

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



Dissertação de Mestrado em Síndrome da Imunodeficiência Adquirida:  
da prevenção à terapêutica

**Análise Molecular da Transmissão do Vírus da  
Imunodeficiência Humana Tipo 1 entre Casais**

Vanda Maria dos Reis Gaspar Seabra Mota de Gouveia

Coimbra 2009





Dissertação do Mestrado em Síndrome da Imunodeficiência Adquirida: da  
Prevenção à Terapêutica

**Análise Molecular da Transmissão do Vírus da  
Imunodeficiência Humana Tipo 1 entre Casais**

Vanda Maria dos Reis Gaspar Seabra Mota de Gouveia

**Orientador:** Professor Doutor António Meliço-Silvestre

**Co-orientador:** Professor Doutor Vítor Manuel Jorge Duque

Faculdade de Medicina de Coimbra

2009



*Á minha família*

*Ao Nuno*

*Ao Diogo e ao Vasco*



# Índice

|  |            |
|--|------------|
| <i>Índice de Figuras</i>   | <u>8</u>   |
| <i>Índice de Tabelas</i>   | <u>9</u>   |
| <i>Abreviaturas</i>  | <u>10</u>  |
| <br>   |            |
| <b>AGRADECIMENTOS</b>  | <u>11</u>  |
| <i>Resumo</i>  | <u>13</u>  |
| <i>Abstract</i>  | <u>17</u>  |
| <br>   |            |
| <b>Capítulo I</b>  | <u>21</u>  |
| <i>I – Introdução</i>  | <u>23</u>  |
| <i>Diversidade e subtipos genéticos do HIV-1</i>                       | <u>24</u>  |
| <i>Diversidade genética do HIV-1 e a sua origem</i>                    | <u>27</u>  |
| <i>Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1</i>                   | <u>28</u>  |
| <i>Subtipos do HIV-1 e modo de transmissão</i>                         | <u>31</u>  |
| <i>Origem da diversidade nos hospedeiros infectados</i>                | <u>33</u>  |
| <i>Mutações de resistência</i>   | <u>38</u>  |
| <i>Avaliação da transmissão do HIV-1 entre indivíduos relacionados</i> | <u>42</u>  |
| <br>   |            |
| <b>Capítulo II</b>   | <u>45</u>  |
| <i>I – Introdução</i>  | <u>47</u>  |
| <i>II – Objectivos</i>   | <u>49</u>  |
| <i>III – Material e Métodos</i>  | <u>50</u>  |
| <i>População estudada</i>  | <u>50</u>  |
| <i>Extracção do RNA, amplificação e sequenciação do DNA</i>            | <u>50</u>  |
| <i>Avaliação das mutações de resistência</i>                           | <u>51</u>  |
| <i>Análise filogenética</i>  | <u>52</u>  |
| <i>IV - Resultados</i>   | <u>53</u>  |
| <i>Dados epidemiológicos</i>   | <u>53</u>  |
| <i>Avaliação das mutações de resistência</i>                           | <u>68</u>  |
| <i>Avaliação dos subtipos genéticos e ligação epidemiológica</i>       | <u>76</u>  |
| <i>V - Discussão dos Resultados</i>                                    | <u>87</u>  |
| <i>VI – Conclusão</i>  | <u>96</u>  |
| <br>   |            |
| <b>Capítulo III</b>  | <u>99</u>  |
| <i>Bibliografia</i>  | <u>101</u> |

## Índice de figuras

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <i>Figura 1</i>  | <i>Distribuição dos casais segundo a raça</i>  | <u>56</u> |
| <i>Figura 2</i>  | <i>Distribuição segundo tipo de casal e a idade</i>  | <u>57</u> |
| <i>Figura 3</i>  | <i>Distribuição dos casais segundo nacionalidade</i>   | <u>58</u> |
| <i>Figura 4</i>  | <i>Distribuição dos casais segundo o local de residência</i>   | <u>59</u> |
| <i>Figura 5</i>  | <i>Distribuição consoante o país provável de infecção</i>  | <u>60</u> |
| <i>Figura 6</i>  | <i>Distribuição de acordo com o estado civil e o tipo de casal</i>   | <u>61</u> |
| <i>Figura 7</i>  | <i>Distribuição de acordo com a categoria de transmissão</i>   | <u>62</u> |
| <i>Figura 8</i>  | <i>Distribuição de acordo com o motivo do teste</i>  | <u>63</u> |
| <i>Figura 9</i>  | <i>Distribuição segundo a percepção de risco de infecção</i>   | <u>64</u> |
| <i>Figura 10</i> | <i>Distribuição segundo a percepção de risco de infecção de acordo com o tipo de casal</i>   | <u>65</u> |
| <i>Figura 11</i> | <i>Percepção sobre a transmissão da infecção do HIV-1</i>  | <u>66</u> |
| <i>Figura 12</i> | <i>Distribuição segundo a percepção sobre a transmissão da infecção do HIV-1 de acordo com o tipo de casal</i>                                   | <u>67</u> |
| <i>Figura 13</i> | <i>Prevalência das mutações de resistência no segmento da protease</i>   | <u>71</u> |
| <i>Figura 14</i> | <i>Prevalência dos polimorfismos naturais</i>  | <u>72</u> |
| <i>Figura 15</i> | <i>Prevalência das mutações de resistência no segmento da transcriptase inversa</i>  | <u>72</u> |
| <i>Figura 16</i> | <i>Árvore filogenética de casais heterossexuais infectados com HIV-1</i>   | <u>77</u> |
| <i>Figura 17</i> | <i>Árvore filogenética de casais homossexuais infectados com HIV-1</i>   | <u>79</u> |
| <i>Figura 18</i> | <i>Gráfico comparativo entre presunção e a confirmação de existência de uma ligação epidemiológica em os elementos dos casais heterossexuais</i> | <u>81</u> |
| <i>Figura 19</i> | <i>Gráfico comparativo entre presunção e a confirmação de existência de uma ligação epidemiológica em os elementos dos casais homossexuais</i>   | <u>82</u> |
| <i>Figura 20</i> | <i>Distribuição dos subtipos genéticos nos casais heterossexuais</i>   | <u>83</u> |
| <i>Figura 21</i> | <i>Distribuição dos subtipos genéticos e categoria de transmissão nos casais heterossexuais</i>  | <u>84</u> |
| <i>Figura 22</i> | <i>Distribuição do subtipo de acordo com o país de infecção</i>  | <u>85</u> |

## Índice de tabelas

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <i>Tabela 1</i> | <i>Características gerais da população estudada</i>   | <u>55</u> |
| <i>Tabela 2</i> | <i>Polimorfismos naturais e mutações de resistência identificados</i>                         | <u>69</u> |
| <i>Tabela 3</i> | <i>Relação entre a presença de mutações de resistência e o tratamento anti-retrovírico</i>    | <u>73</u> |
| <i>Tabela 4</i> | <i>Padrões de resistência encontrados nos doentes sujeitos a terapêutica anti-retrovírica</i> | <u>74</u> |
| <i>Figura 5</i> | <i>Relação entre a existência de ligação epidemiológica e a percepção de cada casal</i>       | <u>80</u> |

## Abreviaturas

---

| <b>Abreviatura</b> | <b>Designação completa</b>                      |
|--------------------|---|
| CCR5               | CC-chemokine receptor type 5                    |
| CRFs               | Circulating recombinat formas                   |
| CXCR4              | CX-chemokine receptor type 4                    |
| DNA                | Deoxyribonucleic acid                           |
| HIV                | Human immunodeficiency virus                    |
| HIV-1              | Human immunodeficiency virus type 1             |
| PR                 | Protease  |
| RNA                | Rbonucleic acid                                 |
| RT                 | Reverse transcriptase                           |
| SIDA               | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida          |
| SIV <sub>cpz</sub> | Simian immunodeficiency virus of the chimpanzee |
| URFs               | Unique recombinat forms                         |

---

## **AGRADECIMENTOS**

O projecto de investigação agora apresentado é uma consequência de estudos laboratoriais e epidemiológicos que temos vindo a efectuar no âmbito do estudo da transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 entre indivíduos serodiscordantes.

Para que este trabalho tivesse chegado a bom termo, não podemos descurar e agradecer o apoio das pessoas que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para o tornar possível.

Assim, as primeiras palavras de agradecimento são dedicadas ao Professor Doutor António Meliço-Silvestre, que nos incentivou e orientou na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Vítor Manuel Jorge Duque, manifestamos a nossa gratidão pelas sugestões e palavras de estímulo e ânimo para a concretização do trabalho agora apresentado.

Aos meus colegas do Laboratório de Virologia do Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade, João Luís Pereira Vaz pelo apoio e facilidades concedidas para a realização deste trabalho, e Célia Custódio Morais pelo apoio, camaradagem e incentivos no prosseguimento e concretização deste trabalho, deixamos expressa a nossa gratidão.



## **Resumo**

### **Introdução:**

O vírus da Imunodeficiência Adquirida tipo 1 (HIV-1) é caracterizado por uma extensa variabilidade genética, resultante do elevado número de mutações que ocorrem no genoma do HIV-1 como consequência da baixa fidelidade da transcriptase inversa, da ausência da função correctora e do rápido *turnover* da população vírica. Como consequência, a evolução do HIV-1 no hospedeiro e entre hospedeiros é bastante diferente. No hospedeiro, a população vírica encontra-se sujeita a uma selecção natural como resultado do esforço contínuo para iludir ao sistema imunitário, e escapar aos tratamentos anti-retrovíricos. Entre hospedeiros, a diversidade genética do HIV-1 é predominantemente moldada por factores espaciais e temporais da sua história demográfica.

Devido ao importante papel desempenhado pela variabilidade genética do HIV-1 na pandemia da SIDA, a aplicação de técnicas moleculares no estudo do HIV-1 vêm dar um grande contributo no desenvolvimento de vacinas, monitorização de resistências aos anti-retrovíricos e na reconstrução de eventos de transmissão.

### **Objectivos:**

O presente estudo teve por objectivo a investigação dos eventos de transmissão entre casais infectados com o HIV-1.

## **Material e métodos:**

As sequências *pol* utilizadas foram obtidas a partir de amostras plasmáticas de 37 casais infectados com HIV-1, inscritos no Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, e incluem amostras de infecções agudas, de infecções crónicas mas sem experiência aos anti-retrovíricos e em falência terapêutica. Para todos os pacientes encontrava-se disponível a informação clínica e epidemiológica.

Todas as amostras plasmáticas foram sequenciadas nos segmentos da protease e da transcriptase inversa do gene *pol* do HIV-1, analisadas para determinação da presença de mutações de resistência à terapêutica anti-retrovírica, e filogeneticamente analisadas para a atribuição do subtipo genético e para a determinação de pares com ligação filogenética.

## **Resultados:**

Neste estudo foram analisados epidemiologicamente e filogeneticamente 74 indivíduos. Destes, 75,68% pertenciam a casais heterossexuais e 24,32% a casais homossexuais. A maioria (93,24%) eram de nacionalidade Portuguesa e residiam na região centro de Portugal (94,56%). Para 70,25% dos indivíduos, a infecção pelo HIV-1 ocorreu em Portugal, para 9,46% num outro país Europeu e para 16,22% ocorreu em África. Todos os casais, com excepção de um, eram caucasianos com uma idade média de 47,19 anos (idade mínima 33 e máxima de 74 anos). 13,51% dos indivíduos referiam uma história de utilização de drogas injectáveis (1,35% pertencentes a casais homossexuais e 12,16% pertencentes a casais heterossexuais), 21,62% referiram ter tido mais de um parceiro

sexual ou outro comportamento de risco (4,05% pertencentes a casais homossexuais e 17,57% pertencentes a casais heterossexuais). Dos 37 casais, 30 (81,08%) atribuíram a transmissão do HIV-1 a um dos elementos do casal.

Nos casais heterossexuais, o subtipo com maior prevalência era o subtipo B (53,70%), seguido pelo subtipo C (18,52%), G (11,11%), A e CRF02\_AG (5,56%), F (3,70%) e em 1,85% não foi possível identificar o subtipo. Todos os elementos dos casais homossexuais pertenciam ao subtipo B, excepto 2 (11,11%) para os quais o subtipo não foi determinado.

Foram encontradas mutações de resistência aos anti-retrovíricos em 17 (22,97%) indivíduos, dos quais 4,05% eram indivíduos sem experiência aos anti-retrovíricos.

A análise da árvore filogenética revelou 27 “clusters” de transmissão, 22 de casais heterossexuais, 4 de casais homossexuais e um “cluster” formado por 3 indivíduos. A grande maioria das ligações de transmissão (92,56%) foram confirmadas pelos dados epidemiológicos.

Todos os 3 indivíduos que apresentavam padrões de mutações de transmissão pertenciam a 3 pares com ligação epidemiológica.

### **Conclusão:**

Os nossos resultados demonstram que dos 30 casais onde a transmissão do HIV-1 era atribuída a um dos elementos do casal, 25 foram molecularmente confirmados como

epidemiologicamente ligados. Assim, a assunção de uma ligação de transmissão baseada apenas na informação prestada pelas pessoas envolvidas, será muito provavelmente incorrecta, embora o número de transmissões não ligadas, possa variar consoante factores demográficos, étnicos e comportamentais.

Foi também observada uma grande heterogeneidade de subtipos, associada à transmissão heterossexual, confirmando a introdução e difusão dos subtipos não-B na população.

A presença da mesma mutação de resistência aos anti-retrovíricos em 3 pares ligados epidemiologicamente, onde pelo menos um dos elementos não tinha sido sujeito a terapêutica anti-retrovírica, ilustra o potencial para a transmissão secundária destes vírus com mutações de resistências.

## **Abstract**

### **Background:**

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) is characterized by extensive genetic variability that results from high mutation rate of HIV- 1 genome associated with the low fidelity of the reverse transcriptase, the lack of proofreading function and the rapid turnover of viral population. As a consequence, the evolution of HIV-1 within and across hosts is known to be remarkably different. Within hosts, the viral population is subjected to natural selection as a result of a continued effort to evade the immune system, and escape from antiretroviral treatments. Across hosts, the HIV-1 genetic diversity is predominantly shaped by spatial and temporal factors in the demographic history.

Because HIV-1 genetic variation plays a major role in the worldwide AIDS epidemic, molecular techniques have shaped the strategies used in the HIV-1 studies such as vaccine development, monitoring of antiretroviral drug resistance and the reconstruction of transmission events.

### **Objectives:**

The present study aims to investigate the transmission events occurring among HIV-1 infected couples.

## **Material and methods:**

The *pol* sequences used in this study were generated from plasma samples collected from 37 HIV-1 infected couples followed in Department of Infectious Diseases of Hospitais da Universidade de Coimbra, and included samples from acute infections, chronic but drug-naïve infections and from patients at the time of therapy failure. Clinical, epidemiological information was available for all the patients.

All the plasma samples were sequenced in the protease and reverse transcriptase segments of the *pol* gene of HIV-1, analysed to determine the presence of resistance mutations to antiretroviral therapy, and phylogenetically analysed for subtyping attribution and for the presence of linkage pairs.

To establish the transmission link between the couples we evaluated the epidemiological and clinical data, the presence of antiretroviral mutations, and phylogenetic link.

## **Results:**

A total of 74 individuals were included in the epidemiological and phylogenetic analyses. Of these, 75,68% belong to heterosexual couples and 24,32% to homosexual couples. Almost all (93,24%) were Portuguese and living in the central region of Portugal (94,59%). For 70,25% of the individuals the HIV-1 infection occurred in Portugal, for 9,46% in another European country and for 16,22% it occurred in Africa. All the couples except one were Caucasian with the median age of 47,19 years (range 33-74). 13,51% of

the individuals reported a history of injecting drug use (1,35% from homosexual couples, and 12,16% from heterosexual couples), 21,62% reported having more than one sexual partner or other sexual risk behaviour (4,05% from homosexual couples, and 17,57% from heterosexual couples). Out of the 37 couples, 30 (81,08%) claimed the transmission had occurred between the partners of the same couple.

The most prevalent subtype in heterosexual couples was subtype B (53,70%), followed by subtype C (18,52%), G (11,11%), A and CRF02\_AG (5,56%), F (3,70%) and for 1,85% was not possible to identify the subtype. All the individuals of homosexual couples where subtype B, except for 2 from whom we didn't determine the subtype.

Drug resistance mutation to antiretroviral treatment was detected in 17 of the patients (4,05% belonged to naïve individuals).

The phylogenetic tree revealed 27 transmission clusters, 22 from heterosexual couples, 4 from homosexual couples and one cluster of 3 individuals. Almost all the transmission linkages (92,59%) were confirmed by epidemiological data.

All the 3 individuals that revealed the presence of transmission mutations belonged to 3 linkage pairs.

### **Conclusions:**

The results show that of 30 couples assumed to have transmitted to each other, 25 were molecularly confirmed as epidemiologically linked. Thus, assumptions concerning transmission linkage based on patient self-reporting alone are unlikely to be accurate,

although the number of unlinked transmission may depend on demographic, ethnic, and behavioural circumstances.

We also observed high subtype heterogeneity, associated with heterosexual transmission, revealing the introduction and diffusion of non-B subtypes in the population.

The presence of the same antiretroviral resistance mutation in 3 cluster pairs, where at least one of them had never received antiretroviral therapy, illustrates the potential for the secondary spread of such resistant strains.

# Capítulo I

---

## **Análise Molecular da Transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 entre Casais**

Fundamentação Teórica



## I – Introdução

Mais de 30 anos após o reconhecimento dos primeiros casos de SIDA <sup>(1)</sup>, estima-se que esta terá sido responsável pela morte de 40 milhões de pessoas, e que 33 milhões de pessoas em todo o mundo se encontram infectadas <sup>(2)</sup>, continuando a representar um grave problema de saúde pública mundial.

Desde o seu início a pandemia tem evoluído, alterando as suas características ao longo dos anos. Hoje em dia, não existem nem grupos populacionais nem zonas geográficas que não estejam em risco.

Na distribuição global da infecção pelo HIV-1 emergiram 2 padrões epidemiológicos. A maioria dos países em todo o mundo tem uma epidemia do HIV-1 concentrada, em que a infecção por HIV-1 é detectada em grupos de risco específicos, onde se incluem os homossexuais masculinos, toxicodependentes de drogas endovenosas, trabalhadores do sexo, e os parceiros regulares dessas pessoas. Por outro lado, em muitos países da África sub-Sahariana, a epidemia é generalizada, isto é, está disseminada por toda a população. No entanto, mesmo em locais onde a epidemia é generalizada, o risco de infecção por HIV-1 não é igual em todas as sociedades sendo aumentado em pessoas com um maior número de parceiros sexuais, que tenham adquirido doenças sexualmente transmitidas

e/ou pessoas que estejam sujeitas a outras exposições adicionais, como os toxicod dependentes de drogas endovenosas.

Apesar do grande esforço da investigação científica a nível mundial que permitiu o alargamento do nível de conhecimento sobre os tipos de transmissão, morbilidade e mortalidade de doentes infectados, e o desenvolvimento de drogas anti-retrovíricas cada vez mais eficazes, o controlo eficaz da pandemia ainda se encontra longe de ser alcançado, como consequência da elevada e dinâmica heterogeneidade do HIV-1.

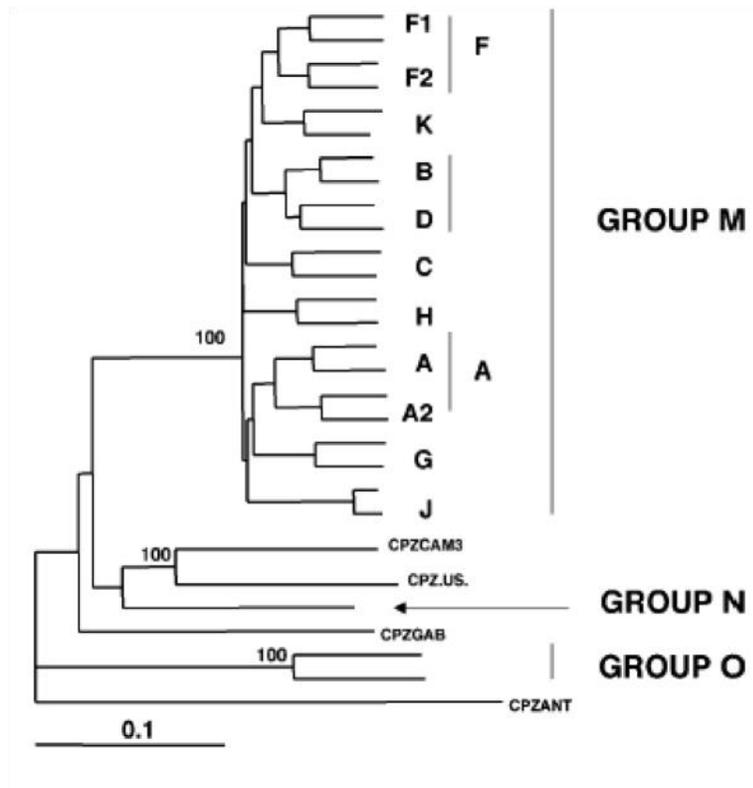
### **Diversidade e subtipos genéticos do HIV-1:**

O Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), agente causal da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA), foi isolado pela primeira vez no Instituto Pasteur de Paris em 1983 <sup>(3)</sup>.

