracking system are asked not to send hard copies of the manuscript to the editorial office. They may, however, send to the editorial office any artwork, letters, or files that cannot be submitted electronically. Address all inquiries regarding manuscripts not yet accepted or published to the Journal's editorial office. The editorial office will acknowledge receipt of your manuscript via email.

Editorial Office Addresses:

Basic Science Articles
David D. Ho, MD
The Aaron Diamond AIDS
Research Center
455 First Avenue
New York, NY 10016
(212) 448-5171
Fax: (212) 725-1126

Clinical Articles
Paul A. Volberding, MD

San Francisco VA Medical Center
Building 16
4150 Clement Street
VAMC 111V
San Francisco, CA 94121
(415) 379-5546
Fax: (415) 379-5547

Epidemiology Articles
Elizabeth Bamford
Institute of Human Virology
725 W. Lombard Street, N450
Baltimore, MD 21201

Patient Anonymity and Informed Consent

It is the author's responsibility to ensure that a patient's anonymity be carefully protected and to verify that any experimental investigation with human subjects reported in the manuscript was performed with informed consent and following all the guidelines for experimental investigation with human subjects required by the institution(s) with which all the authors are affiliated. Authors should mask patients' eyes and remove patients' names from figures unless they obtain written consent from the patients and submit written consent with the manuscript.

Copyright: All authors must sign a copy of the journal's "Authorship Responsibility, Financial Disclosure, and Copyright Transfer" form and submit it via fax or mail after submitting the original manuscript online.

Permissions

Authors must submit written permission from the copyright owner (usually the publisher) to use direct quotations, tables, or illustrations that have appeared in copyrighted form elsewhere, along with complete details about the source. Any permissions fees that might be required by the copyright owner are the responsibility of the authors requesting use of the borrowed material, not the responsibility of Lippincott Williams & Wilkins.

Preparation of Manuscript

Manuscripts that do not adhere to the following instructions will be returned to the corresponding author for technical revision before undergoing peer review.

Online submission: Manuscript files must be uploaded into the Editorial Manager online interface. Most file formats are acceptable. Editorial Manager will then create PDF files of the authors' submission, and the author must view and approve the files before they will be submitted to the editorial office. Please be sure that the "manuscript" file contains complete text for your submission (title page and abstract), as this is the file that will be downloaded by the reviewers and publisher. Please note, figures and tables may be submitted as separate files.

Please note that once the paper has been accepted for publication, and final versions of the manuscript, figures, and table files have been uploaded to the Editorial Manager interface, PDF files will not be used for typesetting. This is important to note for Table and Figure files, which may lose formatting when converted to PDF, but will remain intact in their original format.

Title page: A title page must be included in the manuscript file. Include on the title page (a) complete manuscript title; (b) authors' full names and affiliations; (c) name and address for correspondence, including fax number, telephone number, and e-mail address; (d) address for reprints if different from that of corresponding author; and (e) sources of support that require acknowledgment.

Abstract and key words: Limit the abstract to 200 words. It must be factual and comprehensive. Limit the use of abbreviations and acronyms, and avoid general statements (eg, "the significance of the results is discussed"). List three to six key words or phrases.

Text: Organize the manuscript file into sections with appropriate section headings. The sequence should be as follows: title page, abstract/key word page, introduction, methods, results, discussions, acknowledgments, references, tables, figure captions.

Authors should type, whenever possible, all mathematical and chemical symbols, equations, and formulas, and identify all unusual symbols the first time they are used. Define abbreviations at first mention in text and in each table and figure. If a brand name is cited, supply the manufacturer's name and address (city and state/country). Acknowledge all forms of support, including pharmaceutical and industry support, in an Acknowledgments paragraph.

Abbreviations: For a list of standard abbreviations, consult the Council of Biology Editors Style Guide (available from the Council of Science Editors, 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814) or

other standard sources. Write out the full term for each abbreviation at its first use unless it is a standard unit of measure.

References:

The authors are responsible for the accuracy of the references. Key the references (double-spaced) at the end of the manuscript. (If using End Note, set the style output to JAMA.) Cite references in text in order of appearance. Cite unpublished data, such as papers submitted but not yet accepted for publication, or personal communications, in parentheses in the text. If there are more than three authors, list only the first three authors and then use et al. Refer to the List of Journals Indexed in Index Medicus for abbreviations of journal names. Sample references are given below:

Journal Article

1. Schambelan M, Benson CA, Carr A, et al. Management of metabolic complications associated with antiretroviral therapy for HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA panel. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2002;31:257–75.

