

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

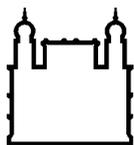
Doutorado em Biologia Parasitária

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, EVOLUÇÃO VIRAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIRRETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS
POR HIV-1 E/OU HIV-2 RESIDENTES EM DIFERENTES ILHAS DO
ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE**

ISABEL INÊS MONTEIRO DE PINA ARAÚJO

Rio de Janeiro

Maio de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ISABEL INÊS MONTEIRO DE PINA ARAÚJO

Epidemiologia molecular, evolução viral e perfil de resistência aos antirretrovirais em uma população de pacientes infectados por HIV-1 e/ou HIV-2 residentes em diferentes ilhas do arquipélago de Cabo Verde

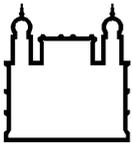
Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Parasitária

Orientadora: Prof. Dra. Mariza Gonçalves Morgado

RIO DE JANEIRO

Maio de 2014

FICHA CATALOGRÁFICA A SER ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
DE MANGUINHOS PARA A VERSÃO FINAL DA TESE.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: ISABEL INÊS MONTEIRO DE PINA ARAÚJO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, EVOLUÇÃO VIRAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIRRETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS
POR HIV-1 E/OU HIV-2 RESIDENTES EM DIFERENTES ILHAS DO
ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Mariza Gonçalves Morgado

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Francisco Inácio Nastos - Presidente (ICICT/Fiocruz)

Prof. Dra. Selma Andrade Gomes (IOC/Fiocruz)

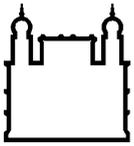
Prof. Dr. Marcelo Alves Soares (IB/UFRJ)

Suplentes:

Prof. Dra. Natália Motta de Araújo (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. André Felipe Andrade dos Santos (IB/UFRJ)

Rio de Janeiro, 07 de Maio de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Dedicatória

A todos aqueles que receberam um diagnóstico positivo para HIV. A todos que trabalham para uma vida positiva desses e de toda comunidade.

AGRADECIMENTOS

Decorridos mais de 20 anos, desde a primeira vez que pisei em solo brasileiro, fico muito feliz quando alguém me diz que não pareço estrangeira e/ou que já sou uma brasileira. Sinceramente, eu também me sinto parte desse país e impregnada dos seus sabores. Pois é..., considero-me hoje uma “brasiola” (brasileira + kriola). Por isso, um muito obrigado a todos os brasileiros por me receberem tão bem e permitirem que eu fizesse parte de sua história.

À minha orientadora Dra. Mariza Morgado, pesquisadora brilhante, mas que também foi amiga, companheira e mãe.

Ao CNPq pela aprovação e financiamento do projeto através do “Edital 12/2008 – PROÁFRICA”.

À CAPES pela bolsa de auxílio financeiro, através do Programa Estudante Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG).

Ao Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, por me permitir fazer parte do seu corpo discente e participar na manutenção da tradição de excelência em ensino e pesquisa.

À Universidade de Cabo Verde, pelo apoio em todos os momentos e principalmente por conceder-me dois anos de licença para o doutorado.

Ao Ministério da Saúde em Cabo Verde, por aprovar, acreditar e ser parte desse trabalho.

Minha homenagem e agradecimento a todos os pacientes que gentilmente aceitaram participar do estudo e a Adelaide Lima, Ana Isabel dos Santos Lima, Avelino Andrade, Ana Paula Dias Santos, António Moreira, Aretha Fortes, Benvindo Cruz, Cesarina Cruz, Claudia Santos, Claudino Mendonça, Didier Andrade, Dulce Mascarenhas, Elsa Almeida, Jaqueline Cid, Jessica Ramos, Joana Alves, Jorge Barreto, José Rocha, Júlio Lima, Lionite Correia, Liziana Barros, Maria da Luz Lima, Marina Oliveira, Myriam Rodrigues, Peter Ubah Okeke e Regina Timas, profissionais que tornaram possível esse trabalho.

Aos pesquisadores Ana Carolina Vicente, Monick Guimarães e Gonzalo Bello pela perspicácia científica, colaboração substancial, apoio constante e por tornarem possível a elaboração do primeiro artigo do trabalho.

Aos meus colegas e amigos do LabAids – IOC/Fiocruz, pela ajuda em todas as etapas do trabalho e principalmente pela amizade, companheirismo e alegria. Se sou mais mimada hoje, a culpa é vossa.

Ao GP AMOO pela oportunidade de ser corpo e família na sexta e durante a semana.

À minha igreja do Nazareno da Praia e à Milda pelo suporte e presença apesar do oceano.

À minha prima Iolanda pelos estímulos e pelo envio de todos os documentos solicitados.

À minha família no Brasil (Ramos) e à minha família Brasileira (Bratfich) pelo amparo e pela oportunidade de ver os nossos laços se apertarem cada vez mais.

À minha amiga Monick que embelezou a minha vida com sua simplicidade, amizade e muito carinho. Vou sentir muitas saudades!

À minha amiga Sy, que me mostrou muitas belezas do Rio de Janeiro e do Brasil, mas principalmente o exemplo de amor cristão e de compromisso com Deus. E nesses quatro anos, nos tornamos nada mais nada menos que... irmãs.

A todos que me visitaram no meu humilde “apartamento”, contribuindo para que os meus dias no Rio fossem mais divertidos.

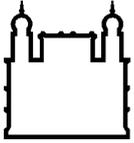
À minha família pelo apoio incondicional e por ensinar-me a celebrar a vida.

“Ó profundidade da riqueza da sabedoria e do conhecimento de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e inescrutáveis os seus caminhos! Quem conheceu a mente do Senhor? Ou quem foi seu conselheiro? Quem primeiro lhe deu, para que ele o recompense? Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém.” Romanos 11:33-36

Epígrafe

“A vida inventa! A gente principia as coisas,
não sabe por que, e desde aí perde
o poder de continuação –
porque a vida é mutirão de todos,
por todos remexida e temperada.”