Uma das características fundamentais do HIV-1 é a sua elevada variabilidade genética.

Actualmente a expressão genética do HIV-1 engloba 3 grupos: grupo M (*major*), grupo O (*outlier*), e grupo N (*non-M non-O*). O grupo M, que é o responsável pela maioria das infecções HIV-1 a nível mundial, pode ser ainda subdividido em 9 subtipos filogenéticos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), que são equidistantes entre si. Adicionalmente, dentro dos subtipos, é ainda possível identificar isolados víricos geneticamente relacionados e denominados de sub-subtipos, que filogeneticamente se encontram mais próximos entre

si do que dos outros subtipos. Este é o caso dos subtipos A e F, cujos membros estão classificados em sub-subtipos A1 a A2 e F1 a F2 respectivamente (Figura 1).



**Figura 1** – Árvore filogenética representando as relações evolutivas entre VIH-1 não recombinantes da linhagem VIH-1/VIScpz indicando subtipos e subsubtipos <sup>(4)</sup>.

Os vírus pertencentes ao mesmo subtipo genético divergem entre si 15 a 20%, enquanto vírus pertencentes a subtipos diferentes podem apresentar divergências de 25 a 30% <sup>(5)</sup>.

Durante a última década, devido aos avanços que tornaram possível a sequenciação do genoma completo do HIV-1, foram identificados isolados víricos cujas relações

filogenéticas com os diferentes subtipos variavam ao longo do seu genoma. Estes vírus são resultantes da recombinação entre dois ou mais vírus de subtipos diferentes que infectam a mesma célula. Quando estas formas recombinantes são identificadas em pelo menos 3 pessoas sem ligação epidemiológica directa, são designadas por formas recombinantes em circulação (*CRFs – Circulating Recombinant Forms*), caso contrário são descritas como formas recombinantes únicas (*URFs – Unique Recombinant Forms*). Até à data foram identificados mais de 40 CRFs, sendo as mais comuns as CRF02\_AG e CRF01\_AE <sup>(6, 7)</sup>.

A classificação com base na análise filogenética do genoma completo, permitiu evidenciar a complexidade de algumas estirpes que, com a classificação anterior baseada nos genes *env* e *gag* não era possível. Por exemplo, o subtipo descrito como E, circulante no Sudeste Asiático, não corresponde a uma linhagem pura, é afinal uma forma recombinante constituída por componentes do subtipo A e um hipotético subtipo E, tendo sido redefinido como CRF01\_AE. Verificou-se também que os subtipos B e D encontravam-se mais proximamente relacionados entre si do que com os outros subtipos, sendo o subtipo D considerado como uma variante Africana do subtipo B, no entanto a sua designação original foi mantida por consistência dos trabalhos anteriormente publicados.

**Diversidade genética do HIV-1 e a sua origem:**

As evidências filogenéticas sugerem que o HIV-1 teve origem numa transmissão zoonótica de espécies do lentivirus símio “simian immunodeficiency vírus” (SIV<sub>cpz</sub>) da subespécie do chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* para os humanos <sup>(8)</sup>. Esta transmissão entre espécies pode ter ocorrido, no início do século XX, na África Equatorial Ocidental por exposição directa ao sangue animal como consequência da caça, e consumo de carne crua <sup>(9)</sup>. De facto, nesta região que inclui países como o Gabão, a Guiné Equatorial, os Camarões e a República do Congo, foram encontradas várias condições que suportam esta hipótese. A co-circulação dos grupos M, N e O na população, a grande diversidade genética apresentada pelo grupo M <sup>(10, 11, 12, 13)</sup> e a proximidade genética com os vírus que infectavam os chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) <sup>(8, 14)</sup>, tornam a transmissão zoonótica a partir de animais infectados para os humanos plausível.

Adicionalmente, a análise filogenética das sequências do SIV<sub>cpz</sub> e dos isolados do HIV-1 do grupo M, N e O, sugere que estes 3 grupos tiveram origem em 3 eventos distintos de transmissão (Figura 1). No entanto, enquanto os vírus do grupo M aparentemente se adaptaram à nova espécie hospedeira, espalhando-se por todo o mundo e dando origem a múltiplos subtipos genéticos, os outros 2 grupos demonstram uma adaptação menos eficiente ao novo hospedeiro. O grupo O, que parece ser endémico nos Camarões, e seus países vizinhos da África Central Ocidental, representam apenas 1 a 5% de todas as amostras positivas para o HIV-1 <sup>(15)</sup>. Da mesma forma, os vírus do grupo N só foram

identificados num número restrito de indivíduos dos Camarões <sup>(15, 16)</sup>.

O caso mais antigo de infecção por HIV-1 foi identificado na República Democrática do Congo e data de 1959 <sup>(17)</sup>. Assumindo-se a existência de um relógio molecular, foi possível estimar que o grupo M começou por irradiar a partir desta fonte por volta de 1930.

### **Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1:**

Estudos de epidemiologia molecular mostram que, com excepção da África sub-Sahariana, onde são detectados quase todos os subtipos, CRFs, e vários URFs, há um padrão de distribuição geográfico para os vários subtipos do HIV-1 <sup>(82)</sup> (Figura 2).

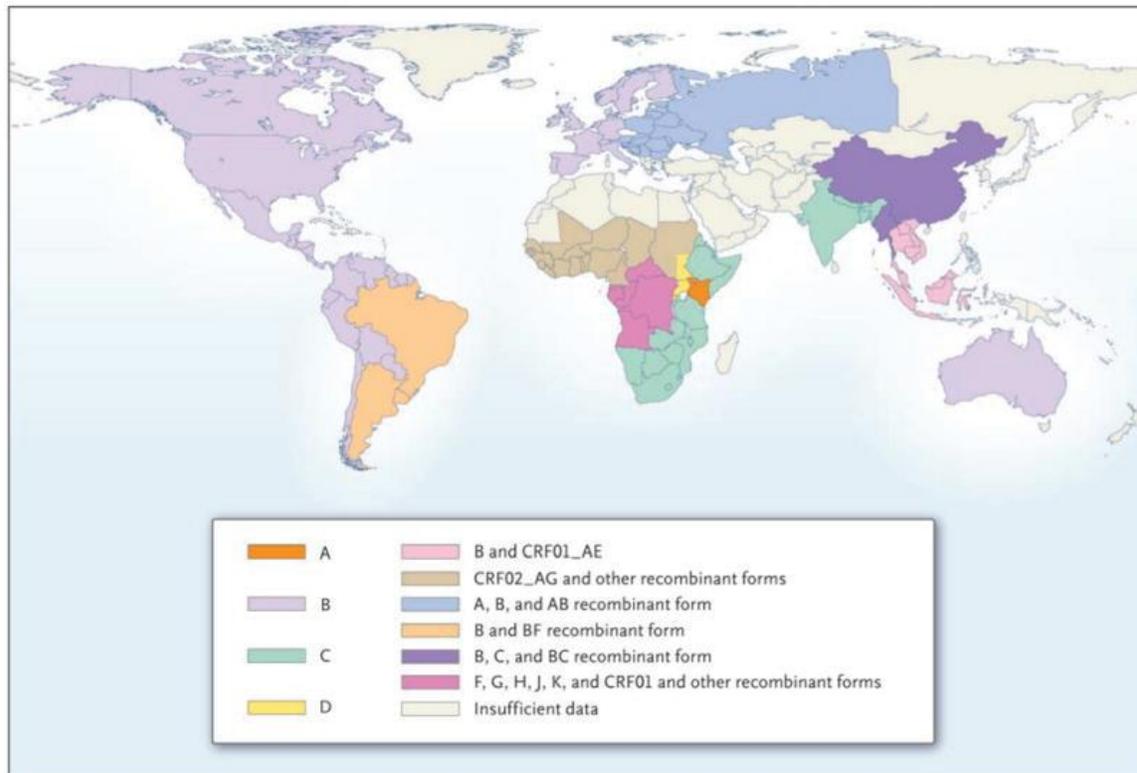
De acordo com estudos recentes, as formas genéticas do HIV-1 mais prevalentes são os subtipos A, B, e C, com o subtipo C a ser responsável por cerca de 50% de todas as infecções HIV-1 em todo o mundo. Os vírus do subtipo A são predominantes em áreas da África central e oriental (Quênia, Uganda, Tanzânia, e Ruanda). O subtipo B é a principal forma genética na Europa central e ocidental, na América do Norte, e na Austrália. Nos países da Europa do leste o subtipo A1 domina, mas os subtipos B e recombinantes CRF03\_AB co-circulam na epidemia. O subtipo C é predominante nesses países sendo responsável por mais de 80% das infecções globais, como na região sul da África (Botswana, Lesoto, Namíbia, África do Sul, Zimbabué, Malawi, Moçambique, Zâmbia e

Suazilândia) e Índia. Nos países da África oriental os subtipos A, D como o C são predominantes. Na África central e ocidental, descrita como “o caldeirão da diversidade do HIV-1” possui uma mistura de quase todas as estirpes do HIV-1, podendo ainda ser identificadas formas recombinantes na população infectada. Na África ocidental, em países como a Nigéria, Gana, Costa do Marfim e Camarões, os subtipos A e G são mais frequentes no entanto a maioria das infecções são pelo CRF02\_AG.

Na Ásia, a China apresenta uma elevada prevalência do subtipo B e C, que se recombinaram dando origem a formas recombinantes CRF07\_BC e CRF08\_BC. Na Tailândia, embora o subtipo B tenha sido o primeiro a ser introduzido na década de 80, actualmente o subtipo prevalente na China e na Tailândia, é o CRF01\_AE que se sobrepôs ao subtipo B. O subtipo C é o mais prevalente na Índia.

Na América do Sul, o subtipo B é prevalente, no entanto países como o Brasil e a Argentina apresentam uma diversidade de subtipos (B, C, e F) e recombinantes BF, em circulação.

A relevância dos CRFs na pandemia global tem vindo a ser cada vez mais reconhecida, sendo atribuída a 18% das infecções e representando a forma local predominante no Sudoeste Asiático (CRF01\_AE) e na África central ocidental (CRF02\_AG).



**Figura 2** – Distribuição dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1 no mundo <sup>(18)</sup>.

A distribuição global das diferentes formas do HIV-1 é um processo dinâmico. Quanto maior a diversidade de variantes do HIV-1 a circularem nas diferentes zonas do globo, maior é a possibilidade de ocorrerem formas recombinantes. O padrão de mosaico do genoma tornar-se-á ainda mais complexo, uma vez que vírus recombinantes poderão ainda recombinar entre si.

**Subtipos do HIV-1 e modo de transmissão:**

A transmissão do HIV-1 é mantida por diversos comportamentos de risco. Nas diferentes regiões do mundo, e mesmo dentro da mesma região, múltiplas modos de transmissão podem estar envolvidos na disseminação da epidemia.

Na Europa do leste e na Ásia central, a epidemia por HIV-1 encontra-se concentrada principalmente entre toxicodependentes de drogas injectáveis, prostitutas e nos seus parceiros sexuais. No sul e no sudoeste Asiático, os vários modos de transmissão tornam esta epidemia numa das mais diversificadas, consoante o país podemos ter a utilização de drogas injectáveis ou a prostituição como o principal modo de transmissão. Na América Latina, as infecções ocorreram primariamente em homossexuais masculinos, trabalhadores do sexo, e de uma forma menos relevante em toxicodependentes. Na Europa ocidental e central, como também na América do Norte, o modo de transmissão mais comum são as relações sexuais desprotegidas entre os heterossexuais e entre os homossexuais, e as infecções por partilha de agulhas em toxicodependentes tem vindo a tornar-se menos significativa. As relações heterossexuais permanecem a força condutora da epidemia na África sub-Sahariana, no entanto dados epidemiológicos recentes apontam para que a epidemia possa ser mantida de uma forma mais diversa do que inicialmente se pensava. A África do Norte e o Médio Oriente, pouco afectados pela epidemia, com excepção do Sudão, as fontes primárias de transmissão são as relações heterossexuais não protegidas e a partilha de seringas contaminadas entre toxicodependentes. Nas Caraíbas as relações sexuais não protegidas entre heterossexuais

e na Oceânia entre heterossexuais e entre homossexuais<sup>(2)</sup>.

Como referido anteriormente, a epidemia do HIV-1 nas diferentes regiões é mantida por diferentes subtipos, e dentro de cada região, podem ser encontrados diferentes subtipos para grupos de risco diferentes. Por exemplo, a co-circulação do subtipo B entre toxicodependentes, e do CRF01\_AE entre homossexuais foi originalmente descrita na Tailândia <sup>(19)</sup>; a segregação dos subtipos B pelos homossexuais e o subtipo C aos heterossexuais foi descrita na África do Sul <sup>(20)</sup>; e mais recentemente duas epidemias que ocorrem na Argentina, uma entre homossexuais associada ao subtipo B, e outra entre heterossexuais e toxicodependentes associadas aos recombinantes BF <sup>(21)</sup>. Na Europa, a epidemia tem sido mantida nos grupos de risco homossexual e toxicodependente, pelo subtipo B, os subtipos não B e CRFs tem vindo a ser introduzidos progressivamente por transmissão heterossexual por emigrantes, turistas, homens de negócios e militares que transportam os subtipos não-B, de regiões endémicas para os países Ocidentais <sup>(22, 23)</sup>.

Todas estas observações, descritas em várias fases da epidemia mundial, sugerem diferentes propriedades biológicas dos subtipos, que resultariam numa certa afinidade dos indivíduos pertencentes a diferentes grupos de risco para a infecção do HIV-1. No entanto, uma demonstração consistente desta associação nunca foi feita, não existindo uma ligação específica entre um subtipo e um único modo de transmissão. De facto, o subtipo B é transmitido entre todos os grupos de risco nos países ocidentais; o subtipo A é transmitido entre heterossexuais na África sub-Sahariana e entre toxicodependentes nos

países do Leste Europeu.

Deste modo, a aparente segregação dos subtipos do HIV-1 de acordo com os comportamentos de risco pode ser uma consequência dos factores genéticos, demográficos, económicos e sociais que separam ou que aproximam indivíduos com comportamentos de risco para a aquisição de infecção HIV-1.

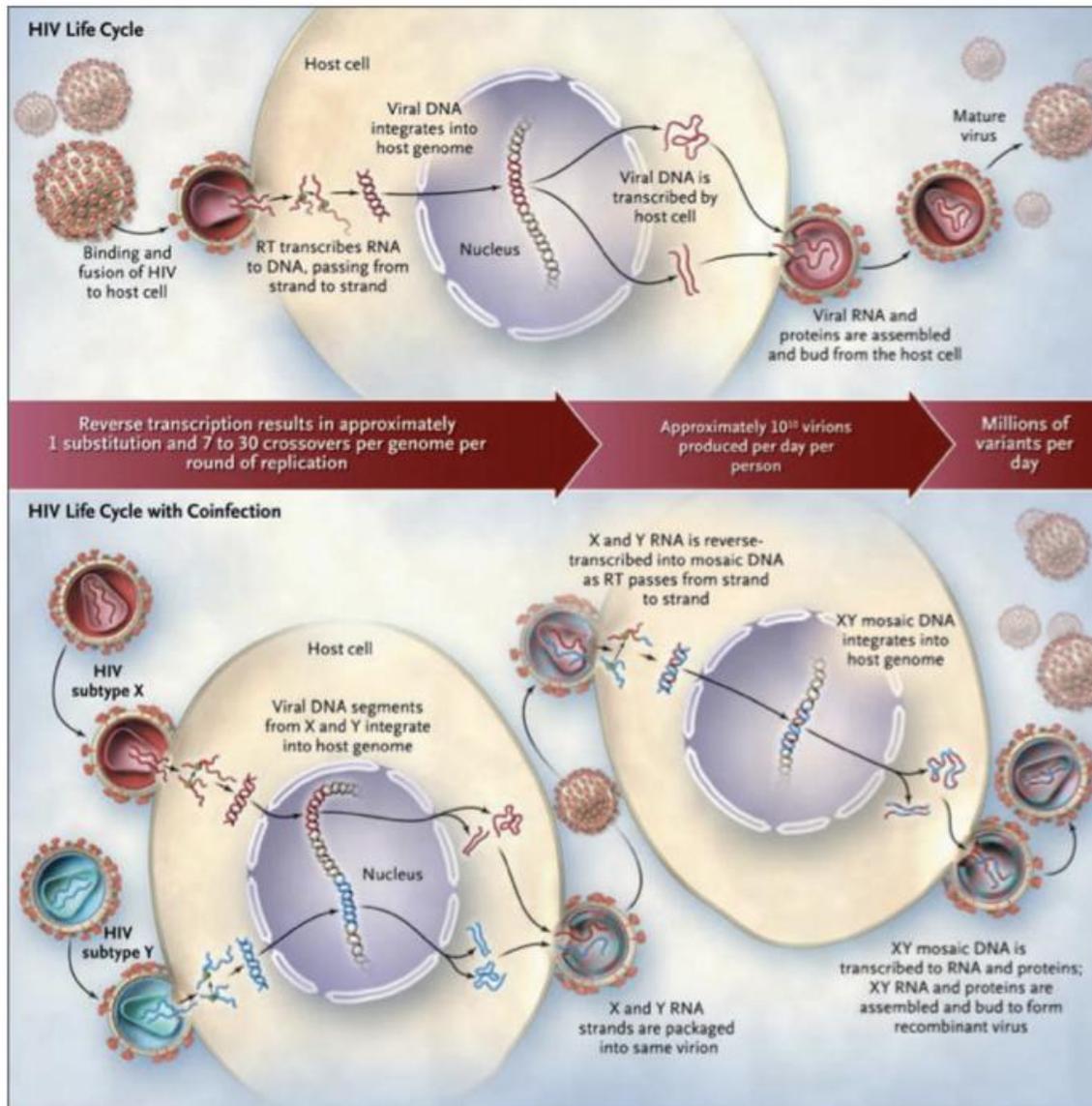
### **Origem da diversidade nos hospedeiros infectados:**

O HIV-1 é um vírus de cadeia dupla de RNA, da família *Retroviridae*, género *Lentivirus*, possuindo vários mecanismos intrínsecos que garantem a extrema variabilidade genética que o caracteriza.

A elevada taxa de replicação do HIV-1 associada à elevada taxa de erro da transcriptase inversa (não possui qualquer mecanismo de verificação e correcção de erros que ocorrem na transcrição da cadeia de RNA) resulta na geração de uma extraordinária diversidade genética dentro da população de vírus. Tendo o HIV-1 um comprimento aproximado  $10^4$  pares de bases e um número estimado de ciclos de replicação por dia de  $10^{10}$ , com uma taxa de erro aproximada de  $10^{-5}$ / nucleótido por ciclo de replicação, estima-se que diariamente sejam produzidas, em cada indivíduo, milhões de variantes víricas <sup>(24)</sup> (Figura 3).

Para além dos erros de incorporação de nucleótidos, os fenómenos de recombinação do HIV-1 também contribuem para a variabilidade genética do HIV-1. A transcriptase inversa possuiu a capacidade de, durante a replicação, alternar a transcrição entre as duas cadeias de RNA produzindo uma nova sequência de DNA vírico, que contém segmentos das duas cadeias de RNA que lhe deram origem. Assim, no caso de co-infecção de uma célula por duas variantes do vírus este processo pode originar uma nova variante do vírus conduzindo a um aumento de diversidade <sup>(25, 55, 56)</sup> (Figura 3).

Como consequência, a população vírica presente num indivíduo, num dado momento é constituída por uma enorme quantidade de mutantes, designados por *quasispecies*, estes apresentam variações entre si que lhes conferem diferentes capacidades replicativas e, de acordo com a pressão selectiva do ambiente onde se encontram, lhes irá conferir ou não, uma vantagem selectiva. Assim, a presença de *quasispecies* do HIV-1 são de extrema importância clínica e evolucionária uma vez que a sua variabilidade genética permite responder à pressão selectiva, quer seja provocada pelo sistema imunitário com a adaptação do vírus a novas células alvo e na manutenção de uma infecção persistente, ou pela acção da terapêutica anti-retrovírica com a selecção e sobrevivência dos mutantes que apresentem uma sensibilidade reduzida a esses fármacos <sup>(26)</sup>.



**Figura 3** – Evolução da diversidade do HIV-1 durante um ciclo de vida típico e a criação de formas recombinantes únicas no contexto da co-infecção por dois subtipos <sup>(18)</sup>.