Book Chapter

2. Wortmann RL, Bentzel CJ. Renal handling of uric acid. In: Massry SG, Glassock RJ, eds. *Massry and Glassock's Textbook of Nephrology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001;90–92.

Entire Book

3. Mandell GL, Mildvan D, eds. *Atlas of AIDS*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Software

4. Epi Info [computer program]. Version 6. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1994.

Online Journals

5. Friedman SA: Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet Gynecol* [serial online]. January 1988;71:22–37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed December 15, 1990.

Database

6. CANCERNET-PDQ [database online]. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1996. Updated March 29, 1996.

World Wide Web

7. Panel on Clinical Practices for the Treatment of HIV Infection. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services and Henry J. Kaiser Foundation, January 28, 2000. Available at: <http://www.hivatis.org/guidelines/AA599.pdf>.

Paper Presented at a Conference

8. Koenig L, Ellerbrock T, Pratt-Palmire M, et al. Prospective predictors of medication adherence: a study of the first six months of highly active antiretroviral therapy (HAART) using electronic monitoring [WePeB5818]. Presented at: XIV International AIDS Conference; 2002; Barcelona.

Figures: Cite figures consecutively in the text, and number them in the order in which they are discussed. We encourage authors to submit their figures through Editorial Manager, but if this is not possible, authors may send hard copies of the figures to the editorial office for scanning. On the hard copies, be sure to write the first author's last name, the figure number and figure part (1A, 1B, 1C), and an arrow to indicate the top edge of the figure on a label pasted to the back of each figure. Submit all artwork in camera-ready form; illustrations should be glossy prints or high-quality, laser-printed illustrations. Photocopies are unacceptable. Authors who submit manuscripts through Editorial Manager may submit figures as separate electronic files. High-quality hard copies may be requested once the manuscript has been accepted for publication. Lettering should be large enough that it will remain legible after figure reduction; typewritten or unprofessional lettering is unacceptable. Figure parts (A, B, C) may be left unlabeled (but clearly marked on back) for professional placement by the journal's printer.

Figure legends: Legends must be submitted for all figures. They should be included in the manuscript file, should be brief and specific, and should appear on a separate manuscript page after the references. Use scale markers in the image for electron micrographs, and indicate the type of stain used.

Color figures: The journal accepts for publication color figures that will enhance an article. Authors who submit color figures will receive an estimate of the cost for color reproduction. If they decide not to pay for color reproduction, they can request that the figures be converted to black and white at no charge.

Digital figures: Electronic art should be created/scanned and saved and submitted as either a TIFF (tagged image file format), an EPS (encapsulated postscript) file, or a PPT (Power Point) file. Line art must have a resolution of at least 1200 dpi (dots per inch), and electronic photographs—radiographs, CT scans, and so on—and scanned images must have a resolution of at least 300 dpi. If fonts are used in the artwork, they must be converted to paths or outlines or they must be embedded in the files. Color images must be created/scanned and saved and submitted as CMYK files. All electronic art must be accompanied by high-resolution laser prints of the images. Files may be submitted electronically through the Editorial Manager interface, or on a 3½-inch high-density disk, a CD-ROM, or an Iomega Zip disk. Please note that artwork generated from office suite programs such as Corel Draw and MS Word and artwork downloaded from the Internet (JPEG or GIFF files) cannot be used.

Tables: Create tables using the table creating and editing feature of your word processing software (eg, Word, WordPerfect). Do not use Excel or comparable spreadsheet programs. Group all tables at the end of the manuscript, or supply them together in a separate file. Cite tables consecutively in the text, and number them in that order. Key each on a separate sheet, and include the table title, appropriate column heads, and explanatory legends (including definitions of any abbreviations used). Do not embed tables within the body of the manuscript. They should be self-explanatory and should supplement, rather than duplicate, the material in the text.