Guimarães Rosa – Grande Sertão Veredas



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

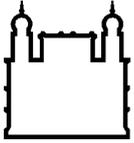
EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, EVOLUÇÃO VIRAL E PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES INFECTADOS POR HIV-1 E/OU HIV-2 RESIDENTES EM DIFERENTES ILHAS DO ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Isabel Inês Monteiro de Pina Araújo

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV-1 e HIV-2 teve início em Cabo Verde em 1987, mas pouco se sabe a respeito da diversidade genética desses vírus nessas ilhas, localizadas na costa Ocidental Africana. Neste estudo, caracterizamos a epidemiologia molecular do HIV-1 e HIV-2 em Cabo Verde, analisamos a origem dos principais clados de HIV introduzidos no país e descrevemos a ocorrência de mutações de resistência aos antirretrovirais (DRM) em indivíduos virgens de tratamento (ARTn) e pacientes em tratamento (ARTexp) oriundos das diferentes ilhas. Amostras de sangue, dados sociodemográfico e clínico-laboratoriais foram obtidos de 221 indivíduos HIV positivos entre 2010-2011. As amostras foram sequenciadas na região da polimerase (1300 pares de bases) e análises filogenéticas e de bootscan foram realizadas para a subtipagem viral. Os algoritmos disponibilizados nos sites Stanford HIV Database e HIV-GRADE e.V. Algorithm Homepage foram utilizados para avaliar a existência de DRM em pacientes positivos para HIV-1 e HIV-2, respectivamente. Os estudos evolutivos e filogeográficos foram realizados através do programa BEAST. Entre os 221 pacientes analisados, sendo 169 (76,5%) HIV-1, 43 (19,5%) HIV-2 e 9 de (4,1%) co-infectados pelo HIV-1 e pelo HIV-2, 67% eram do sexo feminino. As medianas de idade foram de 34 (IQR = 1-75) e 47 (IQR = 12-84) para o HIV-1 e HIV-2, respectivamente. A infecção pelo HIV-1 é causada pelo subtipo G (36,6%), CRF02_AG (30,6%), subtipo F1, (9,7%), URFs (10,4%), subtipo B (5,2%), CRF05_DF (3,0%), subtipo C (2,2%), CRF06_cpx (0,7%), CRF25_cpx (0,7%) e CRF49_cpx (0,7%), e todas as infecções por HIV-2 pertencem ao grupo A. De acordo com as análises filogeográficas e de origem do HIV, estima-se que o HIV-2 foi o primeiro tipo viral introduzido em Cabo Verde e possui relações filogenéticas com sequências referências de Portugal. O HIV-1 entrou no país mais tarde, primeiramente pelo subtipo G, evidenciando relações com sequências da África Central e de Portugal. Transmissão de DRM (TDRM) foi observada em 3,4% (2/58) de pacientes HIV-1 ARTn (1,7% NRTI, NNRTI 1,7%), mas não entre os infectados com HIV-2. Entre os pacientes ARTexp, DRM foi observada em 47,8% (33/69) dos infectados pelo HIV-1 (37,7% NRTI, NNRTI 37,7%, 7,4% de PI, 33,3% para duas classes) e 17,6% (3/17) nos infectados pelo HIV-2 (17,6%, 11,8% NRTI PI, 11,8% para ambas as classes). Este estudo indica que Cabo Verde tem um cenário epidemiológico molecular complexo e único dominado pelo HIV-1 subtipo G, CRF02_AG e F1 e HIV-2 grupo A, sendo esse o primeiro tipo viral introduzido em Cabo Verde. A ocorrência de TDRM e o nível relativamente elevado de DRM entre os pacientes tratados constituem uma preocupação, pelo que o monitoramento contínuo dos pacientes em ARTexp, incluindo genotipagem são políticas públicas a serem implementadas.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

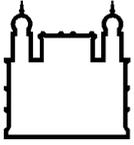
**MOLECULAR EPIDEMIOLOGY, VIRAL EVOLUTION AND PROFILE OF DRUG
RESISTANCE MUTATIONS AMONG HIV-1 AND/OR HIV-2 INFECTED PATIENTS
FROM DISTINCT ISLANDS OF THE CAPE VERDE ARCHIPELAGO**

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITOLOGIC BIOLOGY

Isabel Inês Monteiro de Pina Araújo

HIV-1 and HIV-2 have been detected in Cape Verde since 1987, but little is known regarding the genetic diversity of these viruses in this archipelago, located near the West African coast. In this study, we characterized the molecular epidemiology of HIV-1 and HIV-2, analyzed the origin of the major clades of HIV introduced in Cape Verde and described the occurrence of drug resistance mutations (DRM) among antiretroviral therapy naïve (ARTn) patients and patients under treatment (ARTexp) from different Cape Verde islands. Blood samples, socio-demographic and clinical-laboratory data were obtained from 221 HIV-positive individuals during 2010-2011. Genetic sequencing of the pol region (1300bp) was obtained and phylogenetic and bootscan analyses were performed for viral subtyping. The evolutionary and phylogeographic studies were performed using the program BEAST. HIV-1 and HIV-2 DRM were evaluated for ARTn and ARTexp patients using the Stanford HIV Database and HIV-GRADE e.V. Algorithm Homepage, respectively. Among the 221 patients (169 [76.5%] HIV-1, 43 [19.5%] HIV-2 and 9 [4.1%] HIV-1/HIV-2 co-infections), 67% were female. The median ages were 34 (IQR=1-75) and 47 (IQR=12-84) for HIV-1 and HIV-2, respectively. HIV-1 infections were due to subtypes G (36.6%), CRF02_AG (30.6%), F1 (9.7%), URFs (10.4%), B (5.2%), CRF05_DF (3.0%), C (2.2%), CRF06_cpx (0.7%), CRF25_cpx (0.7%) and CRF49_cpx (0.7%), whereas all HIV-2 infections belonged to group A. According the HIV phylogeographic analyses, it is estimated that HIV-2 was the first viral type introduced in Cape Verde and has phylogenetic relationships with referral sequences of Portugal. The HIV-1 was introduced in the country later on, due to infections with subtype G, showing phylogenetic relationships with sequences from Central Africa and Portugal. Transmitted DRM (TDRM) was observed in 3.4% (2/58) of ARTn HIV-1-infected patients (1.7% NRTI, 1.7% NNRTI), but not among those with HIV-2. Among ARTexp patients, DRM was observed in 47.8% (33/69) of HIV-1 (37.7% NRTI, 37.7% NNRTI, 7.4% PI, 33.3% for two classes) and 17.6% (3/17) of HIV-2-infections (17.6% NRTI, 11.8% PI, 11.8% both). This study indicates that Cape Verde has a complex and unique HIV-1 molecular epidemiological scenario dominated by HIV-1 subtypes G, CRF02_AG and F1 and HIV-2 group A. The occurrence of TDRM and the relatively high level of DRM among treated patients are of concern. Continuous monitoring of patients on ART, including genotyping, are public policies to be implemented.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