Adicionalmente, o próprio processo de transmissão do HIV-1 para um novo hospedeiro vai influenciar a expressão da sua diversidade.

O HIV-1 é transmitido de humano para humano por 3 vias <sup>(27)</sup>: a transmissão sanguínea (transusão de produtos sanguíneos contaminados, picada ou partilha de agulhas previamente utilizadas por alguém infectado, inseminação artificial, excertos de pele, transplante de órgãos); a transmissão vertical (transmissão mãe-filho durante a gravidez, nascimento e amamentação); e transmissão sexual (relações sexuais não protegidas com parceiro infectado). No entanto, independentemente da via em que a transmissão ocorre, ela está dependente da infecciosidade do “caso índice”, isto é, da pessoa que transmite o vírus HIV-1 e da susceptibilidade do hospedeiro <sup>(28)</sup>. A infecciosidade depende da concentração do HIV-1 e das células infectadas pelo HIV-1 nos fluídos corporais como o sangue e as secreções genitais <sup>(29)</sup>, como também de determinantes específicos do próprio vírus necessários à transmissão do HIV-1.

Os requisitos víricos e celulares para a transmissão do HIV-1 permanecem ainda por esclarecer, no entanto, os vírus com capacidade de utilizarem o co-receptor CCR5 (vírus R5) são transmitidos mais frequentemente por via heterossexual, do que as estirpes que utilizam o co-receptor CXR4 (vírus X4) <sup>(30, 31)</sup>.

A susceptibilidade à infecção pelo HIV-1 também não é uniforme e reflecte uma combinação de factores genéticos (a deleção no gene que codifica o CCR5 confere uma protecção substancial à infecção pelo HIV-1) <sup>(32)</sup>, resistência inata (reflectida na flora microbiana autóctone e na presença de defesas imunológicas das mucosas) <sup>(33)</sup> e, muito raramente, resistência adquirida (resistência descrita em prostitutas africanas que permaneciam negativas para o HIV-1 apesar de manterem comportamentos de risco, foi associada a uma resposta imune celular e por anticorpos presentes na mucosa. Nenhum

outro estudo ligou estes mecanismos de defesa com a protecção a infecção <sup>(34, 35)</sup>.

Assim, durante a transmissão do HIV-1 a um novo hospedeiro, observa-se um estreitamento significativo da diversidade da população do vírus, de modo que a população produzida no início da infecção resulta da expansão de uma ou de poucas partículas víricas. Factores como a resposta imune inata, a densidade de células alvo no local de infecção, o número de partículas víricas transmitidas e a estrutura da população vírica do hospedeiro contribuem para esse estreitamento <sup>(36)</sup>.

Além desta diminuição da diversidade durante a transmissão do HIV-1, este vai ser também sujeito a um processo de selecção natural, de modo que os vírus encontrados nos estadios iniciais da infecção possuem características distintas daqueles observados nos estadios mais tardios da imunodeficiência. De modo geral, os isolados víricos nos estadios iniciais apresentam baixas taxas de replicação, replicam com maior eficiência nos macrófagos e utilizam preferencialmente o co-receptor CCR5 (vírus R5) para infectar a célula. Por outro lado, em estadios mais avançados, uma grande parte das estirpes víricas apresenta altas taxas de replicação, replicam-se com maior eficiência em células T e utilizam a molécula CXCR4 (vírus X4) como co-receptor. Simultaneamente, e apesar dos vírus X4 dominarem a população vírica na fase mais avançada, são as estirpes R5 que tipicamente serão transmitidas durante o processo de infecção.

### **Mutações de resistência:**

A utilização generalizada dos fármacos anti-retrovíricos no tratamento da infecção HIV-1 nos países desenvolvidos, foi acompanhada pelo aparecimento de resistências a esses fármacos.

A presença dos anti-retrovíricos altera a pressão selectiva da população vírica. Vírus com mutações, que ocorrem naturalmente, e que possuam algum grau de resistência aos fármacos, continuam a replicar e a aumentar a sua população em relação aos vírus suprimidos pelos fármacos. Ao longo do tempo, os mutantes adaptados às novas condições acumulam mutações adicionais que podem aumentar o seu nível de resistência ou compensar o seu *fitness* reduzido. O resultado eventual é o predomínio das estirpes resistentes, que melhor se adequam à presença da droga, e conseqüentemente surge a falência terapêutica.

Os anti-retrovíricos actuais actúan ao nível das 3 enzimas necessárias à replicação do HIV-1 e ao nível da entrada do vírus na célula:

- inibição do co-receptor CCR5 que permite a fixação do vírus a membrana celular;
- inibição da fusão entre o vírus e a membrana celular;
- inibição da transcriptase inversa, enzima que permite a síntese do ADN complementar;
- inibição da integrase, enzima necessária a integração do ADN viral no seio do ADN cromossómico das células hospedeiras;

-inibição da protease, enzima necessária à clivagem dos precursores polipeptídicos das partículas víricas.

A resistência aos anti-retrovíricos está ligada à presença de mutações nos genes codificadores das enzimas (protease, transcriptase inversa e integrase) ou das proteínas (proteínas de fusão). A selecção das mutações de resistência depende de factores farmacológicos (concentrações subóptimos de anti-retrovíricos, interacções), da potência do tratamento e da barreira genética do vírus para os diferentes anti-retrovíricos, isto é, do número de mutações víricas necessárias para que o vírus se torne resistente. Actualmente, a utilização dos testes de resistência são prática corrente nos países desenvolvidos, e permitam otimizar a escolha do tratamento anti-retrovírico quer para um início de terapêutica como para um tratamento alternativo.

A transmissão de vírus com resistência aos anti-retrovíricos pode ocorrer em infecções pelas diferentes vias incluindo as relações heterossexuais e homossexuais, utilização de drogas endovenosas e transmissão vertical<sup>(37, 38, 39)</sup>. Adicionalmente, análises filogenéticas permitiram detectar “clusters” de pessoas, com mutações de resistência e que foram infectadas recentemente, indicando que os vírus com resistência aos anti-retrovíricos uma vez transmitidos, também podem ser uma fonte para a continuação da propagação das resistências<sup>(40)</sup>.

Assim, as mutações de resistência podem ser adquiridas, quando desenvolvidas num indivíduo que esteja sujeito a tratamento anti-retrovírico (resistências adquiridas ou

secundárias), ou transmitidas quando ocorrem por transmissão de um vírus com resistência aos anti-retrovíricos para um individuo naif (resistências transmitidas ou primárias). Apesar de ambos os tipos de resistência, adquirida ou transmitida, sejam uma preocupação no que se refere à saúde pública, as resistências transmitidas têm o potencial de mais rapidamente reverter a eficácia da terapêutica anti-retrovírica de primeira linha. Pessoas com resistências transmitidas começam o tratamento com uma menor barreira genética para aquisição de resistência, um maior risco de falha virológica ao tratamento, e um maior risco de desenvolver resistências mesmo em regimes para os quais originalmente eram activos <sup>(41, 42)</sup>. Na Europa e América do Norte estudos sobre a prevalência das resistências indicam valores entre os 5 e 15% nas pessoas diagnosticadas de novo e entre 10 a 15% nas pessoas com infecções crónicas <sup>(43)</sup> o impacto destes dados ao nível da população verifica-se não só nas resistências transmitidas como sua da persistência após a infecção primária.

Nos estudos epidemiológicos sobre a transmissão de resistências alguma atenção deve ser dada em relação à escolha das mutações que devem ser consideradas. Dentro das mutações vamos encontrar mutações de resistência (adquiridas e transmitidas) e os polimorfismos naturais. As mutações de resistência contribuem para o aparecimento de resistências, e só ocorrem em vírus que tenham sido sujeitos a terapêutica anti-retrovírica, devendo ser aplicáveis a todos os subtipos. Os polimorfismos são mutações que ocorrem frequentemente em vírus que não estão expostos à pressão selectiva dos fármacos. No entanto, alguns deste polimorfismos desempenham um papel importante na resistência aos fármacos em doentes sujeitos a terapêutica anti-retrovírica <sup>(43, 44)</sup>.

As diferenças genéticas entre os subtipos do HIV-1 podem ser críticas para o acompanhamento clínico, como também para a vigilância das resistências aos anti-retrovíricos, uma vez que o tratamento se expandiu para regiões onde predominam os subtipos não-B.

A maior parte da informação sobre os mecanismos de resistência do HIV-1 provêm de estudos feitos em vírus de subtipo B, predominante na América do Norte e na Europa, o que levanta potenciais problemas na comparação das respostas à terapêutica entre pessoas infectadas com vírus do subtipo não-B, que na sua maioria vivem em países de recursos limitados. No entanto, têm vindo a ser feitas algumas observações sobre as resistências nos vírus não-B. Com poucas exceções, praticamente todas as diferenças entre os subtipos que ocorrem em vírus de indivíduos não sujeitos a tratamento anti-retrovírico são em posições que também são polimórficas para o subtipo B. Adicionalmente, as mutações que causam resistência aos vírus do subtipo B parecem ser as principais mutações que causam resistências aos subtipos não-B. A maioria das posições da protease e transcriptase inversa que conferem resistência aos anti-retrovíricos no subtipo B, também são seleccionados por um ou mais dos subtipos não-B e também não foram encontradas evidências de que os subtipos não-B desenvolviam resistência por mutações em posições não associadas a resistências nos vírus de subtipo B <sup>(44, 45)</sup>. Sugerindo que a maior parte dos inibidores da protease e da transcriptase inversa são igualmente activos para os vírus não-B como para os vírus do subtipo B. No entanto, algumas mutações apresentam-se de forma diferente entre os subtipos. Por exemplo, a mutação V106M da transcriptase inversa, que raramente ocorre no subtipo B após a exposição aos inibidores

não nucleosídeos da transcriptase inversa, é uma das mutações de resistência mais comuns na inibição desta classe no subtipo C. Da mesma forma, a mutação V82M da protease, que raramente é seleccionada pelos inibidores da protease para o subtipo B, é uma causa comum para a resistência aos inibidores da protease no subtipo G.

### **Avaliação da transmissão do HIV-1 entre indivíduos relacionados:**

A elevada dinâmica evolutiva do HIV-1, permitiu a utilização dos métodos filogenéticos para um melhor conhecimento do vírus e da sua epidemia.

Actualmente, a filogenia é aplicada em estudos de compartimentalização<sup>(46)</sup>, resistência aos anti-retrovíricos, progressão da doença e na indicação de reservatórios<sup>(47)</sup>. Numa escala epidemiológica, a filogenia molecular permitiu reconstruir a origem do HIV-1, a sua história epidemiológica, a migração das estirpes do HIV-1, as vias de infecção e a transmissão entre doentes epidemiologicamente relacionados<sup>(40, 48, 49, 50)</sup>.

A reconstrução dos eventos de transmissão do HIV-1, entre indivíduos relacionados epidemiologicamente, tem vindo a ser utilizada em estudos epidemiológicos mas também como apoio à medicina forense.

Como apoio à medicina forense, a investigação molecular, foi introduzida pela primeira vez no caso que ficou conhecido como “dentista da Florida” onde se concluiu que vários pacientes teriam sido infectados, com o HIV-1, pelo seu dentista<sup>(51)</sup>.

Independentemente da finalidade da reconstrução dos eventos de transmissão, entre indivíduos epidemiologicamente relacionados, quer seja em estudos epidemiológicos ou em casos legais, as evidências filogenéticas apenas podem fornecer um suporte para a ligação entre casos e, somente quando acompanhadas de evidências clínicas e epidemiológicas, não constituindo por si só prova de transmissão<sup>(52, 53, 54)</sup>.

A introdução da sequenciação directa do HIV-1 para a monitorização das resistências aos anti-retrovíricos, como um componente standard dos cuidados clínicos, fornece uma enorme quantidade de sequências do gene *pol* do HIV-1. Estas sequências passam a ficar disponíveis para a utilização em abordagens filogenéticas para investigar hipóteses que não seriam possíveis só com base nos dados de vigilância não genéticos<sup>(49)</sup>.

A utilização de sequências do gene *pol* do HIV-1 na reconstrução de eventos de transmissão levantou algumas questões, uma vez que sendo uma região conservada, a distância genética entre indivíduos não relacionados nem sempre seria significativamente diferente da distância apresentada entre dois indivíduos relacionados entre si<sup>(50)</sup>. No entanto, novos estudos sugerem que o gene *pol* do HIV-1 possui variabilidade genética intrínseca, que permite a sua utilização na reconstrução de histórias de transmissão por meio de análise filogenética<sup>(48, 49, 57)</sup>.

Assim laboratórios de rotina, como o Laboratório de Virologia do Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, passam a ter ao seu alcance uma enorme quantidade de dados genéticos que possuem informação única e valiosa para o conhecimento da sua população.

## **Capítulo II**

---

### **Análise Molecular da Transmissão do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 entre Casais**

Projecto de Investigação



## I - Introdução

O vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1), é caracterizado por uma elevada diversidade genética, que se traduz na existência de variantes com diferentes subtipos moleculares e formas recombinantes. Os principais factores que contribuem para essa variedade molecular são a ausência de capacidade correctora da enzima transcriptase inversa do HIV-1, a elevada frequência de replicação do HIV-1 *in vivo*, a pressão selectiva do hospedeiro, e a recombinação genómica em células infectadas.

A forma como a evolução da diversidade genética do HIV-1 se manifesta no hospedeiro e entre hospedeiros é muito diferente <sup>(58)</sup>. No hospedeiro, a população vírica está sujeita a uma selecção natural resultante do seu esforço contínuo para escapar ao sistema imunitário. Este processo reflecte-se no constante aparecimento e extinção de novas estirpes através do tempo <sup>(59)</sup>. Em indivíduos sob tratamento anti-retrovírico, mas em que a replicação do HIV não esteja completamente suprimida, a pressão selectiva reflecte-se na formação e selecção de estirpes com mutações de resistência.

Entre hospedeiros, a pressão selectiva não parece ter um impacto tão importante. Em vez de isso, a diversidade genética do HIV é predominantemente moldada por factores temporais e espaciais que estão relacionados com a sua história demográfica <sup>(58)</sup>,

reflectindo-se frequentemente em associações específicas com zonas geográficas e/ou modos de transmissão <sup>(60)</sup>.

Actualmente a reconstrução filogenética é a abordagem preferencial na monitorização da diversidade genética, monitorização e controlo da transmissão de resistências, e na reconstrução de eventos de transmissão do HIV-1 entre indivíduos relacionados epidemiologicamente, não só com fins epidemiológicos mas também na resolução de casos legais <sup>(48, 49, 50, 51, 53, 54)</sup>. A abordagem filogenética permite investigar hipóteses epidemiológicas que só através de dados de vigilância não genéticos não poderiam ser conseguidas <sup>(49, 61)</sup>, onde o estabelecimento da ligação epidemiológica da transmissão do HIV-1 entre indivíduos assenta na documentação da proximidade genética entre os vírus e, na obtenção de dados clínicos e epidemiológicos fidedignos que possam reforçar ou refutar a hipótese de transmissão do HIV-1 <sup>(53, 54)</sup>.

## II – Objectivos

Este trabalho tem por objectivo avaliar e caracterizar os eventos de transmissão do HIV-1 entre dois indivíduos com ligação epidemiológica conhecida. Nesse sentido, pretendemos:

- 1) Avaliar a presença de mutações de resistência em ambos os elementos do casal,
- 2) Determinar os subtipos genéticos da estirpe do vírus infectante em ambos os elementos do casal,
- 3) Avaliar as sequências víricas dos dois elementos do casal quanto à sua proximidade genética.

### **III - Material e Métodos**

#### **População estudada:**

Foram estudados ambos os elementos de 37 casais portadores do HIV-1, inscritos no Serviço de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, com relações epidemiológicas conhecidas e cuja história de transmissão do HIV-1 se encontra documentada. A escolha das amostras plasmáticas, armazenadas a -70°C no Laboratório de Virologia do Serviço de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, recaiu sempre que possível, na amostra mais antiga existente, tendo sido incluídas amostras de doentes sem experiência anti-retrovírica e amostras de doentes em falência terapêutica. A obtenção da informação epidemiológica foi feita por consulta dos processos clínicos de cada doente.

#### **Extracção do RNA, amplificação e sequenciação do DNA:**

O ácido ribonucleico do HIV foi isolado e purificado utilizando o kit de extracção “QIAamp™ Viral RNA Mini kit” (QIAGEN). As sequências das regiões codificantes

para a protease e transcriptase inversa do gene *pol*, foram obtidas por sequenciação directa e leitura automatizada através da utilização do sistema comercial “TRUEGENE™ HIV-1” (SIEMENS) <sup>(62)</sup>. Todas as sequências foram corrigidas e cortadas manualmente, obtendo-se uma sequência final de 885 pares de bases (codão 10 ao 99 da PR; codão 40 ao 244 da RT). Todas as amostras plasmáticas utilizadas na obtenção das sequências do gene *pol* possuíam cargas víricas plasmáticas superiores a 1000 cópias por mililitro, para garantir a obtenção das sequências representativas das estirpes víricas circulantes.

#### **Avaliação das mutações de resistência:**

Todas as sequências foram avaliadas quanto à presença de mutações de resistência e polimorfismos naturais nas regiões codificadoras PR e RT, de acordo com o “software” do sistema e segundo a base de dados “Stanford HIV Reverse Transcriptase and Protease Sequence Database” (<http://hivdb.stanford.edu>). Tendo sido considerado, para efeitos de análise, o seguinte conjunto de mutações de resistência associada aos inibidores da protease (L24I, D30N, V32I, M46I, I47VA, G48V, I50VL, F53L, I54VLMATS, G73STCA, V82AFTSM, I84VAC, N88DS, L90M), inibidores análogos de nucleosídeos (M41L, K65R, D67NG, D67Del, T69D, T69Ins, K70R, L74V, V75AMTS, F77L, Y115F, F116Y, Q151M, M184VI, L210W, T215YFCDEIV, K219QER) e aos não análogos de nucleosídeos (L100I, K101E, K103NS, V106AM, Y181CI, Y188LHC,

G190ASE, P225H, M230L, P236L) de acordo com o proposto pela “International AIDS Society”<sup>(63)</sup> e pela “lista de Shafer”<sup>(44, 64)</sup>.

### **Análise filogenética:**

Os subtipos genéticos do HIV-1 e os possíveis *clusters* foram determinados e avaliados em relação à proximidade genética utilizando métodos de análise filogenética.

As sequências obtidas foram alinhadas através do programa CLUSTAL X (v1.83)<sup>(65)</sup>, com um conjunto de sequências de referência do grupo M do HIV-1, obtidas da Los Alamos Database ([www.hiv.lanl.gov](http://www.hiv.lanl.gov)). Na análise filogenética foi utilizado o pacote PHYLIP (v3.65) (disponível em <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>), as distâncias evolutivas foram determinadas através do programa Dnadist com a taxa de transição/transversão 2.0, pelo modelo de dois parâmetros de Kimura<sup>(66)</sup>, e as relações filogenéticas foram inferidas pelo método *Neighbor-Joining*<sup>(67)</sup>. Como “outgroup”, foi utilizada uma sequência do HIV-1 subtipo N (número de acesso YBF30) também obtida do Los Alamos HIV database. A robustez estatística da topologia das árvores filogenéticas foi efectuada por “bootstrapping” com 1000 réplicas<sup>(68)</sup>.

## IV – Resultados

### Dados epidemiológicos:

A população estudada (Tabela 1) é constituída por 74 elementos, 62,16% (n=46) são do sexo masculino e 37,84% (n=28) do sexo feminino. Destes, 97,30% (n=72) são de raça caucasiana e apenas 2,70% (n=2) dos elementos são negróides. A idade média é de 47,19 anos (mínima 33 anos e máxima 74 anos).

A nacionalidade é maioritariamente Portuguesa, com 93,24% (n=69) dos indivíduos, dos restantes elementos 2,70% (n=2) têm a sua origem num outro país Europeu e 4,05% (n=3) são de nacionalidade Africana. Quanto ao seu local de residência 94,59% (n=70) residem na região Centro, 4,05% (n=3) na região Norte e 1,35% (n=1) na região Sul.

Portugal foi para 70,27% (n=52) dos elementos o país provável de infecção, 9,46% (n=7) indivíduos indicam um outro país Europeu, 16,22% (n=12) referem África como o local provável, 1,35% (n=1) elementos não sabe onde esta pode ter ocorrido e em 2,70% (n=2) dos elementos não foi possível obter esta informação.

No que se refere à categoria de transmissão, 60,81% (n=45) encontram-se na categoria heterossexual, 25,68% (n=19) foram incluídos na categoria homossexual - bissexual, e

13,51% (n=10) dos indivíduos possuem uma história de consumo de drogas de administração intravenosa.