Style: Pattern manuscript style after the American Medical Association Manual of Style (9th edition). Stedman's Medical Dictionary (27th edition) and Merriam Webster's Collegiate Dictionary (10th edition) should be used as standard references. Refer to drugs and therapeutic agents by their accepted generic or chemical names, and do not abbreviate them. Use code numbers only when a generic name is not yet available. In that case, supply the chemical name and a figure giving the chemical structure of the drug. Capitalize the trade names of drugs and place them in parentheses after the generic names. To comply with trademark law, include the name and location (city and state in USA; city and country outside USA) of the manufacturer of any drug, supply, or equipment mentioned in the manuscript. Use the metric system to express units of measure and degrees Celsius to express temperatures, and use SI units rather than conventional units.

Genbank Accession Numbers: When manuscripts include or describe original nucleotide or amino acid sequence data, the sequence must be submitted to the GenBank or EMBL Data Library nucleotide sequence database and an accession number obtained from them. This accession number must be returned to the journal, where it will be placed after the Key Words on the title page in the printed article.

Instructions on how to submit data may be found in the printed submission information sheet made available by our editorial offices at the time of acceptance or by the staff at GenBank or EMBL (see addresses below). An accession number will be sent to you by GenBank within 7 days (48 hours, if received via electronic mail) once a submitted sequence has been received, processed, and the annotation accompanying it deemed complete and internally consistent with the sequence data. It is essential that the sequence data be submitted in computer-readable form.

Please note, acceptance of a manuscript by this journal assumes that the submitted data are to be made public upon receipt by the databank. Though there is every reason that data should be released immediately, many authors are concerned that submission of data before appearance of a manuscript may compromise their work. GenBank will, upon request, withhold release of the submitted data up to a specified date with a maximum of 6 months after submission.

You may contact the GenBank staff for further information, help, or submissions at: Electronic mail: genbank@genome.lanl.gov; Electronic mail, submissions only: gb-sub@genome.lanl.gov; U.S.A. telephone number: (505) 665-2177; Postal service: GenBank Submissions, Group T-10 Mail Stop K710, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM 87545, USA. You may contact EMBL Data Library for further information, help, or submissions at Electronic mail, data submission:

datasubs@embl.bitnet; Telephone: 49(6221)387258; FAX: 49(6221)387306; Postal Service: EMBL Data Library Sybmissions, Postfach 10.2209, Meyerhofstrasse 1, 6900 Heidelberg, Germany.

Rapid Communications:

Articles accepted as Rapid Communications will normally be published within 8 weeks of acceptance. When submitting a paper for consideration as a Rapid Communication, please adhere to the following guidelines:

Submit your paper to Editorial Manager and designate the article type as "Rapid Communication." Please indicate to the Editor in either the notes or in an attached cover letter file why the paper merits special attention.

If figures cannot be submitted to Editorial Manager, authors must send them by overnight express. The paper should not exceed 4 printed pages (approximately 12 double-spaced typewritten manuscript pages, including illustrations, tables, and references).

The paper should include an abstract, key words, methods, results, discussion, and reference sections.

The title page should include the corresponding author's telephone and fax numbers and e-mail address.

Authors will receive proofs of their article for review by e-mail and will be expected to return corrections by fax within 24 hours of receipt. Changes received after this deadline will not be accepted.

Papers that are not accepted as Rapid Communications may be resubmitted as full-length articles.

Brief Reports: Brief Reports are short versions of clinical studies. They represent observations that are preliminary, speak for themselves, or offer new insight into a recognized condition. Submissions should not exceed 10 double-spaced manuscript pages, including references and table. Manuscripts that are too long for this category will be shortened at the editorial office or returned to the author for shortening.

Letters to the Editor: Letters to the Editor can provide additional comment on an article published in JAIDS, or can be a very concise report on study findings. Letters should be no more than 3 typeset pages (6 manuscript pages double-spaced, including references and either 1 figure or 1 table [but no abstract]).