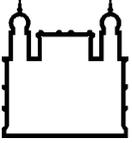
**ÉPIDÉMIOLOGIE MOLÉCULAIRE, ÉVOLUTION VIRALE ET PROFIL DES
MUTATIONS DE RÉSISTANCE AUX ANTIRÉTROVIRAUX DANS UNE
POPULATION DE PATIENTS INFECTÉS PAR LE VIH-1 ET/OU VIH-2 RÉSIDANT
DANS LES DIFFÉRENTES ÎLES DE L'ARCHIPEL DU CAP-VERT**

RÉSUMÉ

THÈSE DE DOCTORAT EN BIOLOGIE PARASITAIRE

Isabel Inês Monteiro de Pina Araújo

Le diagnostic sérologique de l'infection par VIH-1 et VIH-2 a commencé au Cap-Vert en 1987, mais on en sait peu sur la diversité génétique de ces virus, dans ces îles situées sur la côte ouest-africaine. Dans cette étude, nous caractérisons l'épidémiologie moléculaire du VIH-1 et VIH-2 au Cap-Vert, nous analysons l'origine des principaux clades du VIH introduits dans le pays, et nous décrivons l'apparition de mutations de résistance aux antirétroviraux (DRM) chez les individus vierges de traitement (ARTn) et les patients sous traitement (ARTexp) provenant des différentes îles. Des échantillons de sang, ainsi que des données sociodémographiques, cliniques et de laboratoire ont été obtenus à partir de 221 personnes séropositives entre 2010 à 2011. Les échantillons ont été séquencés dans le *pol* (1300bp) et des analyses phylogénétiques et de bootscan ont été réalisées pour le sous-typage viral. Les algorithmes disponibles sur les sites Internet *Stanford HIV Database* et *HIV-GRADE e.V. Algorithm Homepage* ont été utilisés pour évaluer la présence de DRM chez les patients positifs pour le VIH-1 et VIH-2, respectivement. Les études évolutives et phylogéographiques ont été réalisées à l'aide du programme *BEAST*. Parmi les 221 patients analysés, dont 169 (76,5%) VIH-1, 43 (19,5%) VIH-2 et 9 (4,1%) co-infectés par le VIH-1 et VIH-2, 67% étaient des femmes. L'âge médian a été de 34 (IQR = 1-75) et 47 (IQR = 12-84) pour le VIH-1 et VIH-2, respectivement. L'infection par le VIH-1 est causée par le sous-type G (36,6%), CRF02_AG (30,6%), le sous-type F1, (9,7%), URFs (10,4%), le sous-type B (5,2 %), CRF05_DF (3,0%), le sous-type C (2,2%), CRF06_cpx (0,7%), CRF25_cpx (0,7%) et CRF49_cpx (0,7%), et toutes les infections par le VIH-2 appartiennent au groupe A. Selon les analyses phylogéographiques et de l'origine du VIH, on estime que le VIH-2 a été le premier type viral introduit au Cap-Vert et qu'il entretient des relations phylogénétiques avec des séquences références du Portugal. Le VIH-1 est entré plus tard dans le pays, d'abord par le sous-type G, montrant des séquences de relations avec l'Afrique centrale et le Portugal. La transmission de DRM (TDRM) a été observée chez 3,4% (2/58) des patients VIH-1 ARTn (1,7% NRTI, NNRTI 1,7%), mais pas chez les personnes infectées par le VIH-2. Parmi les patients ARTexp, les DRM ont été observées chez 47,8% (33/69) des infectés par le VIH-1 (37,7% NRTI, NNRTI 37,7%, 7,4% de PI, 33,3% pour les deux classes) et 17,6% (3/17) chez les patients infectés par le VIH-2 (17,6%, 11,8% NRTI PI, 11,8% pour les deux catégories). Cette étude indique que le Cap-Vert a un scénario épidémiologique moléculaire complexe et unique, dominé par le VIH-1 sous-type G, CRF02_AG et F1 et le VIH-2 du groupe A, celui-ci étant le premier type viral introduit au Cap-Vert. L'apparition de TDRM et le niveau relativement élevé des DRM chez les patients traités représentent une préoccupation, à telle enseigne que la surveillance continue des patients sous TARV, y compris le génotypage sont des politiques publiques à mettre en œuvre.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR, EVOLUÇÃO VIRAL Y PERFIL DE RESISTÊNCIA PA ANTIRETROVIRAL NA UN GRUPO DE PACIENTES INFETADOS PA HIV-1 Y/O HIV-2 QUE ESTÃO NA DIFERENTES ILHAS DO ARQUIPÉLAGO DE CABO VERDE EPIDEMIOLOGIA