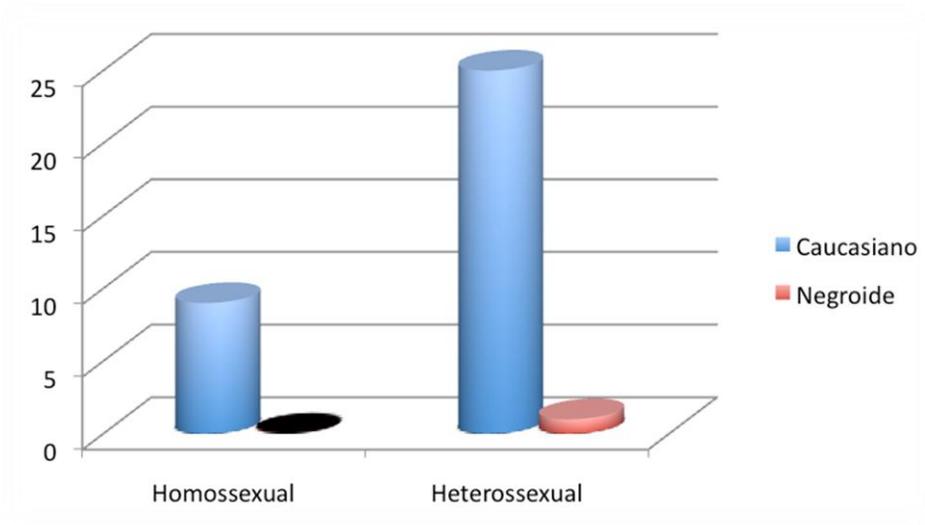
Para 41,90% (n=31) dos doentes o teste de diagnóstico do HIV foi efectuado por rotina, enquanto que para 44,60% (n=33) dos doentes este foi realizado após o conhecimento da seropositividade do parceiro para o HIV-1. O diagnóstico de uma doença indicadora foi o motivo do teste apenas em 5,40% (n=4) dos indivíduos, e em 8,11% (n=6) não se obteve qualquer informação.

Em relação à presunção sobre a origem da infecção do HIV-1, 40,54% (n=30) dos elementos indicaram o parceiro actual como o elemento infectante, 51,35% (n=38) referem outros motivos (parceiro anterior, partilha de agulhas) para a origem da infecção e em 8,11% (n=6) dos casos não foi possível obter essa informação.

A população estudada é constituída por 37 casais (Figura 1), dos quais 75,68% (n=28) são casais heterossexuais e 24,32% (n=9) são homossexuais. Destes, 2,70% (n=1) dos casais heterossexuais são de raça negróide, e os restantes casais (27 heterossexuais e 9 homossexuais) são caucasianos.

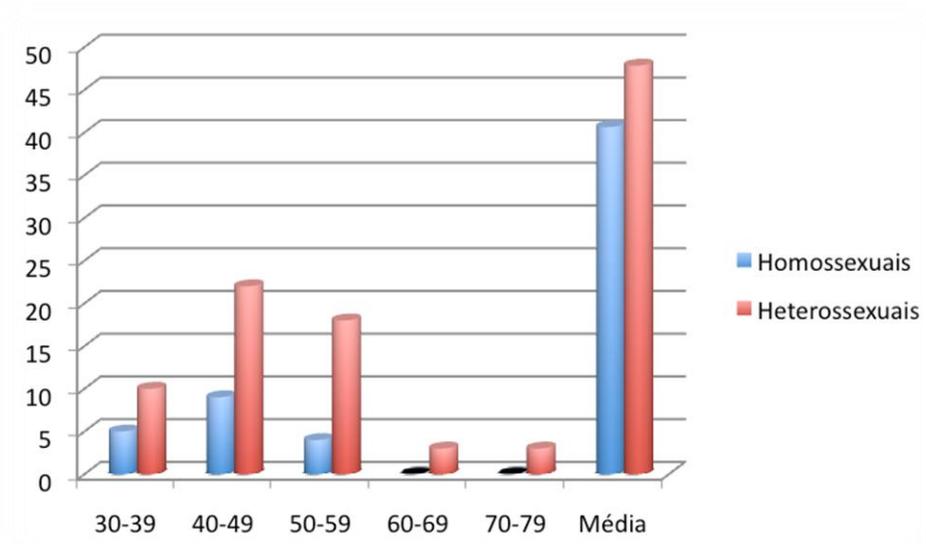
**Tabela 1** - Características gerais da população estudada

| <b>Características</b>                 | <b>População (N=74)</b> |
|--|-------------------------|
| <b>Sexo (%)</b>                        |                         |
| Masculino                              | 46 (62,16%)             |
| Feminino                               | 28 (37,84%)             |
| <b>Raça (%)</b>                        |                         |
| Caucasiana                             | 72 (97,30%)             |
| Negróide                               | 2 (2,70%)               |
| <b>Idade (anos)</b>                    |                         |
| Media (mínima - máxima)                | 47,19 (33 – 74)         |
| <b>Nacionalidade (%)</b>               |                         |
| Portugal                               | 69 (93,24%)             |
| Outros Países Europeus                 | 2 (2,70%)               |
| África                                 | 3 (4,05%)               |
| <b>Residência (%)</b>                  |                         |
| Região Centro                          | 70 (94,59%)             |
| Região Norte                           | 3 (4,05%)               |
| Região Sul                             | 1 (1,35%)               |
| <b>País Provável de Infecção (%)</b>   |                         |
| Portugal                               | 52 (70,27%)             |
| Outros Países Europeus                 | 7 (9,46%)               |
| África                                 | 12 (16,22%)             |
| Não sabe                               | 1 (1,35%)               |
| Sem informação                         | 2 (2,70%)               |
| <b>Categoria de transmissão (%)</b>    |                         |
| Heterossexual                          | 45 (60,81%)             |
| Homossexual -Bissexual                 | 19 (25,68%)             |
| Toxicodependente                       | 10 (13,51%)             |
| <b>Motivo do teste (%)</b>             |                         |
| Rastreio                               | 31 (41,90%)             |
| Parceiro HIV -1 positivo               | 33 (44,60%)             |
| Doença indicadora                      | 4 (5,40%)               |
| Sem informação                         | 6 (8,11%)               |
| <b>Percepção da origem da infecção</b> |                         |
| Parceiro actual                        | 30 (40,54%)             |
| Outro                                  | 38 (51,35%)             |
| Sem informação                         | 6 (8,11%)               |
| <b>Estado Civil</b>                    |                         |
| Casado                                 | 37 (50,0%)              |
| Solteiro                               | 26 (35,14%)             |
| Separado/Divorciado                    | 4 (5,41%)               |



**Figura 1** – Distribuição dos casais segundo a raça.

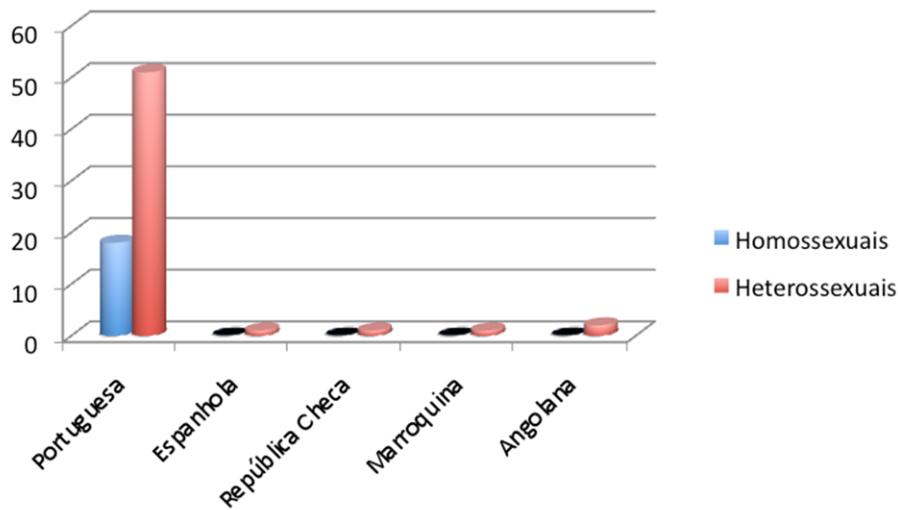
Distribuindo os elementos de acordo com o tipo de casal e o grupo etário (Figura 2) verificou-se que, para os casais heterossexuais, o escalão com maior número de elementos era o que compreendia as idades entre os 40 e os 49 anos (29,73%; n=22) a que se seguiam os escalões entre 50 e 59 anos (24,32%; n=18), entre os 30 e os 39 anos (13,51%; n=10), e de uma forma menos representativa os escalões entre os 60 e os 69 anos (4,05%; n=3) e entre os 70 e os 79 anos (4,05%; n=3). Entre os casais homossexuais, os seus elementos encontravam-se distribuídos pelas faixas etárias dos 40 aos 49 anos (12,16%; n=9), dos 30 aos 39 anos (6,76%; n=5) e dos 50 aos 59 anos (5,41%; n=4).



**Figura 2** – Distribuição segundo tipo de casal e a idade.

Observando-se que a idade média dos casais homossexuais é de 40,65 anos (mínima 38 anos e máxima 59 anos) contra os 47,84 anos (33 mínima e máxima 74 anos) dos casais heterossexuais.

Quanto à nacionalidade (Figura 3), a população estudada é maioritariamente Portuguesa, sendo esta a nacionalidade de 24,32% (n=18) dos elementos, integrados nos casais homossexuais, e de 68,92% (n=51) de elementos que pertencem a casais heterossexuais. Encontrámos também 1,35% (n=1) de indivíduos de nacionalidade Espanhola, 1,35% de indivíduos da República Checa (n=1), 1,35% de Marroquinos (n=1), e 2,70% (n=2) de nacionalidade Angolana, todos eles pertencentes a casais heterossexuais.



**Figura 3** – Distribuição dos casais segundo nacionalidade.

Da informação obtida sobre o local de residência, por distrito (Figura 4), dos 74 elementos que constituem a amostra verificou-se que 24,32% (n=18) residiam em Coimbra, dos quais 5,41% (n=4) são elementos de casais homossexuais e 18,92% (n=14) elementos de casais heterossexuais.

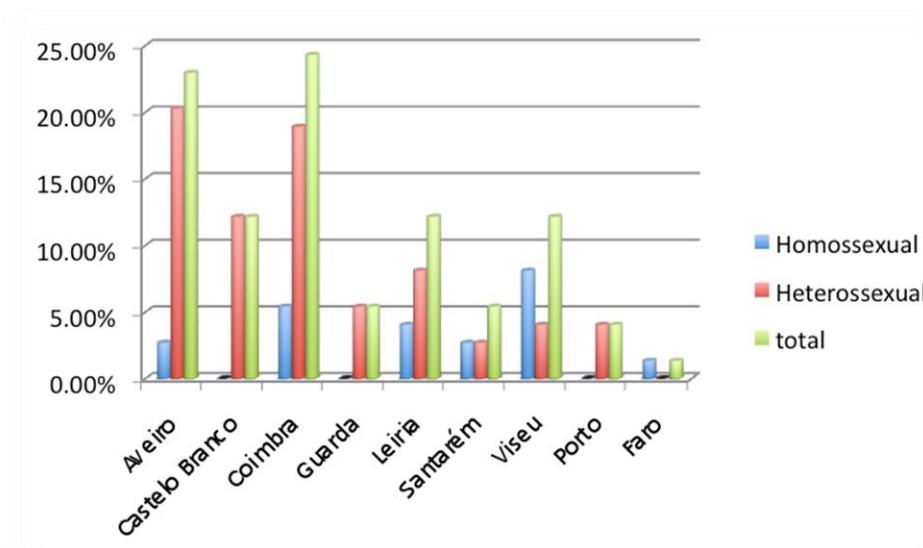
Dos 22,97% (n=17) indivíduos que residiam em Aveiro, 1,35% (n=1) faziam parte dos casais homossexuais e 20,27% (n=15) indivíduos de casais heterossexuais.

Em Leiria residiam 12,16% (n=9) dos indivíduos, 4,05% (n=3) de casais homossexuais e 8,11% (n=6) elementos de casais heterossexuais.

Viseu é o local de residência de 12,16% (n=9) da população, 8,11% (n=6) são elementos de casais homossexuais e 4,05% (n=3) de casais heterossexuais.

Para 12,16% (n=9) Castelo Branco foi o distrito indicado e 5,41% (n=4) indicou a Guarda, sendo que todos eles são elementos de casais heterossexuais.

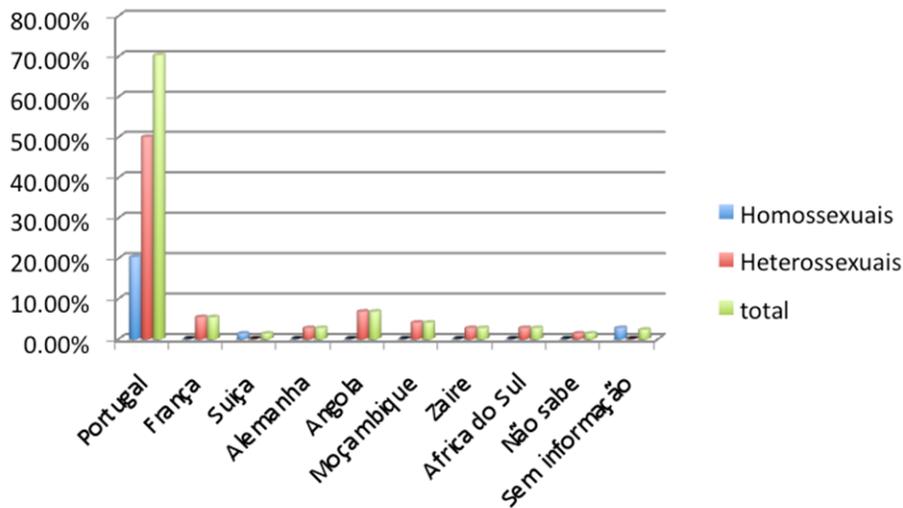
Por fim, 5,41% (n=4) residem em Santarém com 2,70% (n=2) elementos de casais heterossexuais e 2,70% (n=2) elementos de casais homossexuais, 4,05% (n=3) no Porto, todos elementos de casais heterossexuais e 1,35% (n=1) em Faro pertencente a um casal homossexual.



**Figura 4** – Distribuição dos casais segundo o local de residência.

A distribuição de acordo com o local provável de infecção (Figura 5), permitiu verificar que em 70,27% (n=52) dos elementos [20,27% (n=15) dos elementos de casais homossexuais e 50,00% (n=37) de casais heterossexuais] da nossa amostra indicavam Portugal. A França (5,41%; n=4), a Alemanha (2,70%; n=2), Angola (6,76%; n=5), o

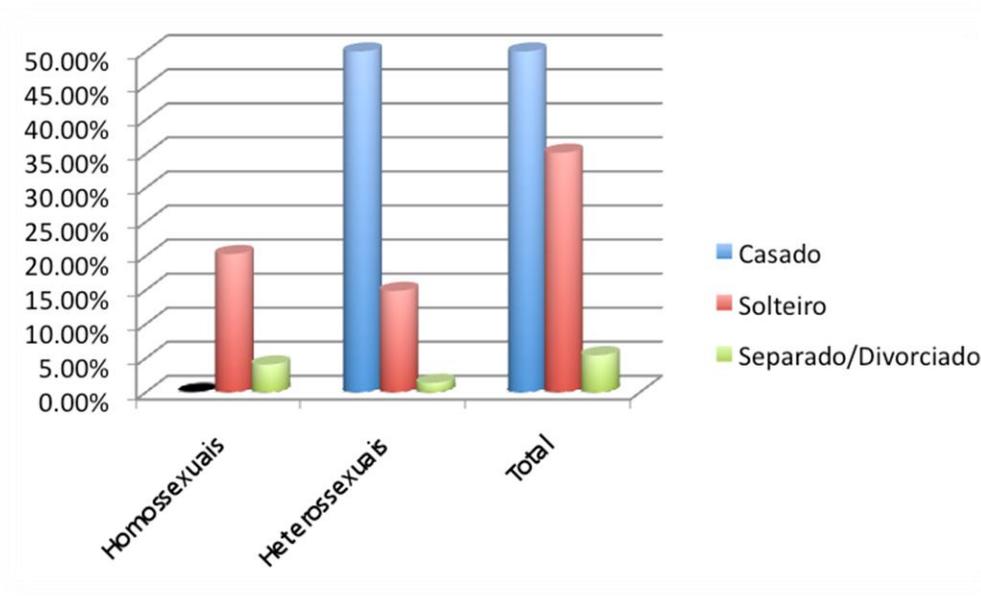
Zaire (2,70%; n=2), Moçambique (4,05%; n=3) e a África do Sul (2,70%; n=2) são referenciados como o país provável de infecção por elementos de casais heterossexuais, e 1,35% (n=1) dos indivíduos não sabe onde poderá ter ocorrido a infecção. A Suíça é indicada por 1,35% (n=1) dos indivíduos pertencentes aos casais homossexuais e em 2,70% (n=2) dos elementos não foi possível obter informação.



**Figura 5** – Distribuição consoante o país provável de infecção.

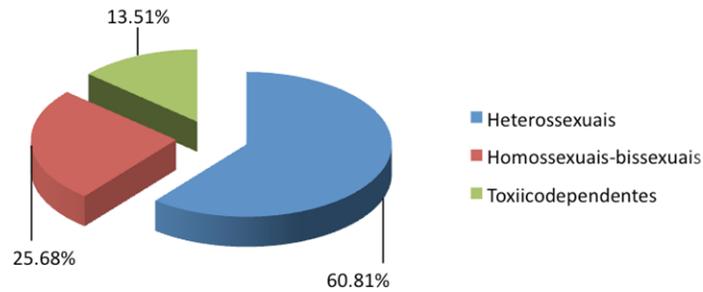
No que diz respeito ao estado civil (Figura 6), o grupo dos casados (50,00%; n=37) encontra-se constituído exclusivamente por elementos pertencentes a casais heterossexuais. Os grupos solteiro (35,14%; n=26) e divorciado/separado (5,41%; n=4) encontram-se constituídos tanto por elementos de casais homossexuais (respectivamente

20,27% (n=15) e 4,05% (n=3)) e heterossexuais (respectivamente 14,86% (n=11) e 1,35% (n=1)).



**Figura 6** – Distribuição de acordo com o estado civil e o tipo de casal.

Na distribuição de acordo com a categoria de transmissão (Figura 7) encontrámos, por ordem decrescente, a transmissão heterossexual (60,81%; n=45), a transmissão homossexual - bissexual (25,68%; n=19) e a administração de drogas endovenosas (13,51%; n=10). Dos indivíduos toxicodependentes, 12,16% (n=9) estão integrados em casais heterossexuais e 1,35% (n=1) num casal homossexual e, 2,70% (n=2) elementos da categoria homossexual - bissexual em casais heterossexuais.



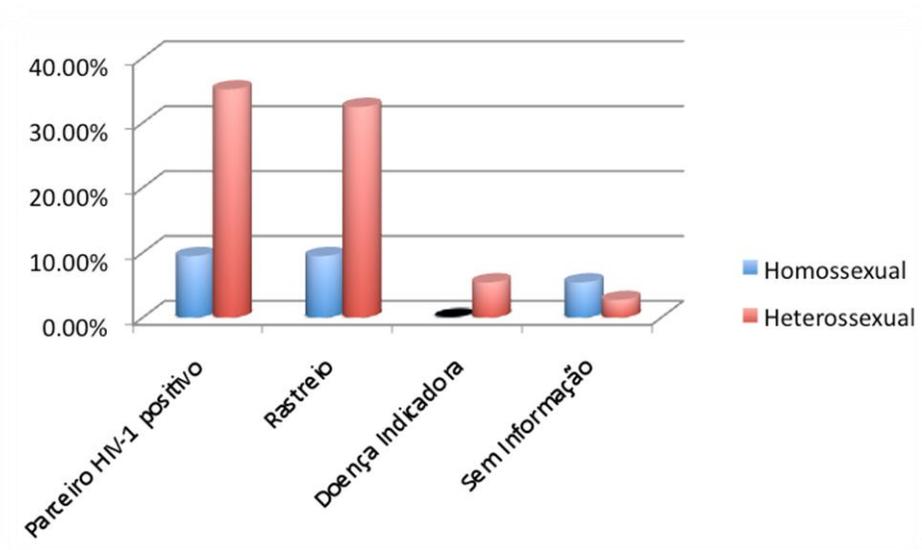
**Figura 7** – Distribuição de acordo com a categoria de transmissão.

O motivo da realização do teste (Figura 8) para 46,62% (n=33) da população estudada foi o conhecimento da seropositividade do parceiro, que ocorreu em 35,14% (n=26) dos elementos de casais heterossexuais e em 9,46% (n=7) elementos de casais homossexuais.

O rastreio da infecção HIV-1 foi apontado como motivo em 41,89% (n=31) dos casos, 32,43% (n=24) de indivíduos que pertenciam a casais heterossexuais e 9,46% (n=7) de indivíduos que pertenciam a casais homossexuais.