Page proofs and corrections: Corresponding authors will receive electronic page proofs to check the copyedited and typeset article before publication. Portable document format (PDF) files of the typeset pages and support documents (eg, reprint order form) will be sent to the corresponding author via e-mail. Complete instructions will be provided with the e-mail for downloading and printing the files and for faxing the corrected pages to the publisher. Authors without an e-mail address will receive traditional paper page proofs. It is the author's responsibility to ensure that there are no errors in the proofs. Changes that have been made to conform to journal style should be allowed to stand if they do not alter the authors' meaning. Only the most critical changes to the accuracy of the content will be made. Changes that are stylistic or are a reworking of previously accepted material will not be allowed. The publisher reserves the right to deny any changes that do not affect the accuracy of the content. Authors may be charged for alterations to the proofs beyond those required to correct errors or to answer queries. Proofs must be checked carefully and corrections faxed within 24 to 48 hours of receipt, as requested in the cover letter accompanying the page proofs.

Reprints: Authors will receive a reprint order form and a price list with the page proofs. Reprint requests should be faxed to the publisher with the corrected proofs, if possible. Reprints are normally shipped 6 to 8 weeks after publication of the issue in which the item appears. Contact the Reprint Department, Lippincott Williams & Wilkins, 351 W. Camden Street, Baltimore, MD 21201 with any questions.

Publisher's Contact

Fax corrected page proofs, and any other related materials to Lisa Louthian, (717) 633-8928.

TERMO DE CONSENTIMENTO

O Ministério da Saúde e a Coordenação de DST e AIDS, em conjunto com outras instituições públicas, procurando detectar a ocorrência de resistência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em indivíduos que estejam utilizando medicamentos anti-retrovirais, vêm procurando implantar uma rede nacional de laboratórios aptos a executar o exame conhecido como genotipagem. A realização deste exame, além de possibilitar a obtenção de informações ligadas à capacidade desse vírus de resistir aos medicamentos anti-retrovirais disponíveis, também poderá contribuir nas ações de combate à AIDS. A resistência do HIV aos medicamentos pode comprometer a capacidade dessas drogas no tratamento das pessoas infectadas.

Para a realização desse estudo, é necessário que seja colhido 10 mL do seu sangue. O sangue por você doado, além de permitir o isolamento e a caracterização do HIV, também deverá ter uma parte preservada para análises posteriores em instituições ligadas ao Ministério da Saúde ou à Organização Mundial da Saúde porém, sempre dentro dos objetivos descritos acima. Caso alguma metodologia nova venha usar o material por você doado e isto traga informações que possa beneficiá-lo, essas informações estarão a sua disposição, sendo repassadas à unidade de saúde onde você está sendo acompanhado, após aprovação de um comitê de bioética. Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para esse estudo, e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico. A eventual concordância agora não implica em nenhuma obrigação de coletas futuras. Se você concordar em participar dessa pesquisa, acontecerá o seguinte:

Um dos pesquisadores, seu médico ou alguém da equipe de saúde poderá fazer uma breve entrevista e, após consulta ao seu prontuário, deverá preencher um formulário de solicitação de exame de genotipagem no qual deverá constar o seu nome, dados de identificação, entre outras informações.

Todas essas informações serão anotadas de forma confidencial. Mesmo participando do estudo, você poderá recusar a fornecer algumas das informações solicitadas, desde que isso não comprometa a avaliação do exame. Em momento algum seu nome será associado à entrevista em publicações do estudo. O resultado dessa pesquisa, se divulgado, irá garantir o total anonimato e a confidencialidade dos participantes.

Será coletado 10 mL de sangue do seu braço. Como em qualquer coleta de sangue, costuma haver desconforto local e risco da formação de hematomas leves. Todas as medidas habituais serão tomadas para que isso não aconteça. Sempre que possível, essa coleta será realizada junto aos exames de rotina, evitando assim, coletas extras.

Os resultados dos exames de genotipagem serão encaminhados para a unidade onde você é acompanhado.

Obs:

Mesmo após assinatura desse documento, o seu exame poderá não ser colhido se suas condições não preencherem os critérios de inclusão na RENAGENO.

Qualquer dúvida favor contatar seu médico em sua unidade de saúde ou a Unidade de Assistência, Diagnóstico e Tratamento (UDAT) da CN DST/Aids pelos fones: 0xx-61-448 8008 ou 448 8009.

Após a leitura do texto acima, afirmo ter compreendido o propósito do estudo e concordo em participar dessa pesquisa.

Nome do médico responsável pelo paciente na unidade de saúde:

Eu, abaixo assinado, responsabilizo-me pelo cumprimento das condições aqui expostas.

Assinatura do Paciente: _____