RIZUMO

TESI DE DOUTORADO NA BIOLOGIA PARASITÁRIA

Isabel Inês Monteiro de Pina Araújo

Na Kabu Verdi, testi sorolójiku pa djobe antikorpus anti-HIV-1 y 2 kumesa ta fazedu na 1987, má sabedu poku sobri diversidadi jenétiku di es vírus, na kes ilha li, ki ta fika na kósta osidental di África. Nes studu, nu karateriza epidemiolojia molekular di HIV-1 y HIV-2 na Kabu Verdi, nu djobe oriji di kes prinsipal subtipu di HIV ki entra na Kabu Verdi y nu diskreve kazus di mutason ki ta da razisténsia pa antiretroviral (DRM) na kenha ki ka sta na tratamentu y na pasienti ki sta na tratamentu, di diferentis ilha. Na 2010 y 2011, nu konsigi amostra di sangi, dadus sosio-demográfikus y kliniku-laboratorial di 221 algen HIV puzitivu. Nu sekuensia rijion *pol* (1300bp) di kes amostra li y nu fase análizi di filojenia y di *bootscan* pa nu sabe subtipu di vírus. Pa studa ivoluson y filojiografia di vírus nu uza programa *BEAST*. Pa djobe si kes amostra ten mutason di razisténsia pa antiretroviral nu uza programa di *saiite* di Stanford HIV Database pa HIV-1 y HIV-GRADE e.V. Algorithm Homepage pa HIV-2. Di kes 221 pasienti ki studadu, 169 (76,5%) ten HIV-1, 43 (19,5%) ten HIV-2 y 9 (4,1%) ten HIV-1 y HIV-2; 67% é mudjer. Mediana di idadi foi 34 (IQR = 1-75) pa HIV-1 y 47 (IQR = 12-84) pa HIV-2. Infeson pa HIV-1 é provokadu pa subtipu G (36,6%), CRF02_AG (30,6%), subtipu F1, (9,7%), URFs (10,4%), subtipu B (5,2%), CRF05_DF (3,0%), subtipu C (2,2%), CRF06_cpx (0,7%), CRF25_cpx (0,7%) y CRF49_cpx (0,7%), y tudu infeson provokadu pa HIV-2 é di grupu A. Di akordu ku análizi di filojiografia y di oriji di HIV, ta parse ma purmeru tipu di vírus ki entra na Kabu Verdi foi HIV-2 y e ten rilason filogenétiku ku sekuénsias konxidu di Portugal.

Transmison di mutason di razisténsia pa antiretroviral (TDRM) atxadu na 3,4% (2/58) pasienti virjen di tratamentu (ARTn) (1,7% NRTI, NNRTI 1,7%), má ka atxadu na algen infetadu pa HIV-2. Na kes pasienti ki sta ku tratamentu (ARTexp), DRM atxadu na 47,8% (33/69) di algen infetadu pa VIH-1 (37,7% NRTI, 37,7% NNRTI, 7,4% PI, 33,3% na dôs tipu di ramedu) y 17,6% (3/17) na kes infetadu pa HIV-2 (17,6% NRTI, 11,8% PI y 11,8% pa tudu dôs). Kel studu li ta mostra ma Kabu Verdi ten un kuadru di epidemiulujia molekular konpléksu, diferenti y partikular ku más HIV-1 di subtipu G, CRF02_AG y F1 y HIV-2 grupu A, ki foi purmeru tipu di virus ki entra na Kabu Verdi. Prezénsa di TDRM y kuantidadi di DRM na kes pasienti ki sta ta tratadu, é un priokupason, y purisu monitoramentu kontinuadu di kes algen li y inkluzon di jenotipaji é pulítika di saúdi públuka ki debe ser kolokadu na prátika.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMO	IX
ABSTRACT	xi
RÉSUMÉ	xiii
RIZUMU	xv
I. INTRODUÇÃO	1
1.1) O Vírus	2
1.1.1) Origem	4
1.1.2) Infecção e Replicação Viral	7
1.1.3) Patogenia	9
1.1.4) Transmissão	11
1.2) Diversidade e Epidemiologia Molecular	12
1.3) Tratamento e Resistência	18
1.4) Cabo Verde	25
1.4.1) Características Geográficas e Sócio-demográficas	26
1.4.2) HIV em Cabo Verde	28
1.5) Justificativa	32
II. OBJETIVOS	34
2.1) Objetivo Geral	34
2.2) Objetivos Específicos	34
III. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1) População de Estudo	35
3.2) Manejo de Amostras	36
3.3) Tipagem molecular do HIV	36
3.4) Análise de estruturação geográfica entre ilhas e regiões de Cabo Verde	39
3.5) Análise da origem dos principais clados de HIV introduzidos em Cabo Verde	39
3.6) Análise de Mutação de Resistência	41
3.7) Análise Estatística	41
3.8) Considerações éticas	42

IV. RESULTADOS	43
4.1) Caracterização Genética do HIV-1 e HIV-2	46
4.2) Análise dos dados sociodemográficos e clínicos de pacientes HIV-1 de Cabo Verde, de acordo com a diversidade molecular	56
4.3) Estudo de relações de transmissão entre Regiões	60
4.4) Análise Filogeográfica e Origem do HIV	61
4.5) Identificação e caracterização de Mutações de resistência a drogas ARV em pacientes virgens de tratamento e pacientes sob tratamento infectados pelo HIV-1 e HIV-2	73
V. DISCUSSÃO	79
VI. CONCLUSÕES	94
VII. PERSPECTIVAS	97
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
IX. APÊNDICES	114
Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre Esclarecido	
Apêndice 2 - Ficha Clínica e de Investigação Soro-Epidemiológica	
Apêndice 3 - Artigo publicado	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura do HIV destacando o RNA, as proteínas do Gag (MA: Matriz, CA: Capsídeo e NC: Nucleocapsídeo); Pol (Pro: Protease, IN: Integrase e RT: Transcriptase Reversa) e Env (TM: Transmembrana e SU: Superfície)	3
Figura 2: Representação do genoma viral do HIV-1 e HIV-2 destacando genes estruturais (<i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>); genes acessórios (<i>vif</i> , <i>vpr</i> , <i>vpu/vpx</i> , <i>rev</i> , <i>tat</i> e <i>nef</i>) e LTR's	4
Figura 3: Árvore Filogenética SIV/HIV	6
Figura 4: Ciclo Replicativo do HIV representando as fases iniciais e tardias da replicação viral	9
Figura 5: Curso clínico da infecção pelo HIV evidenciando a fase aguda, a latência clínica e a fase sintomática	11
Figura 6: Distribuição mundial dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1	17
Figura 7: Alvos terapêuticos dos Antirretrovirais. São apresentados as cinco classes de antirretrovirais e os alvos de atuação	21
Figura 8: Localização e distribuição das ilhas de Cabo Verde	26
Figura 9: Gráfico representativo da diversidade molecular do HIV-1 em Cabo Verde	46
Figura 10: Árvore filogenética da região <i>pol</i> do HIV-1 indicando os subtipos de HIV-1 encontrados nas amostras de Cabo Verde	48
Figura 11: Árvore filogenética da região <i>pol</i> do HIV-1 com os principais CRFs e URFs das amostras de Cabo Verde	50
Figura 12a) Árvore filogenética da região <i>pol</i> do HIV-1 com os URFs das amostras de Cabo Verde.	52
Figura 12b) Análise de BootScan dos principais HIV-1 URF	53
Figura 13: Árvore filogenética da região <i>pol</i> do HIV-2 das amostras de Cabo Verde	55
Figura 14: Distribuição dos principais subtipos e formas recombinantes do HIV-1 encontrados em Cabo verde de acordo com o local de residência	59
Figura 15: Análise Bayesiana de amostras africanas e europeias classificadas como HIV-2A na região da <i>pol</i>	62
Figura 16: Análise Bayesiana de amostras classificadas como subtipo G do HIV-1 na região da <i>pol</i>	65
Figura 17: Árvore filogenética de ML de amostras do subtipo G e CRF14_BG do HIV-1 na região da <i>pol</i>	67
Figura 18: Análise Bayesiana de amostras do subtipo G de Cabo Verde classificadas como clado GCV-I e sequências relacionadas selecionadas a partir da árvore de ML (Fig. 15).	69
Figura 19: Análise Bayesiana de amostras africanas e europeias classificadas como CRF02_AG do HIV-1 na região da <i>pol</i>	72