A existência de doença indicadora de SIDA motivou a realização do teste em 5,41% (n=4) dos casos, todos eles de casais heterossexuais.

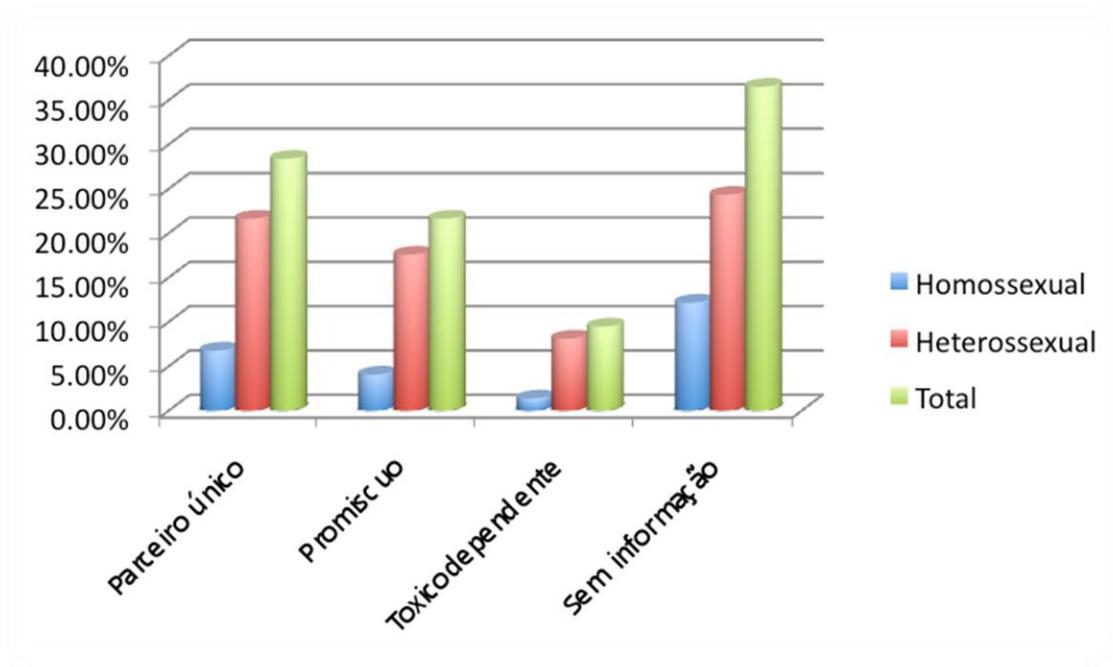
A informação não estava disponível para 8,11% (n=6) dos indivíduos, distribuídos por elementos dos casais homossexuais e heterossexuais, 5,41% (n=4) e 2,70% (n=2) respectivamente.



**Figura 8** – Distribuição de acordo com o motivo do teste.

A percepção do risco de infecção a que cada elemento se encontrava exposto (Figura 9) foi indicada por 21,62% (n=16) dos doentes que assumiam ter comportamento promíscuo contra 28,38% (n=21) que referem ter uma relação monogâmica, e 9,46% (n=7) como utilizadores de drogas intravenosas. O comportamento promíscuo foi considerado sempre que existia indicação de mais do que um parceiro sexual, quer em relações ocasionais ou

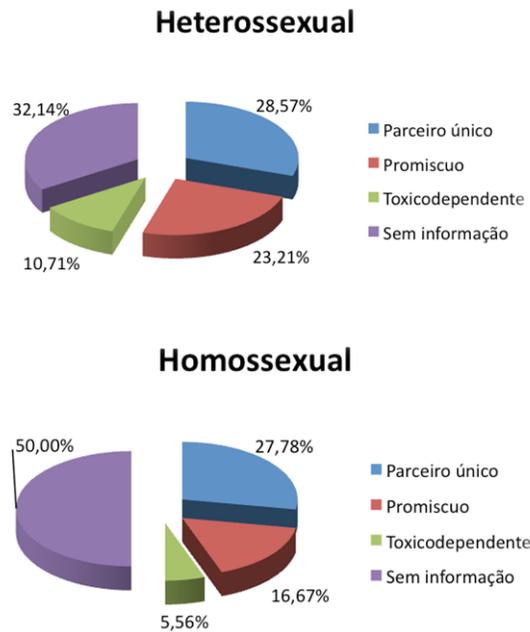
com prostitutas. Na relação monogâmica foram incluídos todos os elementos que referiam terem um único parceiro sexual.



**Figura 9** – Distribuição segundo a percepção de risco de infecção.

Dos indivíduos que declararam ter comportamentos promíscuos, 4,05% (n=3) pertenciam a casais homossexuais e 17,57% (n=13) pertenciam a casais heterossexuais. A monogamia foi indicada por 21,62% (n=16) de elementos pertencentes a casais heterossexuais e 6,76% (n=5) pertencentes a casais homossexuais. A toxicodependência foi declarada em 1,36% (n=1) e 8,11% (n=6) de indivíduos pertencentes a casais homossexuais e heterossexuais, respectivamente. Esta informação não foi possível obter

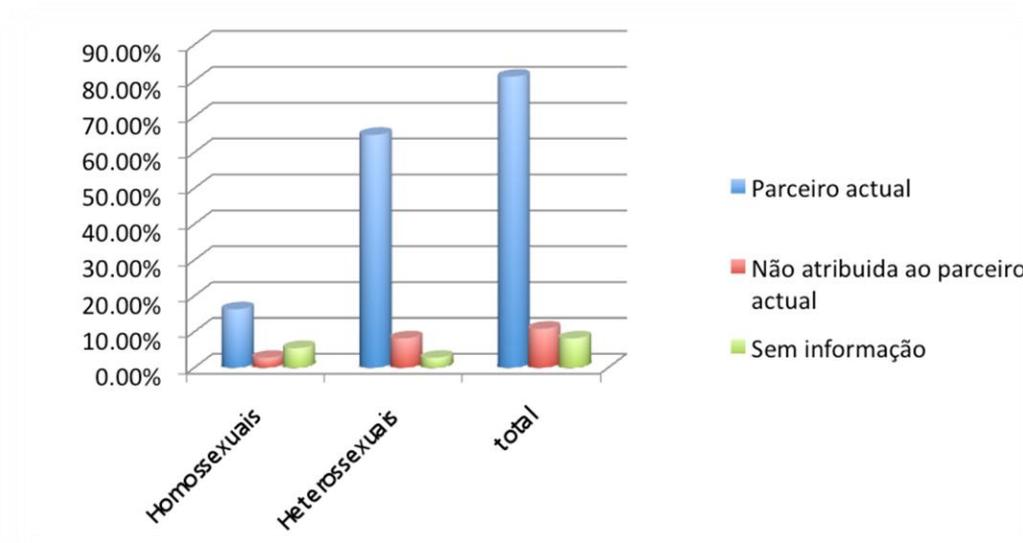
para 36,49% (n=27) da nossa amostra, tanto em elementos de casais (n=9; 12,16%) homossexuais como de casais heterossexuais (n=18; 24,32%).



**Figura 10** – Distribuição segundo a percepção de risco de infecção de acordo com o tipo de casal.

Analisando esta distribuição dentro dos grupos definidos, casais homossexuais e heterossexuais, verificamos que a promiscuidade foi o comportamento com maior prevalência em ambos os grupos, 23,21% (n=13) nos heterossexuais e 16,67% (n=3) nos homossexuais. A prevalência da relação monogâmica é muito próxima em ambos os grupos, 28,57% (n=16) nos heterossexuais contra 27,78% (n=5) nos homossexuais. No que se refere à toxicoddependência, a prevalência é de 10,71% (n=6) nos heterossexuais e

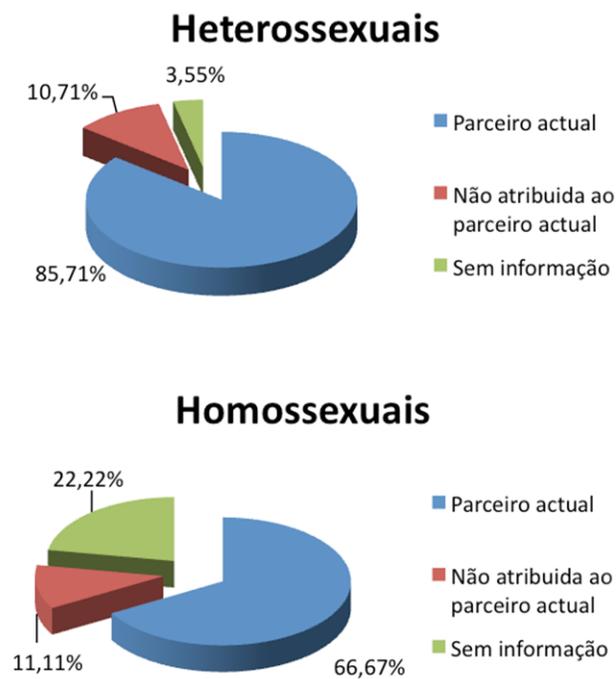
5,56% (n=1) nos homossexuais. Para 32,14% (n=18) dos heterossexuais e 50,00% (n=9) dos homossexuais não se obteve esta informação (Figura 10).



**Figura 11** – Percepção sobre a transmissão da infecção do HIV-1.

Foi possível observar que para a maioria dos 37 casais (81,08%; n=30), a percepção sobre o elemento infectante recaía sobre o parceiro actual. Destes, 16,22% (n=6) pertenciam a casais homossexuais e 64,86% (n=24) a casais heterossexuais. Apenas 10,81% (n=4) elementos (2,70% (n=1) do grupo dos casais homossexuais e 8,11% (n=3) dos heterossexuais) não atribuíram a infecção pelo HIV-1 ao seu parceiro actual. Esta informação não foi possível obter para 8,11% (n=3) dos casais (5,41% (n=2) homossexuais e 2,70% (n=1) heterossexual) (Figura11).

De uma forma mais dirigida temos, de acordo com o grupo a que pertencem, que em 85,71% (n=24) dos casais heterossexuais e 66,67% (n=6) dos casais homossexuais, a responsabilidade da infecção é atribuída ao parceiro actual, e que apenas 10,71% (n=3) dos casais heterossexuais e 11,11% (n=1) dos casais homossexuais não indicam o parceiro actual como responsável. A informação não foi obtida para 3,55% (n=1) e 22,22% (n=2) dos casais heterossexuais e homossexuais respectivamente (Figura 12).



**Figura 12** - Distribuição segundo a percepção sobre a transmissão da infecção do HIV-1 de acordo com o tipo de casal.

Não foi encontrada uma relação estatística significativa entre a percepção sobre a transmissão da infecção do HIV-1 e o tipo de casal ( $\chi^2 = 0,054$ ;  $p = 0,82$ ). Isto é, a população heterossexual e a população homossexual são estatisticamente compatíveis.

### **Avaliação das mutações de resistência:**

O intervalo médio entre o diagnóstico da seropositividade para o HIV-1 e a amostra utilizada é de 1,87 anos, sendo que 74,32% (n=55) são amostras naïve, 22,97% (n=17) são amostras recolhidas após ter sido iniciado o tratamento anti-retrovírico e 2,70% (n=2) amostras onde esta informação não foi obtida.

Na tabela 2, encontram-se descritos os polimorfismos naturais e as mutações de resistência à terapêutica anti-retrovírica, para os inibidores da protease e da transcriptase inversa, identificadas para todas as amostras de acordo com os critérios anteriormente referidos.

Todos os casais se encontram identificados por um número de ordem e por duas letras de acordo com o sexo a que pertencem (M e m para os elementos do sexo masculino, e F para os elementos do sexo feminino). Os elementos que formam um casal possuem o mesmo número. As mutações de resistência encontram-se a negrito.

**Tabela 2** - Polimorfismos naturais e mutações de resistência identificados.

| Doente | Ano amostra | Ano Diagnóstico   | Tratamento Anti-retrovirico | Mutações de resistência                                    |                                   |
|--------|-------------|-------------------|-----------------------------|--|-----------------------------------|
|        |             |                   |                             | PR   | RT                                |
| 1 F    | 1997        | 1994              | naïf                        | E35D,M36I,D60E,L63T,V82I,L89M                              | nenhuma                           |
| 1M     | 1997        | 1994              | SIM                         | E35D,M36I,L63T,V82I,L89M                                   | <b>T215F</b>                      |
| 2F     | 2000        | 2000              | naïf                        | I13V,K20I,M36I,H69K,L89M                                   | nenhuma                           |
| 2M     | 2000        | s.i. <sup>a</sup> | s.I. <sup>a</sup>           | I13V,K20I,M36I,H69R,L89M                                   | nenhuma                           |
| 3F     | 2001        | 2001              | naïf                        | M36I,H69K,L89M,I93L  | nenhuma                           |
| 3M     | 2001        | 1991              | naïf                        | E35D,M36I,H69K,L89M,I93L                                   | nenhuma                           |
| 4F     | 2001        | 2001              | SIM                         | I62V,I64V  | <b>L210W</b>                      |
| 4M     | 2001        | 1994              | naïf                        | E34D,M36I,I62V,I64V  | nenhuma                           |
| 5F     | 2000        | 2000              | naïf                        | E35N,M36I,H69K,L89M  | nenhuma                           |
| 5M     | 2000        | 2000              | naïf                        | I13V,K20I,E35D,M36I,I64M,M69K,L89M                         | nenhuma                           |
| 6F     | 2001        | 2001              | naïf                        | E35D,L63P  | nenhuma                           |
| 6M     | 2000        | 2000              | naïf                        | E35D,L63P  | nenhuma                           |
| 7F     | 1998        | 1998              | naïf                        | I13V,K20I,E35K,M36I,I64M,H69K,V82I,L89M                    | nenhuma                           |
| 7M     | 1998        | 1998              | naïf                        | I13X,G16X,K20I,M36I,I64M,H69K,V82I,L89M                    | nenhuma                           |
| 8F     | 1998        | 1998              | naïf                        | G16E,E35D,I62V,V77I,I93L                                   | nenhuma                           |
| 8M     | 1998        | 1998              | naïf                        | G16E,E35D,I62V,V77I,I93L                                   | nenhuma                           |
| 9F     | 1999        | 1994              | SIM                         | I13V,E35D,L63P   | <b>M184V</b>                      |
| 9M     | 1997        | 1996              | naïf                        | K20R,E35D,M36I,L63P,H69K,V82I,L89M                         | nenhuma                           |
| 10F    | 1999        | 1998              | naïf                        | I64V,H69Y,V77I   | nenhuma                           |
| 10M    | 1998        | 1998              | naïf                        | I64V,H69Y,V77I   | nenhuma                           |
| 11F    | 1997        | 1997              | naïf                        | L10V,I13V,G16E,E35D,M36I,L63T,L89M                         | nenhuma                           |
| 11M    | 1998        | 1997              | naïf                        | L10V,I13V,G16E,E35D,M36I,L63T,L89M                         | nenhuma                           |
| 12F    | 1997        | 1997              | naïf                        | G16E   | <b>M41L,T215Y</b>                 |
| 12M    | 2002        | 1996              | SIM                         | G16E   | <b>M41L,T215Y</b>                 |
| 13F    | 1997        | 1988              | naïf                        | I13V   | nenhuma                           |
| 13M    | 1997        | S.I.              | SIM                         | I64P,V77IV   | <b>M41L,M184V,L210W,T215Y</b>     |
| 14F    | 2001        | 1996              | SIM                         | V77I,I93L  | <b>M184V,V108I,Y181C</b>          |
| 14M    | 2001        | 1996              | SIM                         | V77I,I93L  | <b>M184V,Y181C</b>                |
| 15F    | 2000        | 2000              | naïf                        | L10I,L63P,A71V, <b>G73S</b> ,V77I, <b>L90M</b> ,I93L       | <b>L210W,T215Y,Y188L</b>          |
| 15M    | 1997        | 1993              | SIM                         | L63P,V77I,I93L   | <b>T215Y</b>                      |
| 16M    | 1999        | 1999              | naïf                        | M36I,I64V  | nenhuma                           |
| 16m    | 1999        | 1995              | SIM                         | L10F,A71V, <b>G73S,L90M</b>                                | <b>D67N,K70R,M184V,K219Q</b>      |
| 17F    | 2000        | S.I.              | naïf                        | D60E,I64V,I93L   | nenhuma                           |
| 17M    | 1999        | 1999              | naïf                        | I64V,I93L  | nenhuma                           |
| 18F    | 1997        | 1996              | naïf                        | I13V,K20I,E35D,M36I,H69K,V82I,L89M                         | nenhuma                           |
| 18M    | 1997        | 1995              | SIM                         | L10I,I13V,K20I,E35D,M36I,H69K,V82I,L89M                    | <b>M41L,D67N,K70R,M184V,K219Q</b> |
| 19F    | 2003        | 1996              | SIM                         | L10I,K20T,E35D,M36I,I62V,L63T,L74A, <b>N88S</b> ,L89M,I93L | <b>K65R,M184V</b>                 |
| 19M    | 2002        | 1997              | SIM                         | L10I,E35D,M36I,L63T,L89M,I93L                              | nenhuma                           |
| 20F    | 1997        | 1995              | naïf                        | M36I   | nenhuma                           |
| 20M    | 1997        | 1994              | naïf                        | M36I,L63S,I64V   | <b>K70R</b>                       |
| 21F    | 1997        | 1996              | naïf                        | E35D,L63P,I93L   | nenhuma                           |
| 21M    | 1997        | 1996              | SIM                         | E35D,L63P,I93L   | <b>M184V</b>                      |
| 22M    | 1999        | 1999              | naïf                        | M36I   | nenhuma                           |
| 22m    | 1999        | 1992              | naïf                        | M36I   | nenhuma                           |
| 23M    | 1997        | 1997              | naïf                        | M36I,L63S,I64V   | nenhuma                           |
| 23m    | 1999        | 1999              | naïf                        | M36I,L63S,I64V   | nenhuma                           |
| 24M    | 1999        | 1999              | naïf                        | L10I,I62V,L63S,V77I,I93L                                   | nenhuma                           |
| 24m    | 1998        | 1993              | SIM                         | L10I,I62V,L63S,V77I,I93L                                   | nenhuma                           |

|     |      |                   |                   |                                    |                    |
|-----|------|-------------------|-------------------|------------------------------------|--------------------|
| 25M | 2000 | 1991              | naíf              | L10I,L63P,V77I,I93L                | nenhuma            |
| 25m | 1997 | 1992              | SIM               | I13V,A71T                          | nenhuma            |
| 26M | 1999 | 1999              | naíf              | E35D,I62V                          | nenhuma            |
| 26m | 2000 | 1995              | naíf              | L10V,I13IV,I64IV                   | nenhuma            |
| 27M | 1997 | 1997              | naíf              | L10I,E35D,M36I,L63P                | nenhuma            |
| 27m | 1998 | 1998              | naíf              | L10I,E35D,M36I,L63P                | nenhuma            |
| 28M | 1997 | 1994              | SIM               | M36I,L63S,I64V                     | <b>K70R</b>        |
| 28m | 1997 | 1995              | SIM               | L10,E35D,I93L                      | <b>L210W,T215Y</b> |
| 29F | 2008 | 2008              | naíf              | I13V,K20I,E35D,M36I,H69K,V82I,L89M | nenhuma            |
| 29M | 2008 | 2008              | naíf              | I13V,K20I,E35D,M36I,H69K,V82I,L89M | nenhuma            |
| 30F | 1997 | 1997              | naíf              | M36L,L63T,I64M,H69K,L89M,I93L      | nenhuma            |
| 30M | 1997 | 1990              | naíf              | M36L,L63T,I64M,H69K,L89M,I93L      | nenhuma            |
| 31M | 1997 | 1997              | naíf              | L10I,,I64V,A71T,V77I,I93L          | nenhuma            |
| 31F | 1997 | 1997              | naíf              | M36I,L63H,V77I,I93L                | nenhuma            |
| 32F | 2003 | 2003              | naíf              | G16E,E35D,M36I,H69K,89M            | nenhuma            |
| 32M | 2003 | 2003              | naíf              | G16E,E35D,M36I,H69K,89M            | nenhuma            |
| 33F | 2009 | 2009              | naíf              | M36I,L63S,H69K,L89M,I93L           | nenhuma            |
| 33M | 2009 | 2009              | naíf              | M36I,L63P,H69K,L89M,I93L           | nenhuma            |
| 34F | 2008 | s.i. <sup>a</sup> | s.i. <sup>a</sup> | L10I,E35D,I62V,L63P,V77I,I93L      | nenhuma            |
| 34M | 2008 | 2008              | naíf              | L10I,E35D,I62V,L63P,V77I,I93L      | nenhuma            |
| 35M | 2004 | 2004              | naíf              | K20M,E35I,M36V,K43R,H69K,L89M,I93L | nenhuma            |
| 35F | 2004 | 2004              | naíf              | K20M,E35I,M36V,K43R,H69K,L89M,I93L | nenhuma            |
| 36F | 1999 | 1999              | naíf              | E35D,M36I,D60E,H69K,L89M,I93L      | nenhuma            |
| 36M | 1999 | 1999              | naíf              | E35D,M36I,D60E,H69K,L89M,I93L      | nenhuma            |
| 37M | 2002 | 1998              | naíf              | I64V,I93L                          | nenhuma            |
| 37m | 2002 | 1999              | naíf              | I64V,I93L                          | nenhuma            |

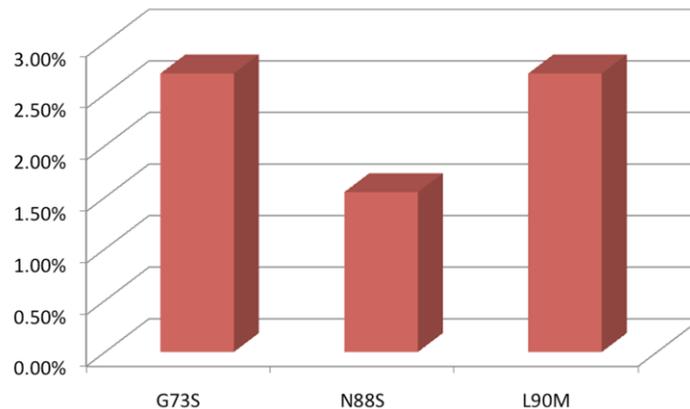
<sup>a</sup> s.i. - não foi obtida informação

PR – Protease

RT – Transcriptase inversa

Foram detectadas 3 mutações de resistência (Figura 13) e 18 polimorfismos naturais diferentes (Figura 14) a nível do segmento da protease do gene *pol*.