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Características sociodemográficos e clínicas de 221 indivíduos soropositivos para o HIV de Cabo Verde distribuídas de acordo com o tipo viral	45
Tabela 2: Características sociodemográficos e clínicas das 134 sequências dos indivíduos soropositivos para o HIV-1 distribuídas de acordo com caracterização molecular	57
Tabela 3: Teste de agrupamento filogenético das sequências de HIV de Cabo Verde de acordo com a região geográfica de origem	60
Tabela 4: Origem e data de introdução das principais variantes de HIV-1 e HIV-2 que circulam em Cabo Verde.	63
Tabela 5: Origem e data de introdução do clado GCV-I.	70
Tabela 6: Distribuição das Mutações de Resistência a Drogas em pacientes HIV-1 virgens de tratamento e HIV-1 e HIV-2 em tratamento	73

LISTA DE QUADRO

	Página
Quadro 1: Esquema Terapêutico usado em Cabo Verde para tratamento de pacientes infectados pelo HIV-1 e HIV-2	30
Quadro 2: Distribuição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com a ilha de residência	35
Quadro 3: Mutações de resistência do HIV-1 de acordo com a classe de antirretroviral em uso e a diversidade viral dos pacientes em tratamento	77

Lista de Siglas e Abreviaturas

3TC	Lamivudina
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ARTv	Virgens de tratamento antirretroviral
ARTexp	Em uso de tratamento antirretroviral
ARV	Antirretroviral
AZT	Azidotimidina ou zidovudina
CA	Capsídeo
Capes	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior
CCR-5	Receptor de células humanas para quimiocina da família CC tipo 5
CCR7	Receptor de células humanas para quimiocina da família CC tipo 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CEDEAO	Comunidade Econômica dos Estados da África Ocidental
CRF	Forma(s) recombinante(s) circulante(s)
CTL	Linfócito T citotóxico
CV	Carga viral
CXCR-4	Receptor de células humanas para quimiocina da família CXC
d4T	Estavudina
DRM	Mutações de resistência a drogas
DRV	Darunavir
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTPs	Deoxinucleotídeo Trifosfato
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EFV	Efavirenz
env	Envelope
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GALT	Tecido Linfoide Associado à Mucosa
gag	Grupo de Antígeno Específico
Gp	Glicoproteína do envelope do HIV-1
HAART	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HTLV	Vírus Linfotrópico T Humano
IEC	Informação, Educação e Comunicação
IFN- γ	Interferon gama
Igs	Imunoglobulinas
IDSR	Inquérito Demográfico e de Saúde Reprodutiva

IN	Integrase
INI	Inibidores da integrase
INNTRs	Inibidores Não Nucleosídicos da Transcriptase Reversa
INTRs	Inibidores Nucleosídicos/Nucleotídios da Transcriptase Reversa
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LabAids	Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular
LPV	Lopinavir
LTR	Longa sequência terminal repetitiva
MA	Matriz
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NC	Nucleocapsídeo
NFV	Nelfinavir
nef	Negative Factor
NVP	Nevirapina
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI	Inibidores da protease
pol	Polimerase
PR	Protease
PEC-PG	Programa de Estudante Convênio de Pós-Graduação
PTV	Prevenção da Transmissão Vertical
rev	Regulator of Virion gene expression
RTV	Ritonavir
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcriptase Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da Reacção da Polimerase em Cadeia
SIV	Do inglês, Vírus da Imunodeficiência Símia
SU	Proteína de superfície do envelope viral
TAMs	Mutações de resistência análogo à timidina
tat	Transcriptional Activator
TARV	Tratamento com antirretroviral
TDRM	Mutações transmitidas de resistência a drogas
TM	Proteína transmembrana
Uni-CV	Universidade de Cabo Verde
Unaid	Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/Aids
URF	Formas de Recombinantes Únicas
vif	Viral Infection Factor
vpr	Viral Protein r
vpu	Viral Protein u
vpx	Viral Protein x

I. INTRODUÇÃO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids), continua a ser um desafio no século XXI, mesmo após decorridos mais de 30 anos da sua descoberta (Barré-Sinoussi et al., 1983). As estatísticas em todo o mundo e em regiões específicas nos mostram o quão longe e grande é esse desafio. Apesar do conhecimento adquirido, meios de diagnóstico, tratamento e monitoramento cada vez mais potentes e acessíveis a pessoas e áreas anteriormente inacessíveis, o número de novos casos por dia supera o número de casos que iniciam o tratamento por dia. Desde a descoberta dos primeiros casos de aids no início dos anos 80, 65 milhões de pessoas contraíram o HIV em todo o mundo, das quais 25 milhões morreram. Segundo relatório anual da Unaid, no final de 2012, 35,3 milhões de pessoas viviam com o HIV, cerca de 8 milhões receberam tratamento antirretroviral, houve 2,3 milhões de novas infecções e 1,6 milhões morreram devido às complicações da doença (Unaid, 2013).