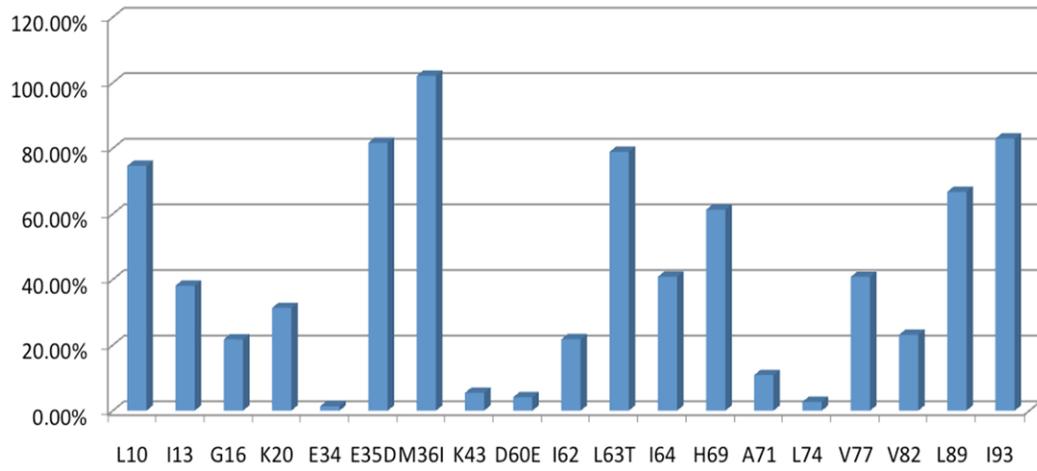
As mutações apresentam a seguinte prevalência G73S (2,70%; n=2), L90M (2,70%; n=2) e N88S (1,35%;n=1).



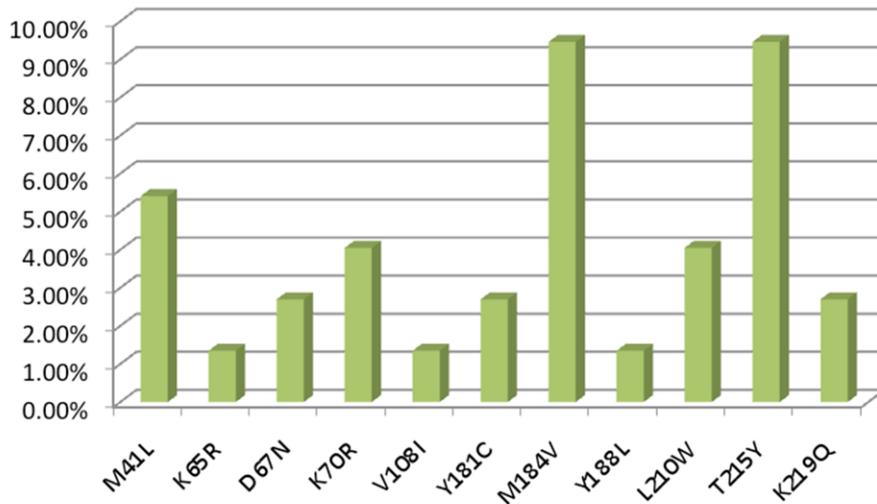
**Figura 13** – Prevalência das mutações de resistência no segmento da protease.

Os polimorfismos encontrados distribuem-se nas posições e prevalências seguintes: L10 (24,32%; n=8), I13 (21,62%; n=16), G16 (10,81%; n=8), K20 (18,92%; n=14), E34 (1,35%; n=1), E35 (45,95%; n=34), M36 (58,11%;n=43), K43 (2,70%; n=2), D60 (2,70%; n=2), I62 (12,16%; n=9), L63 (41,89%; n=31), I64 (22,97%; n=17), H69 (35,14%; n=26), A71 (5,41%; n=4), L74 (1,35%; n=1), V77 (20,27%; n=15), V82 (13,51%; n=10), L89 (39,19%; n=29), e I93 (41,89%; n=31).

No segmento da transcriptase inversa do gene *pol* foram encontradas 11 mutações distintas (Figura 15): M41L (5,41%; n=4), K65R (1,35%; n=1), D67N (2,70%; n=2), K70R (4,05%; n=3), V108I (1,35%; n=1), Y181C (2,70%; n=2), M184V (9,46%; n=7) , Y188L (1,35%; n=1), L210W (4,05%; n=3), T215YF (9,46%; n=7) e K219Q (2,70%; n=2).



**Figura 14** – Prevalência dos polimorfismos naturais.



**Figura 15** – Prevalência das mutações de resistência no segmento da transcriptase inversa.

Verificou-se que na população estudada 22,97% (n=17) das sequências apresentavam mutações de resistência, 19,44% (n=14) pertenciam a indivíduos que estavam em tratamento anti-retrovírico, as restantes 4,05% (n=3) foram encontradas em indivíduos naïve a estes fármacos (Tabela 3). Tendo sido encontrada uma associação estatística altamente significativa ( $\chi^2 = 42,58$ ;  $p = 0$ ) entre a presença de mutações de resistência e tratamento anti-retrovírico.

**Tabela 3** – Relação entre a presença de mutações de resistência e tratamento anti-retrovírico.

|                  | Naïve | Com experiência | Sem informação | Total |
|------------------|-------|-----------------|----------------|-------|
| Sem resistências | 52    | 3               | 2              | 57    |
| Com resistências | 3     | 14              | 0              | 17    |

Nos 14 doentes infectados com estirpes do HIV-1, com experiência anti-retrovírica e portadores de mutações de resistência, verificou-se que todos os padrões de resistência dos inibidores da transcriptase inversa, análogos e não análogos dos nucleosídeos, apresentados, estavam de acordo com a terapêutica a que estavam sujeitos (Tabela 4). Também para os 2 doentes, em que foram encontradas mutações de resistência aos inibidores da protease, verificou-se que os padrões encontrados eram explicados pelos fármacos a que estavam sujeitos (Tabela 4).

**Tabela 4** - Padrões de resistência encontrados nos doentes sujeitos a terapêutica anti-retrovírica.

| Fármaco  | Mutações de resistência |                                   |
|--|-------------------------|-----------------------------------|
|  | PR                      | RT                                |
| Zidovudina                                       |                         | T215F                             |
| Zidovudina, Lamivudina, Nelfinavir               |                         | L210W                             |
| Zidovudina, Didanosina, Lamivudina, Indinavir    |                         | M184V                             |
| Zidovudina, Didanosina                           |                         | M41L, T215Y                       |
| Zidovudina                                       |                         | M41L, M184V, L210W, T215Y         |
| Estavudina, Didanosina<br>Nevirapina             |                         | M184V, V108I, Y181C               |
| Estavudina, Didanosina<br>Nevirapina             |                         | M184V, Y181C                      |
| Zidovudina, Didanosina                           |                         | T215Y                             |
| Estavudina, Lamivudina<br>Nelfinavir             | G73S, L90M              | D67N, K70R, M184V, K219Q          |
| Zidovudina, Lamivudina,<br>Saquinavir            |                         | M41L, D67N, K70R, K219Q,<br>M184V |
| Zidovudina, Lamivudina,<br>Estavudina, Indinavir | N88S                    | K65R, M184V                       |
| Didanosina                                       |                         | M184V                             |
| Zidovudina                                       |                         | K70R                              |
| Zidovudina, Didanosina                           |                         | L210W, T215Y                      |

Assim, as diferentes mutações associadas com resistência aos inibidores da transcriptase inversa análogos dos nucleosídeos, que foram encontradas, foram seleccionadas pelos fármacos da seguinte forma: M41L, L210W, T210W, T215F/Y seleccionadas pela

Zidovudina; D67N, K70R, K219Q seleccionadas pela Zidovudina e Estavudina; K65R, M184V seleccionadas pela Didanosina e Lamivudina. As resistências aos inibidores da transcriptase inversa não análogos aos nucleosídeos V108I e Y181C foram seleccionadas pela Nevirapina. Em relação às resistências aos inibidores da protease, a L90M e G73S foram seleccionadas pelo Nelfinavir, e a N88S é seleccionada pelo Indinavir.

Dos dados obtidos podemos observar que as mutações de resistência se encontram distribuídas pelos casais 1, 4, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 e 28 que constituem 35,14% (n=13) da nossa população.

Nos casais 14, 19 e 28 ambos os elementos do casal se encontram em tratamento anti-retrovírico (8,11%; n=3). Em 21,62% (n=9) apenas 1 dos elementos se encontra em tratamento (casal 1, 4, 9, 12, 13, 15, 16, 18 e 21), e em um elemento do casal 20 (2,70%; n=1) sem experiência a estes fármacos.

Dos 21,62% (n=9) casais, onde apenas 1 elemento se encontra sujeito a tratamento, 18,92% (n=7) apresentavam mutações de resistência apenas nesse elemento (1M, 4F, 9F, 13M, 16m, 18M e 21M), e em 5,41% (n=2) casais as mutações de resistência estavam presentes nos 2 elementos (12F e 12M; 15F e 15M).

### **Avaliação dos subtipos genéticos e ligação epidemiológica:**

Para a análise da relação entre as sequências obtidas dos doentes estudados, foram elaboradas 2 árvores filogenéticas distintas, uma representativa dos casais de heterossexuais (Figura 16) e a outra dos casais homossexuais masculinos (Figura 17).

A partir da topologia das árvores foi possível identificar 26 “clusters”, 23 casais heterossexuais e 3 casais homossexuais, com ligação epidemiológica. Os clusters foram considerados como altamente suspeitos para uma verdadeira ligação quando cumpriam as seguintes condições: valores de “bootstrap” superior ou igual a 80% e uma distância genética (isto é, tamanho do ramo) inferior a 0,01 substituições de nucleotídeos por local no respectivo “cluster”. Dos 26 pares encontrados, 23 pares heterossexuais e 3 pares homossexuais cumpriam inteiramente estes requisitos, tendo sido considerados como altamente suspeitos da existência de um elo de transmissão entre os seus elementos.

Ao analisarmos a árvore dos casais homossexuais, verificou-se a existência de um “cluster” composto por 3 indivíduos.

O casal 27 não se encontra representado na árvore filogenética. Este facto deveu-se a que, na análise filogenética realizada, a utilização da sequência do elemento 27m no alinhamento inicial, pelo facto de se encontrar segmentada, levou à introdução de um grande número de “gaps”, indicando uma não homologia desta sequência com as restantes, o que nos levou a optar pela sua eliminação do alinhamento final, em conjunto com a sequência do seu par 27M.

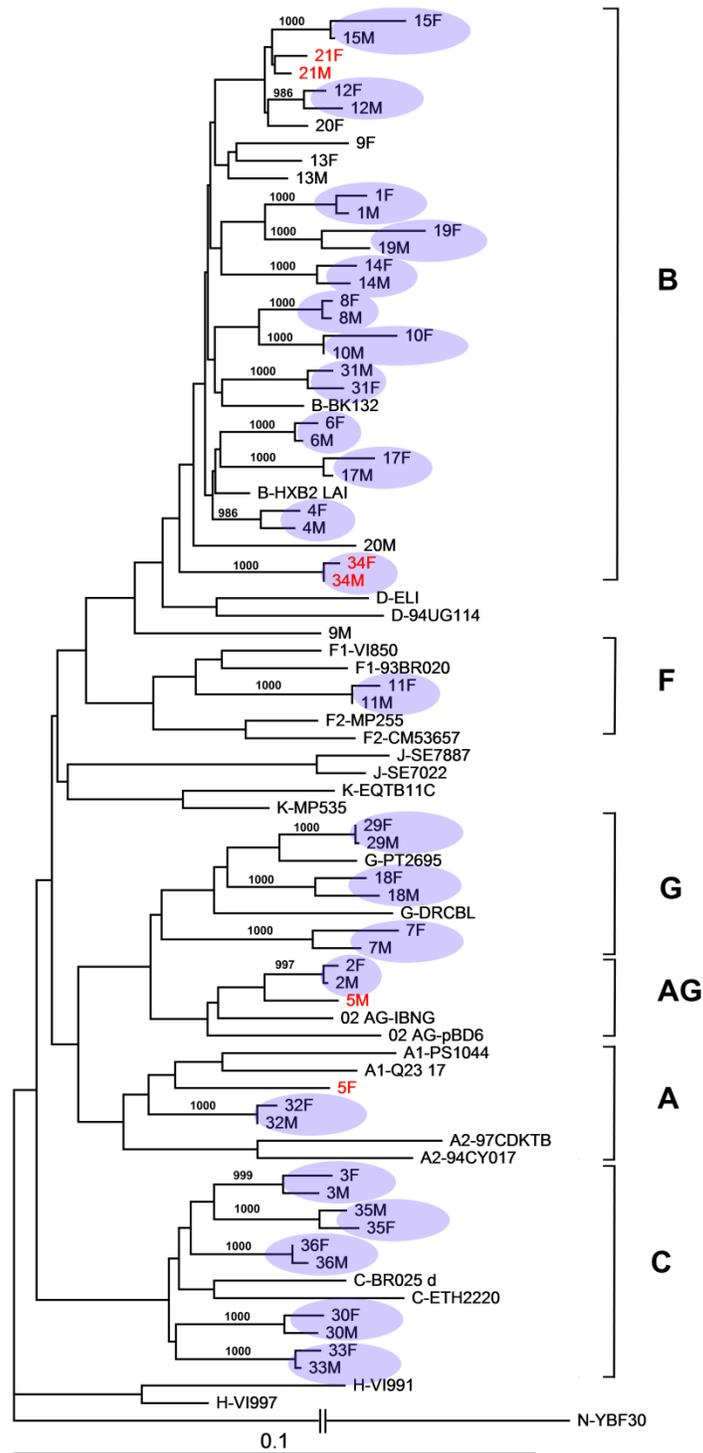


Figura 16

**Figura 16** - Árvore filogenética construída a partir de sequências de um segmento do gene *pol*, pertencentes a casais heterossexuais infectados com HIV-1. Os ramos horizontais foram desenhados à escala (a barra indicadora de escala corresponde a 0.1 substituições de nucleotídeos por local) indicando a distância genética média; a separação vertical é exclusivamente para melhor visualização. Os valores de “bootstrap” encontram-se representados à direita do respectivo “cluster”, sempre que tenham um valor superior a 80%. Os vírus dos casais que se encontram relacionados e que formam clusters com valores de “bootstrap” significativos, indicando que estão epidemiologicamente relacionados encontram-se dentro de um círculo. Os vírus dos casais cujos dados epidemiológicos não se confirmam estão indicados com a cor vermelha.

**Figura 17** - Árvore filogenética construída a partir de sequências de um segmento do gene *pol*, pertencentes a casais homossexuais infectados com HIV-1. Os ramos horizontais foram desenhados à escala (a barra indicadora de escala corresponde a 0.1 substituições de nucleotídeos por local) indicando a distância genética média; a separação vertical é exclusivamente para melhor visualização. Os valores de “bootstrap” encontram-se representados à direita do respectivo cluster, sempre que tenham um valor superior a 80%. Os vírus dos casais que se encontram relacionados e que formam clusters com valores de “bootstrap” significativos, indicando que estão epidemiologicamente relacionados encontram-se dentro de um círculo. Os vírus dos casais cujos dados epidemiológicos não se confirmam estão indicados com a cor vermelha. O casal 27 não se encontra representado na árvore filogenética, as suas sequências foram removidas na construção da árvore.

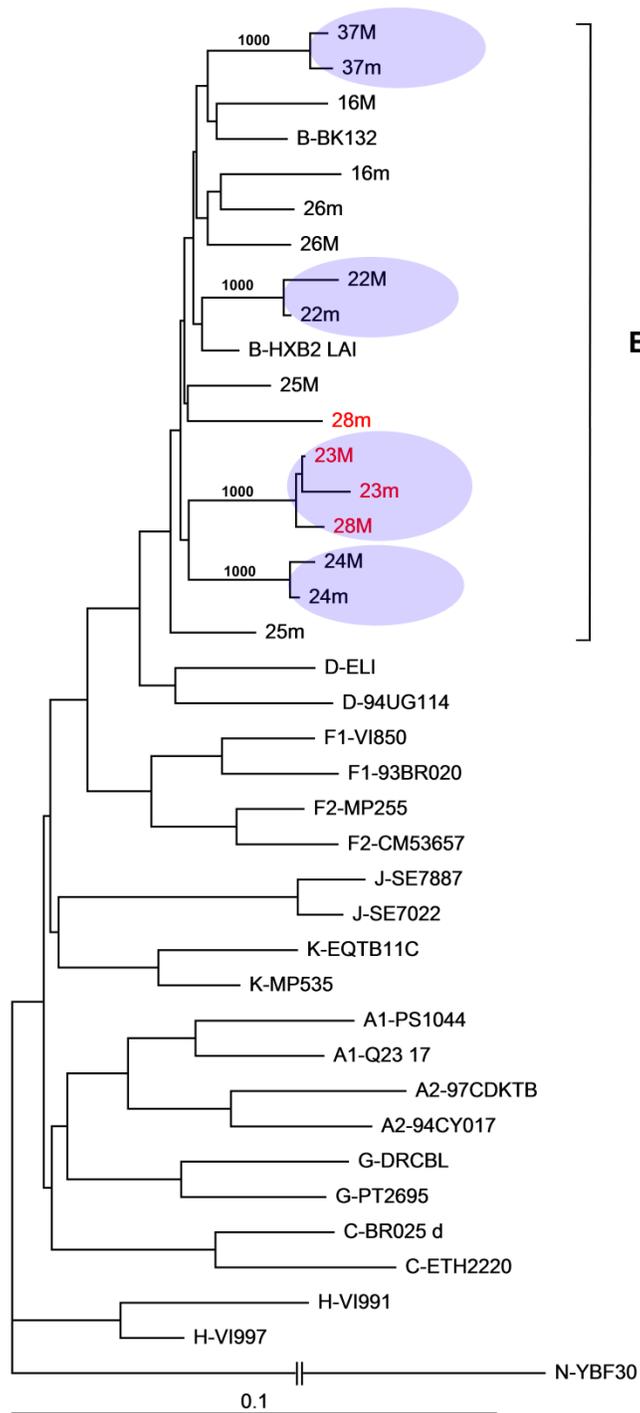


Figura 17

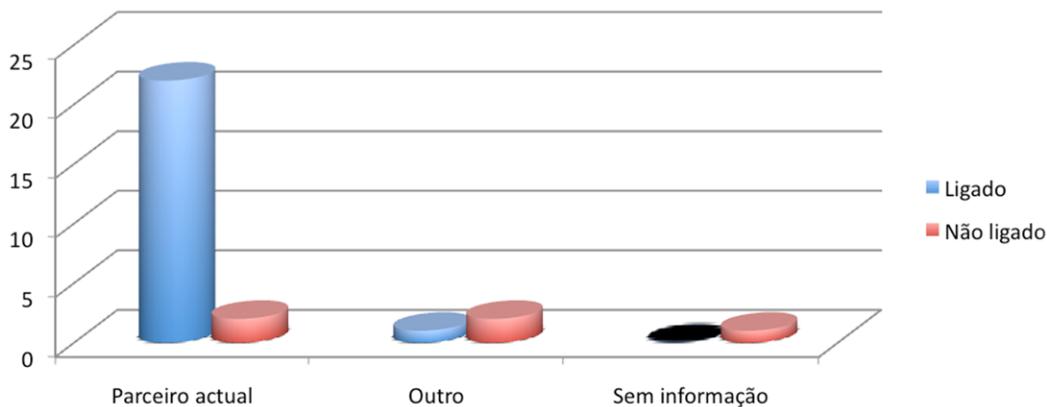
Quando comparados os resultados obtidos para os 37 casais da análise filogenética, onde se estabeleceu a existência de ligação epidemiologia em 70,27% (n=26) dos casais, com os dados apresentados anteriormente onde 81,08% (n=30) dos casais indicavam o parceiro actual como o responsável pela transmissão do HIV-1 (Tabela 5), verificámos que destes pares suspeitos apenas foram confirmadas 67,57% (n=25) ligações de transmissão. Em 10,82% (n=4) dos casais a ligação epidemiologia não foi suportada pela análise filogenética, e num caso (2,70%) não foi possível testar esta hipótese. Para os 10,82% (n=4) de casais em que o parceiro actual não era responsabilizado, a ausência de ligação epidemiológica foi confirmada em 8,11% (n=3) e para 2,70% (n=1) ficou estabelecida a existência de ligação epidemiológica. Em nenhum dos 8,11% (n=3) dos casais em que não se obteve informação sobre a origem da infecção ficou estabelecido uma ligação epidemiológica.

**Tabela 5** - Relação entre a existência de ligação epidemiológica e a percepção de cada casal.

|                 | Percepção       |              |                |
|-----------------|-----------------|--------------|----------------|
|                 | Parceiro actual | Outro motivo | Sem informação |
| Ligado          | 25              | 1            | 0              |
| Não ligado      | 4               | 3            | 3              |
| Não determinado | 1               | 0            | 0              |

Nos 28 (100%) casais heterossexuais, 85,71% (n=24) eram suspeitos de ligação epidemiológica mas destes apenas se confirmaram 78,57% (n=22) como verdadeiras. A indicação de ausência de ligação foi confirmada em 7,14% (n=2) dos casais e em 3,57% (n=1) não foi estabelecida a existência de ligação epidemiológica (Figura 18).

Tendo sido observada, para este grupo, a existência de uma associação estatística significativa ( $\chi^2 = 7,19$ ;  $p = 0,07$ ) entre a percepção do parceiro como elemento transmissor do HIV-1 e a ligação filogenética.

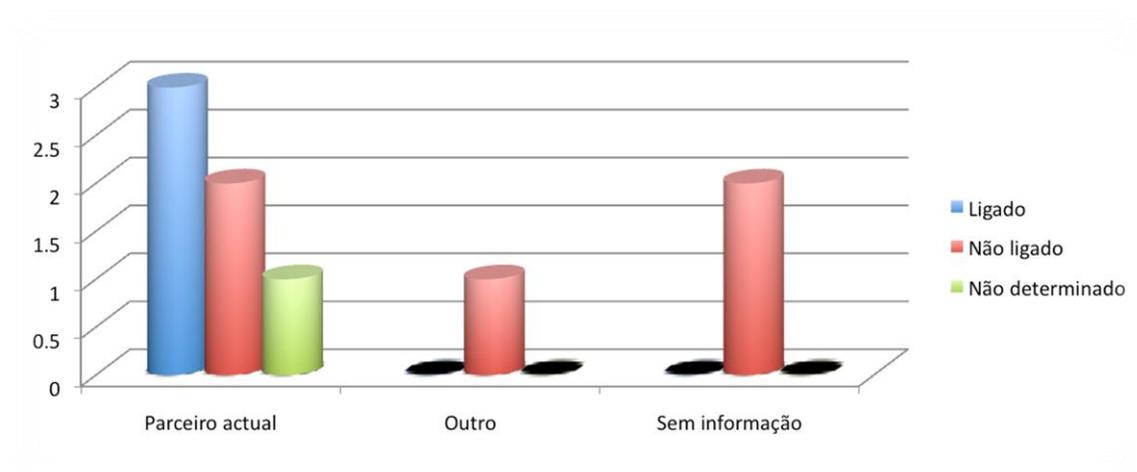


**Figura 18** – Gráfico comparativo entre presunção e a confirmação de existência de uma ligação epidemiológica em os elementos dos casais heterossexuais.

Para os casais homossexuais, dos 6 casais suspeitos de ligação epidemiológica, foram confirmados 33,33% (n=3), 22,22% (n=2) não revelaram ligação entre si e em 11,11%

(n=1) não foi possível testar esta hipótese. A ausência de ligação epidemiológica foi confirmada em 11,11% (n=1) destes casais onde esta hipótese era excluída e em 22,22% (n=2) casais sobre os quais não se obteve informação (Figura 19).

Não observámos uma associação estatística ( $\chi^2 = 1,2$ ;  $p = 0,27$ ) entre a percepção do parceiro como elemento transmissor do HIV-1 e a ligação filogenética. Com os dados obtidos também não podemos excluir a possibilidade de estas serem independentes.

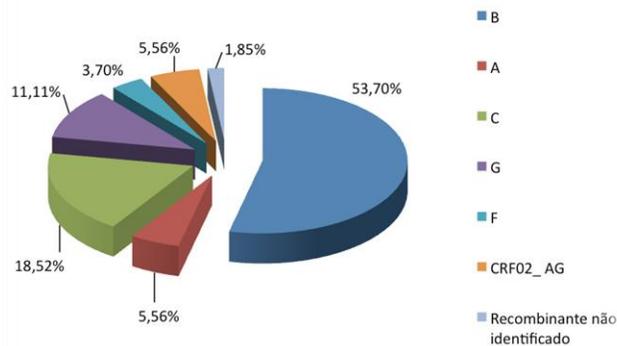


**Figura 19** – Gráfico comparativo entre presunção e a confirmação de existência de uma ligação epidemiológica em os elementos dos casais homossexuais.

A análise das árvores filogenéticas indica a existência de uma grande variedade de formas genéticas do HIV-1 (Figuras 16 e 17). O subtipo B foi encontrado em 63,51% (n=47), o subtipo A em 4,05% (n=3), o subtipo F em 2,70% (n=2), o subtipo G em 8,11% (n=6), o subtipo C em 13,51% (n=10), o CRF02\_AG em 4,05% (n=3), em 1,35% (n=1)

foi encontrada uma forma recombinante, e em 2,70% (n=2) não foi possível obter o subtipo.

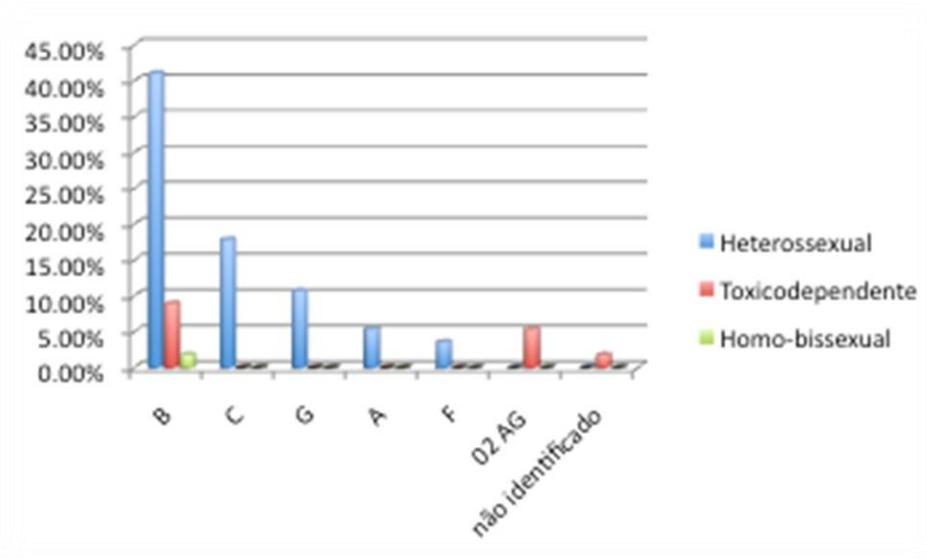
O subtipo B encontra-se em 100% dos elementos pertencentes dos casais homossexuais identificados. Nos casais heterossexuais, a prevalência dos subtipos encontra-se distribuída da seguinte forma: 53,70% (n=29) do subtipo B, 18,52% (n=10) do subtipo C, 11,11% do subtipo G (n=6), 5,56% (n=3) no subtipo A e CRF02\_AG, 3,70% (n=2) no subtipo F e uma forma recombinante não identificada (1,85%) (Figura 20).



**Figura 20** – Distribuição dos subtipos genéticos nos casais heterossexuais.

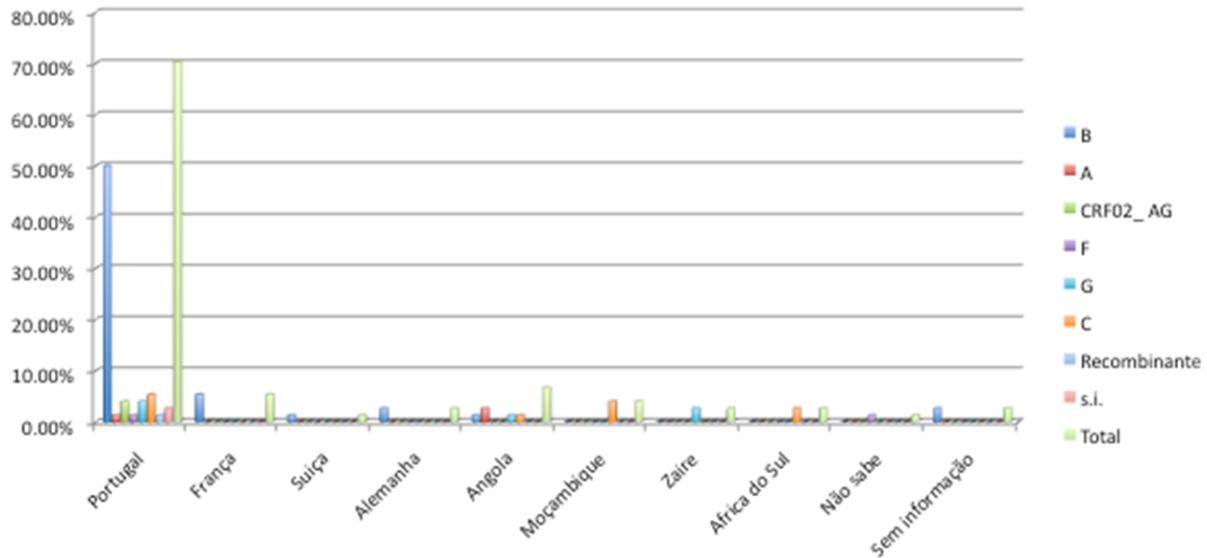
De acordo com a categoria de transmissão atribuída a cada elemento dos casais heterossexuais, o subtipo B encontrava-se distribuído pelas categorias heterossexual (41,07%; n=23), toxicodpendente (8,93%; n=5) e homo - bissexual (1,79%; n=1). Os

subtipos C (17,89%; n=10), G (10,71%; n=6), A (5,36%; n=3) e F (3,57%) foram apresentados por elementos heterossexuais, e os recombinates CRF02\_AG (5,36%; n=3) e uma forma recombinante não determinada (1,79%; n=1) por elementos toxicodependentes (Figura 21).



**Figura 21** – Distribuição dos subtipos genéticos e categoria de transmissão nos casais heterossexuais.

A análise da distribuição das formas genéticas consoante o país provável de infecção (Figura 22) permite verificar que em Portugal 50,00% (n=37) das infecções está associada ao subtipo B, 5,41% (n=4) ao subtipo C, 4,05% (n=3) ao subtipo G e ao CRF02\_AG, 1,35% (n=1) pelos subtipos A e F, e pelo recombinante, confirmando a circulação de todas estas formas genéticas no nosso país.



**Figura 22** – Distribuição do subtipo de acordo com o país de infecção.

As infecções ocorridas na França (1,35%; n=1), Suíça (1,35%; n=1) e Alemanha (2,70%; n=2) foram pelo subtipo B.

Nos países africanos as infecções ocorridas em Angola foram dos subtipos B, C e G (cada um com 1,35%; n=1), do subtipo A (2,70%; n=2), em Moçambique (4,05%; n=3) e na África do Sul (2,70%; n=2) as infecções encontradas foram pelo subtipo C e por último, no Zaire pelo subtipo G (2,70%).

Para 4,05% (n=3) dos indivíduos não foi possível identificar o país para a infecção. Destes, 1,35% (n=1) alegaram o desconhecimento (correspondente a uma infecção por

subtipo F), e em 2,70% (n=2) a informação não estava disponível (correspondente a infecções pelo subtipo B).

## V - Discussão dos Resultados

A população estudada, constituída por 74 indivíduos portadores do HIV-1, inscritos no Departamento de Doenças Infecciosas dos Hospitais da Universidade de Coimbra, formando 37 casais (28 casais heterossexuais e 9 casais homossexuais), é constituída maioritariamente por indivíduos de raça caucasiana, com idades compreendidas entre os 33 e os 74 anos, de nacionalidade portuguesa (93,29%; n=69), e residentes na zona centro de Portugal (94,59%; n=70), preferencialmente no distrito de Coimbra e Aveiro.

O país provável de infecção foi para a grande maioria da população Portugal (70,27%; n=52), embora sejam também referenciados outros países Europeus e alguns países Africanos. As infecções ocorridas em África, onde a disseminação heterossexual é predominante, foram em elementos pertencentes a casais heterossexuais.

No que respeita à categoria de transmissão, verificamos que dentro do grupo dos casais heterossexuais, embora a maioria dos elementos pertencessem à categoria de transmissão heterossexual, alguns elementos eram classificados como pertencentes às categorias homossexual-bissexual e toxicodependente de drogas intravenosas. Quase todos os elementos que formavam o grupo dos casais homossexuais pertenciam à categoria homossexual-bissexual, e de uma forma menos significativa à categoria de toxicodependente de drogas intravenosas.

Os principais motivos para a realização do teste de diagnóstico do HIV-1 foram, tanto para os casais heterossexuais como para os homossexuais, o conhecimento da seropositividade do parceiro e o rastreio.

Em relação à percepção individual sobre o risco de exposição à infecção pelo HIV-1, verificou-se que a relação monogâmica foi a mais referida, seguida pela indicação de comportamentos promíscuos e em último a toxicodependência de drogas intravenosas. Não pode no entanto ser deixado de referir que a obtenção desta informação não foi possível para um número representativo de indivíduos (50,00% dos casais homossexuais e 32,14% dos casais heterossexuais).

Numa análise mais dirigida para o casal, observa-se que o parceiro é apontado como o responsável pela infecção do HIV-1 em 24 (85,71%) dos 28 casais heterossexuais e em 6 (66,66%) dos 9 casais homossexuais. Os restantes elementos, 3 casais heterossexuais e 1 homossexual, não atribuíam a infecção ao parceiro actual.

A observação dos dados obtidos quanto ao motivo da realização do teste de diagnóstico, e da percepção individual sobre o risco de exposição ao HIV-1, sugere que a maioria da população estudada possuía uma baixa percepção do risco de contaminação a que encontravam sujeitos.

Através dos dados epidemiológicos obtidos, foram identificados 30 casais como possíveis pares de transmissão (24 casais heterossexuais e 6 casais homossexuais).

A análise das árvores filogenéticas, uma para os casais heterossexuais e outra para os casais homossexuais, reconstruídas a partir de sequências do gene *pol*, permitiu identificar 26 pares de transmissão suportados pelos elevados valores de “bootstrap”. Assim, verificou-se que dos 81,08% (n=30) de casais indicados pelos dados epidemiológicos como sendo pares de transmissão, só foi possível a confirmação em 67,57% (n=25), onde 59,46% (n=22) são casais heterossexuais e 8,11% (n=3) são casais homossexuais. Foi também confirmada a ligação filogenética entre os elementos de um casal heterossexual (2,70%), que não tinha sido identificado como par de transmissão através dos dados epidemiológicos. Para um casal homossexual (2,70%) que tinha sido identificado como par de transmissão através dos dados epidemiológicos, não foi possível obter confirmação filogenética.

A comparação entre os dados epidemiológicos obtidos, por consulta dos processo clínicos dos doentes, e os dados obtidos por filogenia molecular, confirmou que o estabelecimento da ligação de transmissão baseada apenas na informação prestada pelo doente, pode nem sempre ser a correcta. Apesar da comparação com os dados epidemiológicos ser importante para a validação das ligações caracterizadas ao nível molecular, esta informação permanece difícil de obter, e nem sempre é prestada correctamente. Esta percentagem de discordância (22,22% entre os casais homossexuais e 10,71% entre os casais heterossexuais), observada entre os dados fornecidos epidemiologicamente e os dados obtidos por análise filogenética, poderá variar consoante

as características demográficas, étnicas e comportamentais dos elementos estudados, mas estará sempre presente <sup>(61, 69)</sup>.

Da análise do gene *pol* dos 74 doentes, foram encontrados no segmento da protease 3 mutações de resistência e uma grande variedade de polimorfismos naturais. No segmento da transcriptase inversa foram encontradas 11 mutações de resistência diferentes. Estas mutações encontravam-se distribuídas por 17 (22,97%) doentes e destes, 14 estavam sujeitos a tratamento anti-retrovírico, e 3 (4,05%) não possuíam qualquer experiência com estes fármacos. Todos os padrões de resistência encontrados em doentes em tratamento anti-retrovírico eram justificados pela terapêutica a que estavam sujeitos.

As mutações de resistência encontravam-se presentes em 13 casais (1, 4, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 e 28), destes apenas se estabeleceu ligação epidemiológica em 8 (1, 4, 12, 14, 15, 18 e 19) casais (Figura 16 e 17).

Recorrendo da análise dos padrões de resistências, apresentados pelos casais com ligação epidemiológica, foram procuradas evidências de transmissão destes vírus resistentes (Tabela 2).

Para o casal 1, 4 e 18, as mutações de resistências só se encontravam expressas no indivíduo com experiência anti-retrovírica, não tendo sido encontradas no parceiro naíf. Adicionalmente, a comparação entre a data do início do tratamento, e a data do ano de

diagnóstico da infecção do parceiro, sugere que a aquisição da mutação pode ter ocorrido posteriormente à transmissão do vírus.

Para os casais 14 e 19, uma vez que ambos os elementos possuem experiência com anti-retrovíricos, nada foi possível concluir quanto à transmissão de mutações de resistência entre os seus elementos.

Foram encontradas evidências da transmissão de mutações de vírus com resistência entre os elementos do casal 12, sendo o padrão de mutações de resistência apresentado nos dois elementos do casal, M41L e T215Y, sugestivo da transmissão de um vírus com mutações de resistência ao indivíduo naïf aos anti-retrovíricos. Para o casal 15, o padrão de resistência obtido não parece ser consistente, o indivíduo naïf (15m) apresenta as mutações de resistência L210W, T215Y e Y188L e estas não se encontram, na totalidade, no elemento em tratamento anti-retrovírico (15M) mas, ao confrontarmos as resistências apresentadas pelo elemento 15M numa amostra posterior à apresentada na tabela 2, mais próxima da data de infecção do parceiro, as alterações encontradas (no segmento da transcriptase inversa: L210W, T215Y, Y188L; no segmento da protease: L90M) são consistentes com a ocorrência da transmissão de mutações de resistência. Estes dados sugerem uma acumulação de mutações de resistência, como consequência do regime terapêutico, anterior à transmissão do vírus ao elemento 15m.

Nos casais sem ligação epidemiológica 9, 13, 16, 21 e 28, os padrões de mutações encontrados foram todos em indivíduos com experiência anti-retrovírica.

No casal 20, constituído por 2 elementos sem experiência a estes fármacos, verificou-se que 1 dos elementos (20M) possuía uma mutação de resistência no segmento da transcriptase inversa, sugerindo estarmos na presença de uma mutação de resistência que teria sido transmitida na altura da infecção pelo HIV-1.

A presença de mutações de resistência nos casais 12, 15 e 20, ilustra o potencial de propagação secundária destas estirpes resistentes, como previamente documentado <sup>(40, 70, 71, 72)</sup>, indicando a necessidade de uma monitorização constante para avaliação do seu efeito a longo termo na resposta ao tratamento anti-retrovírico.

Os polimorfismos naturais, ocorrem de forma natural na infecção do HIV-1, apresentam uma grande variabilidade nos segmentos da protease da nossa amostra. Curiosamente, verificou-se que nos casais onde se tinha estabelecido um elo de transmissão, os polimorfismos encontrados, eram bastante consistentes entre si. Esta observação requer muito cuidado na interpretação a que pode estar sujeita pois os polimorfismos, devido às suas características, não devem ser utilizados nestes estudos de transmissão.