Sendo o continente africano, principalmente a África subsaariana, a região mais afetada pelo HIV a nível mundial, esforços têm sido feitos a fim de diminuir o impacto da aids nessa região. Assim, em sete anos, o número de africanos em tratamento com antirretrovirais passou de um milhão, em 2005, para 7 milhões, em 2012 e conseqüentemente com redução de mortes devido à aids em 32%, no mesmo período (UNAIDS, 2013a; Unaid.org, 2013). De modo geral, as crescentes campanhas de prevenção aliadas ao diagnóstico precoce, prevenção da transmissão vertical e o acesso ao tratamento, têm contribuído para um ligeiro, mas contínuo abrandamento no número de casos novos, da diminuição do número de crianças soropositivas e de mortes relacionadas à aids.

1.1) O Vírus

O HIV é um retrovírus da família Retroviridae, sub-família Lentivirinae e gênero *Lentivirus*, nome esse que caracteriza o comportamento do vírus, devido ao longo período existente entre a infecção e o desenvolvimento da doença causada pelo vírus (Haase, 1986). Os retrovírus são vírus RNA capazes de copiar seu genoma em uma dupla fita de DNA e integrar-se ao genoma da célula hospedeira, graças às enzimas Transcriptase Reversa (RT) e Integrase (IN) (Turner and Summers, 1999), respectivamente.

A partícula viral, de formato esférico tem um diâmetro de aproximadamente 90-120nm (Fig. 1). É formada pelo Envelope (env), constituído do mesmo material da membrana celular que engloba as glicoproteínas. Logo abaixo vem a matriz proteica envolvendo o capsídeo de formato cônico. O capsídeo por sua vez envolve o nucleocapsídeo, onde se encontra o genoma viral. O genoma do HIV é composto por duas cópias de RNA de fita simples positiva de 9,5kb de comprimento e nove genes com funções específicas, denominados *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu* ou *vpx* (no caso de HIV-1 e HIV-2, respectivamente) e *nef*, flanqueados por longas sequências terminais repetitivas (LTRs) (Girard et al., 2011; Sundquist and Kräusslich, 2012). Os genes responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e enzimáticas são, na ordem 5' - 3': *gag* (group-specific antigen), responsável pela codificação das proteínas da matriz, capsídeo e do nucleocapsídeo; *pol* (polimerase), que codifica as enzimas envolvidas na replicação e integração viral – Transcriptase Reversa (RT), Protease (PR) e Integrase (IN), e *env* (*envelope*), que codifica as glicoproteínas do envelope como a subunidade externa (gp120) e a subunidade transmembranar (gp41), que se associam de forma não covalente formando uma unidade trimérica na superfície do virion, *Tat* (Transcriptional Activator) e *rev* (Regulator of Virion gene expression.) são genes regulatórios e *vif*

(Viral Infection Factor), *vpr* (Viral Protein r), *vpu* (Viral Protein u) ou *vpx* (Viral Protein x) e *nef* (Negative Factor) são genes acessórios, essenciais à eficiente produção do vírus *in vivo* (Fig. 2) (Girard et al., 2011). Os LTRs são indispensáveis à integração do provírus no DNA da célula hospedeira (Turner and Summers, 1999).

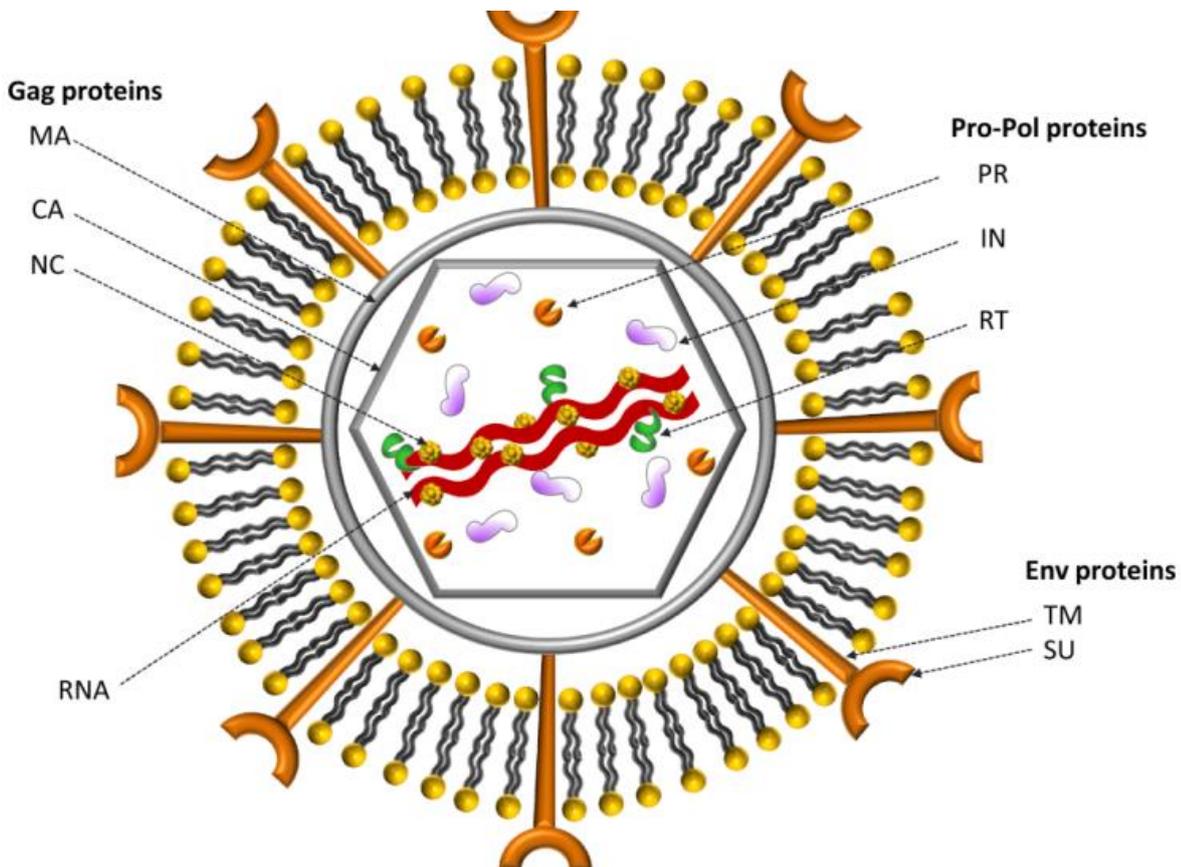


Figura 1. Estrutura do HIV destacando o RNA, as proteínas do Gag (MA: Matriz, CA: Capsídeo e NC: Nucleocapsídeo); Pol (Pro: Protease, IN: Integrase e RT: Transcriptase Reversa) e Env (TM: Transmembrana e SU: Superfície). Obtida a partir de Rodrigues, 2011 (Ana Rodrigues, 2011)

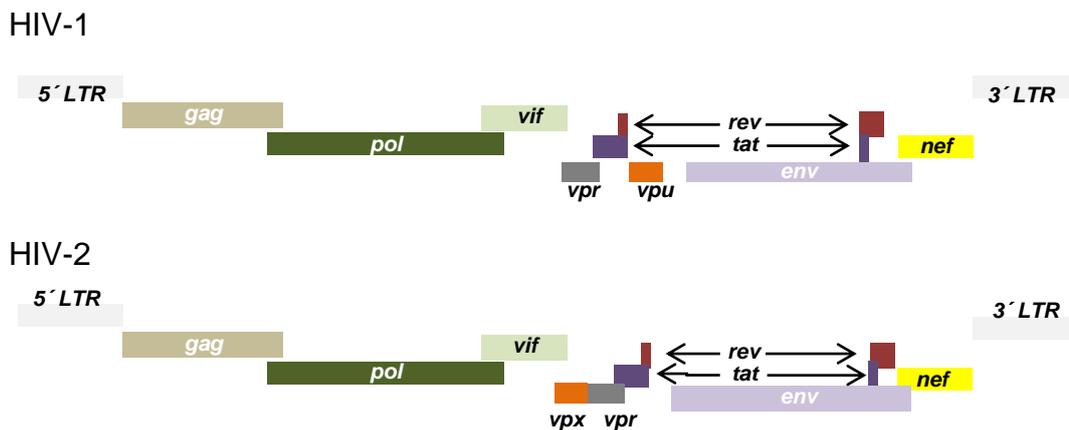


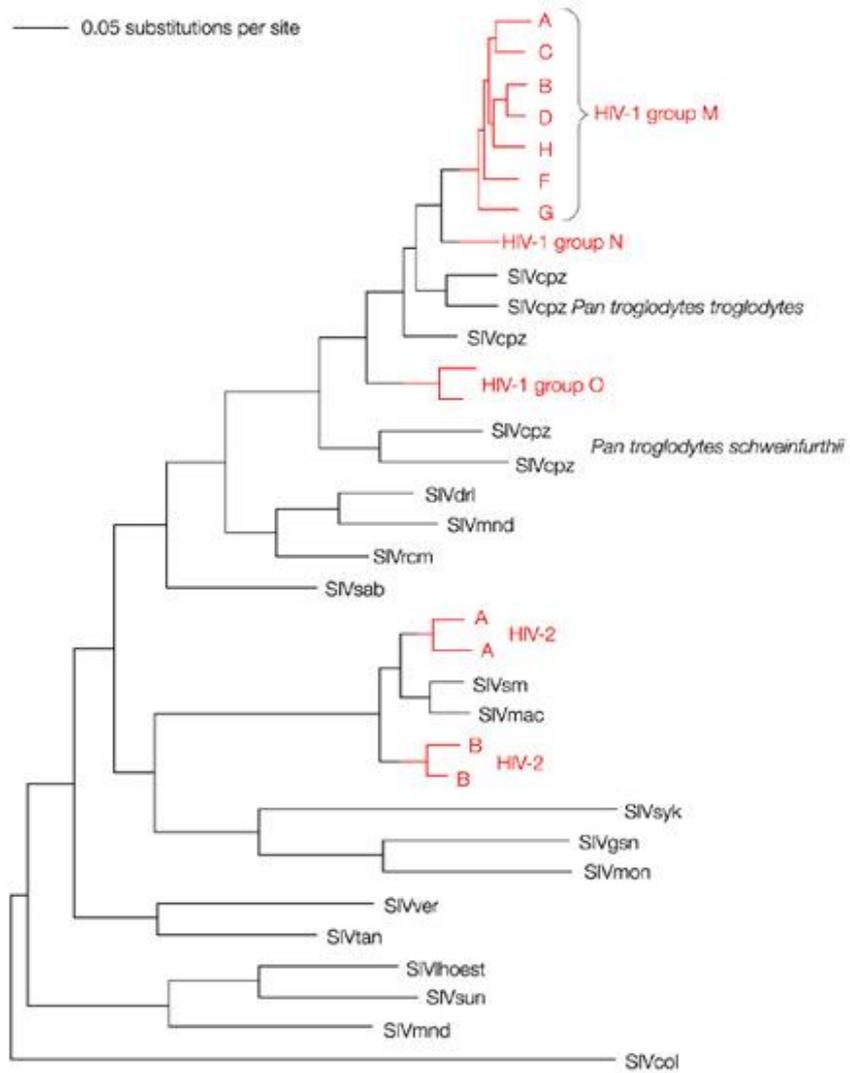
Figura 2. Representação do genoma viral do HIV-1 e HIV-2 destacando os genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), os genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu/vpx* e *nef*), os genes regulatórios (*rev* e *tat*) e a extremidade LTR's. Adaptado de Freed, 2004 (Freed, 2004).