Da análise filogenética efectuada, foi possível confirmar a existência de uma grande diversidade genética de estirpes do HIV-1, em circulação na região centro Portugal. O subtipo B foi encontrado na maioria da nossa população, mas também foram detectados

os subtipos C, G, A, F, recombinantes CRF02\_AG, e uma forma recombinante não determinada.

Ao analisarmos esta diversidade genética, consoante o país onde ocorreu a infecção, verificamos que todos os subtipos se encontravam representados nas infecções ocorridas em Portugal, encontrando-se estas observações de acordo com outros estudos já efectuados na população Portuguesa <sup>(73, 74)</sup>.

As infecções ocorridas em outros países da Europa ocidental, onde o subtipo B é prevalente, foram todas deste subtipo. E, as infecções ocorridas em países africanos, continente onde todos os subtipos do grupo M se encontram em circulação, apresentaram uma grande diversidade de subtipos (B, C, G e A), e encontram-se associadas à transmissão heterossexual.

Verificámos também que todos os elementos do grupo dos casais homossexuais pertencem ao subtipo B, que o subtipo B era maioritário nos casais heterossexuais e que a totalidade dos subtipos não-B se encontravam no grupo dos casais heterossexuais.

Esta associação entre modo de transmissão e subtipo, coincide com o que tem vindo a ser descrito, onde os subtipos circulantes exibem associações específicas com as regiões geográficas e /ou modo de transmissão. Na Europa, a epidemia entre os homossexuais e utilizadores de drogas endovenosas tem vindo a ser associada ao subtipo B, e os subtipos não-B e CRFs têm vindo a ser gradualmente introduzidos, com o aumento das transmissões heterossexuais entre imigrantes e/ou emigrantes de regiões onde o HIV-1 é endémico e os seus parceiros Europeus <sup>(21, 23, 75, 76, 77)</sup>.

A presença de um “cluster” de 3 indivíduos, na árvore dos casais homossexuais (figura 17), aponta para a possibilidade um “cluster” de transmissão. No entanto, devido à ausência de dados epidemiológicos que possam corroborar esta hipótese, dos nossos resultados não podemos excluir a possibilidade da existência de uma fonte comum para este “cluster”, em vez de um “cluster” de transmissão.

A utilização de sequências onde se verificava a presença de mutações colocou em causa a utilização do gene *pol* na análise de hipóteses de transmissão. Estas sequências possuem inevitavelmente uma certa homoplastia (convergência/evolução paralela) induzida pela selecção natural, e mesmo quando presentes em poucas posições, poderiam influenciar o resultado fornecendo um “clustering” incorrecto. No entanto, vários estudos vêm demonstrar que estes dados contêm informação filogenética suficiente para a atribuição de subtipo, e para a reconstrução de histórias de transmissão<sup>(48, 78)</sup>.

A maioria das sequências utilizadas neste estudo, foram geradas a partir de amostras plasmáticas obtidas num período médio de 1,87 anos.

A utilização de sequências com um grande intervalo de tempo, quer seja entre a infecção e a transmissão do vírus, também provocou alguma preocupação pois, a evolução que ocorre dentro do mesmo indivíduo, poderia levar ao desenvolvimento de uma população vírica heterogénea. No entanto, esta heterogeneidade vírica não se reflecte na robustez da

reconstrução dos métodos de filogenia <sup>(49, 79)</sup> sendo assim possível a utilização destes métodos, mesmo em amostras obtidas num longo intervalo de tempo <sup>(80)</sup>.

## VI - Conclusão

Neste estudo foram avaliados e caracterizados os eventos de transmissão em 37 casais portadores do HIV-1, com ligações epidemiológicas conhecidas. O estabelecimento do elo de ligação entre os 2 elementos de cada casal foi obtido por análise filogenética, a partir de sequências do gene *pol*, com a determinação da sua proximidade genética. Foram também analisados os padrões de mutações apresentados pelas sequências, tendo sido considerados tanto mutações de resistências como polimorfismos naturais. Adicionalmente, foram levantados dados epidemiológicos que permitissem estabelecer ou excluir uma ligação de transmissão entre os indivíduos de forma a poder corroborar os resultados da análise filogenética e os seus padrões mutações. Com base na proximidade genética, elevados valores de “bootstrap”, dados epidemiológicos congruentes e padrões de mutações similares foi possível identificar 70,27% (n=26) de pares de transmissão.

Embora a informação apresentada sobre as mutações não seja essencial para provar a ocorrência de transmissão, nem a presença de mutações de resistência por si só seja suficiente para provar a transmissão, esta foi importante para verificar a abordagem deste estudo. A presença de padrões de mutações de resistência similares nos 2 elementos que formam um casal, em que um ou mesmo os 2 não possuíam experiência prévia aos anti-retrovíricos, vem reforçar o problema da transmissão de resistências e o consequente

impacto na estratégia terapêutica, uma preocupação cada vez mais forte a nível mundial (40, 70).

Na validação das ligações caracterizadas a nível molecular, a comparação com dados epidemiológicos assume uma grande importância no entanto, este tipo de informação permanece difícil de obter. Dos 80,08% (n=30) pares onde um dos elementos é indicado como o responsável pela transmissão ao parceiro, apenas foi possível confirmar 67,57% (n=25) “clusters” de transmissão. Consequentemente, a assunção de uma ligação de transmissão baseada apenas na informação prestada pelos pacientes, mesmo quando inserida numa relação médico - paciente, pode nem sempre ser correcta. Dependendo de factores demográficos, étnicos e das circunstâncias que caracterizam a população estudada, a discordância entre a informação prestada e a realidade irá certamente variar, mas estará sempre presente <sup>(61, 69)</sup>. Assim em investigações que necessitem de um conhecimento preciso da transmissão do HIV-1, como estudos que tenham por objectivo a identificação da relação do hospedeiro e transmissão ou a determinação da eficácia de certas estratégias de prevenção, a caracterização molecular de ambos os parceiros é essencial.

Por fim, a análise filogenética, no contexto de outras evidências clínicas e epidemiológicas, pode fornecer suporte para o estabelecimento de uma ligação entre casos, mas não pode por si só estabelecer a direcção em que esta ocorreu, nem provar que a transmissão do HIV-1 ocorreu directamente entre 2 indivíduos isto é, que outros indivíduos não estejam envolvidos numa série de transmissões intermediárias. No entanto, quando os vírus presentes não se encontram relacionados entre si, as evidências

fornecidas são suficientemente sólidas para permitirem excluir a possibilidade de ter ocorrido transmissão entre eles <sup>(52, 54, 81)</sup>.

## **Capítulo III**

---

### **Bibliografía**



## Bibliografia

1. Pneumocystis pneumonia: Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1981;30:250-2.
2. UNAIDS/ OMS. AIDS epidemic update: December 2007. <http://www.unaids.org>. Acedido em: 15/09/ 2009.
3. Barré-Sinoussi F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. Science. 1983;220:868-71.
4. Los Alamos. HIV Sequence Compendium. 2000.
5. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. AIDS 2006; 20(16):W13-23.
6. McCutchan F. Understanding the genetic diversity of HIV. AIDS. 2000;14 (suppl), S31-44.
7. Peeters M, Sharp P. The genetic diversity of HIV-1: the moving target. AIDS 2000;14 Suppl 3: S129-40.
8. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, Cummins LB, Arthur LO, Peeters M, Shaw MG, Sharp PM, and Hahn BH. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature 1999; 397:436-41.
9. Hahn BH, Shaw GM, Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. Science 2000; 287:607-14.
10. Delaporte E, Janssens W, Peeters M, Buve A, Dibanga G, Perret JL, Ditsambou V, Courbot MC, Georges A, Bourgeois A, Samb B, Henzel D, Heyndrickx L, Franssen K, van der Groen G, Larouze B. Epidemiological and molecular characteristics of HIV infection in Gabon, 1986-1994. AIDS 1996; 10:903-910.
11. Mokili, JL, Rogers M, Carr JK, Simmonds P, Bopopi JM, Foley BT, Korber BT, Birx DL, McCutchan FE. Identification of a novel clade of human immunodeficiency virus type 1 in Democratic Republic of Congo. AIDS Res Hum Retrovir 2002; 18:817-23.
12. Peeters M, Gaye A, Mboup S, Badombena W, Bassabi K, Prince-David M, Develoux M, Liegeois F, van der Groen G, Saman E, Delaporte E. Presence of HIV-1 group O infection in West Africa. AIDS 1996; 10:343-4.
13. Vidal N, Peeters M, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, Robertson DL, Ilunga W, Sema H, Tshimanga K, Bongo B, Delaporte E. Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo

- suggests that the HIV-1 pandemic originated in central Africa. *J Virol* 2000; 74:10498–507.
14. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, et al. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 1990; 345:356–359.
  15. Menu, Peeters M, Gueye A, Mboup S, Bibollet-Ruche F, Ekaza E, Mulanga C, Ouedrago R, Gandji R, Mpele P, Dibanga G, Koumare B, Saidou M, Esu-Williams E, Lombart JP, Badombena W, Luo N, Vanden HM, Delaporte E. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* 1997; 11:493–8.
  16. Ayouba A, Souquieres S, Njinku B, Martin PM, Muller-Trutwin MC, Roques P, Barre-Sinoussi F, Maucelere P, Simon F, Nerrienet E. HIV-1 group N among HIV-1-seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* 2000; 14:2623–5.
  17. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Sharp PM, Ho DD. An African HIV sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391:594-7.
  18. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The challenge of HIV-1 diversity. *N Engl J Med* 2008; 358:1590-602.
  19. Gao F, Robertson DL, Morrison S, Hui H, Craig S, Decker JM, Fultz P.N, Girard M, Shaw GM, Hahn BH, Sharp PM. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin. *J Virol* 1996; 70:7013–29.
  20. van Harmelen J, Wood R, Lambrick M, Rybicki EP, Williamson A L, Williamson C. An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS* 1997; 11:81–7.
  21. Ávila M, Pando M, Carrion G, Peralta M, Salomon H, Carrillo MG, Sanchez J, Maulen S, Hierholzer J, Marinello M, Negrete M, Russell KL, Carr JK. Two HIV-1 epidemics in Argentina: diferente genetic subtypes associated with different risk groups. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:422-6.
  22. Thomson M, Najera R. Travel and introduction of Human Immunodeficiency Virus type 1 non-B subtype genetic forms into Western Countries. *Clin Infectious Diseases* 2001; 32:1732-7.
  23. Buonaguro L, Tagliamonte M, Tornesello ML, Buonaguro FM. Genetic and phylogenetic evolution of HIV-1 in a low subtype heterogeneity epidemic: the Italian example. *Retrovirology* 2007; 4:34.

24. Pereleson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271:1582-6.
25. Goodrich DW, Duesberg PH. Retroviral recombination during reverse transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:2050–6.
26. Overbaugh J, Bangham CR, Selection forces and constrains on retroviral sequence variation. *Science* 2001; 29:292:1106-9.
27. Royce RA, Sena A, Cates W Jr, Cohen MS. Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* 1997; 336:1072-8.
28. Galvin SR, Cohen MS. Sexual transmission of HIV. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2:33-42.
29. Levy JA. The transmission of AIDS: the case of the infected cell. *JAMA* 1988; 259:3037-8.
30. Moyle GJ, Wildfire A, Mandalia S, et al. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 191:866 –72.
31. Berger EA, Murphy PM, Farber Jm. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry,tropism, and disease. *Annu. Rev Immunol.* 1999; 17:657-700.
32. Liu R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals in HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-37.
33. Taha TE, et al. Bacterial vaginosis and disturbance of vaginal flora: association with increased aquisition of HIV. *AIDS* 1998; 12:1699-706.
34. Rowland-Jones SL, et al. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitotes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest* 1998; 102:1758-65.
35. Kaul R, et al. HIV-1 specific mucosal IgA in a cohort of HIV-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999; 13:23-9.
36. Quiñones-Mateu ME, Arts EJ. Fitness: implications for drug resistance, disease progrssion and global epidemic evolution. In: Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, Marx PA, McCutchan F, et al. editors. *HIV sequence compendium*. Los Álamos: Theoretical Biology and Biophysycs Group, Los Álamos National Laboratory; 2001. P. 134-70.
37. Erice A, Mayers DL, Strike DG et al. Primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency vírus type 1. *N Engl J Med* 1993; 328: 1163-5.
38. Boden D, Hurley A, Zhang L et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *JAMA* 1999; 282:1135-41.

39. Veenstra J, Schuurman R, Cornelissen M et al. Transmission of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants following deliberate injection of blood from a patient with AIDS: characteristics and natural history of the virus. *Clin Infect Dis* 1995; 21:556-60.
40. Taylor S, Cane P, Hue S, Xu L, Wrinn T, Lie Y, Hellmann N, Petropoulos C, Workman J, Ratcliffe D, Choudhury, and Pillay D. Identification of a transmission chain of HIV type 1 containing drug resistance-associated mutations. *AIDS Res Hum Retrovir* 2003; 19:353-61.
41. Dar ES, Richman DD. Confronting the emergence of drug resistant HIV type 1: impact of antiretroviral therapy on individual and population resistance. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21:343-57.
42. Cascade Virology Collaboration. The impact of transmitted drug resistance on the natural history of HIV infection and response to first-line therapy. *AIDS* 2006; 20:21-8.
43. Booth CL, Geretti AM. Prevalence and determinants of transmitted antiretroviral drug resistance in HIV-1 infection. *JAC antiviral* 2007; 59:1047-56.
44. Shafer RW, Rhee SY, Pillay D, Miller V, Sandstrom P, Schapiro JM, Kuritzkes DR, Bennett. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS* 2007 21:215-23.
45. Kantor R, Katzenstein DA, Efron B, Carvalho AP, Aynhoven B, Cane P, Clarke J, et al. Impact of HIV-1 subtype and antiretroviral therapy on protease and reverse transcriptase genotype: results of a global collaboration. *PloS Med* 2005; 2:e112.
46. Hu T, Wang N, Carr A, Nam DS, Moor-Jankowski R, Cooper DA, et al. Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence of viral compartmentalization and selection during sexual transmission. *J Virol* 1996; 70:3098-107.
47. Nickle DC, Jensen Ma, Shriner D, Brodie SJ, Frenkel LM, Mittler JE, et al. Evolutionary indicators of human immunodeficiency virus type 1 reservoirs and compartments. *J Virol* 2003; 77:5540-6.
48. Gifford RJ, Oliveira T, Rambaut A, Pybus OG, Dunn D, Vandamme A, Kellam P, and Pillay D. Phylogenetic Surveillance of Viral Genetic Diversity and the Evolving Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 2007; 81(23): 13050-6.
49. Hué S, Clewley JP, Cane PA, and Pillay D. HIV-1 *pol* gene variation is sufficient for reconstruction of transmissions in the era of antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18:719-28.

50. Palmer S, Vuitton D, Gonzales MJ, Bassignot A, and Shafer RW. Reverse Transcriptase and Protease Sequence evolution in Two HIV-1–Infected Couples. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 31: 283-90.
51. Ou CY, Ciesielski CA, Myers G, Bandea CI, Luo C, Korber BT, Mullins JI, et al. Molecular Epidemiology of HIV Transmission in a Dental Practice. *Science* 1992; 256: 1165-71.
52. Bernard EJ, Azad Y, Vandamme AM, Weait M, Geretti. HIV forensics: pitfalls and acceptable standards in the use of phylogenetic analyses as evidence in criminal investigations of HIV transmission. *HIV Medicine* 2007; 8:382-7.
53. Metzker ML, Mindell DP, Liu XM, Ptak RG, Gibbs RA, and Hillis DM. Molecular evidence of HIV-1 transmission in a criminal case. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99 (22): 14292-7.
54. Leitner T, Escanilla D, Franzen C, Mathias U, and Albert J. Accurate reconstruction of a known HIV-1 transmission history by phylogenetic tree analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:10864-9.
55. Hué WS, Temin HM. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* 1990; 250:1227–33.
56. Stuhlmann H, Berg P. Homologous recombination of copackaged retrovirus RNAs during reverse transcription. *J Virol* 1992; 66:2378–88.
57. Yahi N, Fontini J, Tourres C, Tivoli N, Kock N, Tamalet C. Use of drug resistance sequence data for the systematic detection of non-b human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtypes: how to create a sentinel site for monitoring the genetic diversity of HIV-1 at a country scale. *J Infect Dis* 2001. 183:1311-7.
58. Rambaut A, Posada D, Crandall KA, Holmes EC. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev Genet* 2004; 5:52-61.
59. Shankarappa R, Margolick JB, Gange SJ, Rodrigo AG, Upchurch D, Farzadegan H, Gupta P, Rinaldo CR, Learn GH, He X, Huang XL, Mullins JI. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73:10489-502.
60. Hué S, Pillay D, Clewley JP, Pybus OG. Genetic analyses reveals the complex structure of HIV-1 transmission within defined risk groups. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:4425-9.

61. Trask SA, Derdeyn CA, Fideli U, Chen Y, Meleth S, Kasolo F, Musonda R, Hunter, Gao F, Allen S, Hahn BH. Molecular epidemiology of Human Immunodeficiency Virus Type 1 transmission in a heterosexual cohort of discordant couples in Zâmbia. *J Virol* 2002; 76 (1):397-405.
62. Grant RM, Kuritzkes DR, Johnson VA, Mellors JW, Sullivan JL, Swanstrom R, D'Aquila RT, Van Gorder M, Holodniy M, Loyd Jr RM Jr, Reid C, Morgan GF, Winslow DL. Accuracy of The TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1586-93.
63. Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, Gunthard HF, Kuritzkes DR, Pillay D, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2008. *Top HIV Med* 2008;16:138-45.
64. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. <http://hivdb.stanford.edu>. Acedido em: 15/09/ 2009.
65. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997; 25:4876-82.
66. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; 16:111-20.
67. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol Biol Evol* 1987; 4:406-25.
68. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 1985;39:783-91.
69. Yirrell DL, Pickering H, Palmarini G, Hamilton L, Rutemberwa A, Biryahwaho B, Whitworth J, Brown AJ. Molecular epidemiological analysis of HIV in sexual networks in Uganda. *AIDS* 1998; 12:285-90.
70. Yerly S, Vora S, Rizzardi P, Chave JP, Vernazza PL, Flepp M, et al. Acute HIV infection: impact on the spread of HIV and transmission of drug resistance. *AIDS* 2001, 15:2287-92.
71. Mota V, Duque V, Pereira-Vaz J, Morais C, Saraiva-da-Cunha J, Meliço-Silvestre A. Prevalence of genotypic resistance in treatment-naive individuals infected with HIV-1 in Portugal center region. In: Program and abstracts of the 12th International Congress of Infectious Diseases; 2006 June 15-18; Lisbon, Portugal: 2006. Abstract 34.028.
72. Ammaranond P, Cunningham P, Oelrichs R, Suzuki K, Harris C, Leas L, et al. Rates of transmission of antiretroviral drug resistant strains of HIV-1. *J Clin Virol* 2003, 26:153-61.

73. Palma AC, Araújo F, Duque V, Borges F, Paixão MT, Camacho R, et al. Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect. Genet. Evol.* 2007;7:391-8.
74. Mota V, Duque V, Morais C, Pereira-Vaz J, Saraiva-da-Cunha J, Meliço-Silvestre A. Diversidade Genética na Zona Centro de Portugal do HIV-1 de 1997 a 2008. In: 3º Congresso de Pandemias na Era da Globalização. 1º Simpósio Nacional da Medicina do Viajante; 2009 Maio 7-9; Coimbra, Portugal: 2009. Abstract 3.
75. Esteves A, parreira R, Venenno T, Franco M, Germano de Sousa J, Canas-Ferreira F. Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res Hum Retrovir* 2002; 18:313-25.
76. Harmelen J, Wood R, Lambrick, Rybicki EP, Williamson AL, Williamson C. An Association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South África. *AIDS* 1997; 11:81-7.
77. Murphy G, Charletta A, Jordanb LF, Osner N, Gillb O, Parry J. HIV incidence appears constant in men who have sex with men despite widespread use of effective antiretroviral therapy. *AIDS* 2004; 18:265-72.
78. Philippe L, Derdelinckx I, Rambaut A, Laethem K, Dumont S, Vermeulen S, Wijngaerden E, Vandamme AM. Molecular footprint of drug-selective pressure in a human immunodeficiency vírus transmission chain. *J Virol* 2005; 79(18):11981-9.
79. Leiter T, Albert J. The molecular clock of HIV-1 unveild through analysis of a known transmission history. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:10752-7.
80. Banaschak, Werwein M, Brinkmann, Hauber I. Human Immunodeficiency vírus type 1 infection after sexual abuse: value of nucleic acid sequence analyses in identifyinf the offender. *Clin Inf Deases* 2000; 31:1098-100.
81. Leitner T, Albert J. Reconstruction of HIV-1 transmission chains for forensic purposes. *AIDS Rev* 2000; 2:241-51.
82. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS* 2006; 20:w13-23.