1.1.1) Origem

A infecção pelo HIV é descrita como uma zoonose provocada por transferências de vírus que infectam primatas do continente Africano para o homem (Sharp and Hahn, 2011). A emergência do HIV na população humana é resultante de exposições e transmissões entre espécies do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) que infecta primatas não-humanos. Os principais primatas envolvidos nessa transmissão, estão representados na Figura 3 e são principalmente chimpanzés da espécie *Pan troglodytes troglodytes* e macacos da espécie *Cercocebus torquatus atys*, para HIV-1 e HIV-2 respectivamente (Wertheim and Worobey, 2009). Sendo assim, o HIV-1 é geneticamente mais próximo do SIV isolado do chimpanzé, com 75 – 85% de homologia, enquanto que o HIV-2 é geneticamente mais próximo do SIV isolado do Sooty mangabey, com 30 – 40% de homologia (Sharp and Hahn, 2011). No entanto, não está descartada a hipótese de ter havido hospedeiros intermediários entre chimpanzés e humanos.

A descoberta de novos métodos de análise e equipamentos cada vez mais sofisticados têm favorecido datações cada vez mais precisas quanto à origem do HIV. Por exemplo, Korber et al., com a utilização de supercomputadores e técnicas baseadas na evolução filogenética do vírus, estimaram que o HIV-1 grupo M teve sua origem em 1931 [1915-1941] (Korber et al., 2000). No entanto, quatro anos mais tarde, e na posse de metodologias ainda mais sofisticadas essa estimativa passa para 1908 (1884-1924), enquanto que para HIV-1 grupo O essa previsão é para 1920 (1890-1940) (Wertheim and Worobey, 2009). A estimativa de origem para o HIV-2A e B é de 1940 [1924-1956] e 1945 [1931-1959] respectivamente (Wertheim and Worobey, 2009). Estudos baseados em métodos de inferência através do relógio-molecular e baseado na observação de mudanças de nucleotídeos podem contribuir para determinar o momento em que houve a transmissão dos primatas não-humanos para o homem, tornando-se uma investigação primordial e prioritária em matéria de HIV/aids.

A África Oriental é considerada o epicentro da infecção pelo HIV-1 (Reeves and Doms, 2002). Os primeiros relatos de infecção pelo HIV-1 na África foram provenientes da África Oriental e Central (Le Guenno, 1989). Estudos apontam que o HIV-1 está presente na África Central desde o início do século XX, onde são encontrados praticamente todos os grupos e subtipos de HIV-1 e de onde emergiram no início da década de 30 (1931; IC 1915-1945) (Korber et al., 2000); e cerca de 50-60 anos após já se apresentava em praticamente todos os países do mundo. A África Ocidental é considerada o epicentro da epidemia pelo HIV-2, que parece estar presente nessa região desde meados do século XX, com foco em países como Guiné-Bissau, Cabo Verde, Gâmbia e Senegal (De Cock et al., 1993; Léonard et al., 1993; Marlink et al., 1994; Reeves and Doms, 2002).



Nature Reviews | Genetics

Figura 3. Árvore Filogenética SIV/HIV obtida a partir de Rambaut, 2004 (Rambaut et al., 2004)

1.1.2) Infecção e Replicação Viral

O HIV infecta uma grande variedade de células do sistema imune, entre elas os macrófagos, linfócitos T e células dendríticas, dentre outros tipos celulares, que apresentam o receptor celular denominado CD4⁺ expresso por essas células e moléculas denominadas de co-receptores (Balasubramaniam and Freed, 2011). O ciclo replicativo do HIV pode ser dividido em fases iniciais e tardias, como representado na Figura 4. A entrada do vírus na célula inicia-se com a adsorção da partícula viral através de duas glicoproteínas do envelope viral (Gp120 e Gp41). A Gp120 reconhece o receptor CD4⁺ na superfície da célula provocando mudanças conformacionais e recrutamento dos co-receptores da família das quimiocinas, que são, principalmente, as moléculas denominadas CCR5 e CXCR4, essenciais para a adsorção e entrada do vírus na célula. A seguir, a gp41 efetua a fusão das membranas viral e celular, propiciando a introdução do capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, a replicação do HIV é idêntica aos demais retrovírus conhecidos. A transcriptase reversa transforma o RNA em DNA complementar (cDNA), que é transportado para o núcleo e se integra ao genoma da célula hospedeira pela ação da enzima Integrase, produzindo assim o provírus (Girard et al., 2011). Esse, por sua vez, prossegue os passos até a produção de uma nova partícula viral ou pode permanecer latente, fato esse relacionado à não ativação das células T, tendo as células hospedeiras como reservatórios. Esses reservatórios, compostos por linfócitos TCD4⁺, recentemente demonstrados como sendo, principalmente, de fenótipo de memória central (Stockinger et al., 2006), monócitos, macrófagos e células dendríticas, são encontrados no tecido linfóide. No entanto, outras células do sistema nervoso central, gastrointestinal e urogenital masculino podem servir como reservatórios virais.

Para produção de nova partícula viral é necessário a ativação celular para que haja transcrição do genoma viral. O gene *tat* codifica uma proteína transativação que impede a cessação prematura do provírus transcrito através da ligação da extremidade 5' das moléculas de RNAm, aumentando a produção de RNAm (Girard et al., 2011). Estes são transportados para o citoplasma com auxílio da proteína *rev* e traduzidos pelos ribossomos. O gene *rev* codifica uma proteína que se liga a um elemento de sequência específica, o que permite o seu transporte a partir do núcleo para o citoplasma, e a expressão das proteínas estruturais *gag*, *pol* e *env*. *Rev* controla, assim, a chave a partir de uma fase precoce do ciclo, quando apenas proteínas reguladoras são sintetizadas, para uma fase tardia, quando as proteínas estruturais são sintetizadas e há produção de vírions (Girard et al., 2011). Essas proteínas interagem entre si iniciando a montagem do vírion e o seu brotamento. A maturação da partícula viral acontece após rearranjo das proteínas virais e alterações conformacionais induzindo à ativação da protease, responsável por clivar as poliproteínas precursoras *gag-pol*, indispensáveis para que essa partícula tenha capacidade infectiva (Turner and Summers, 1999).

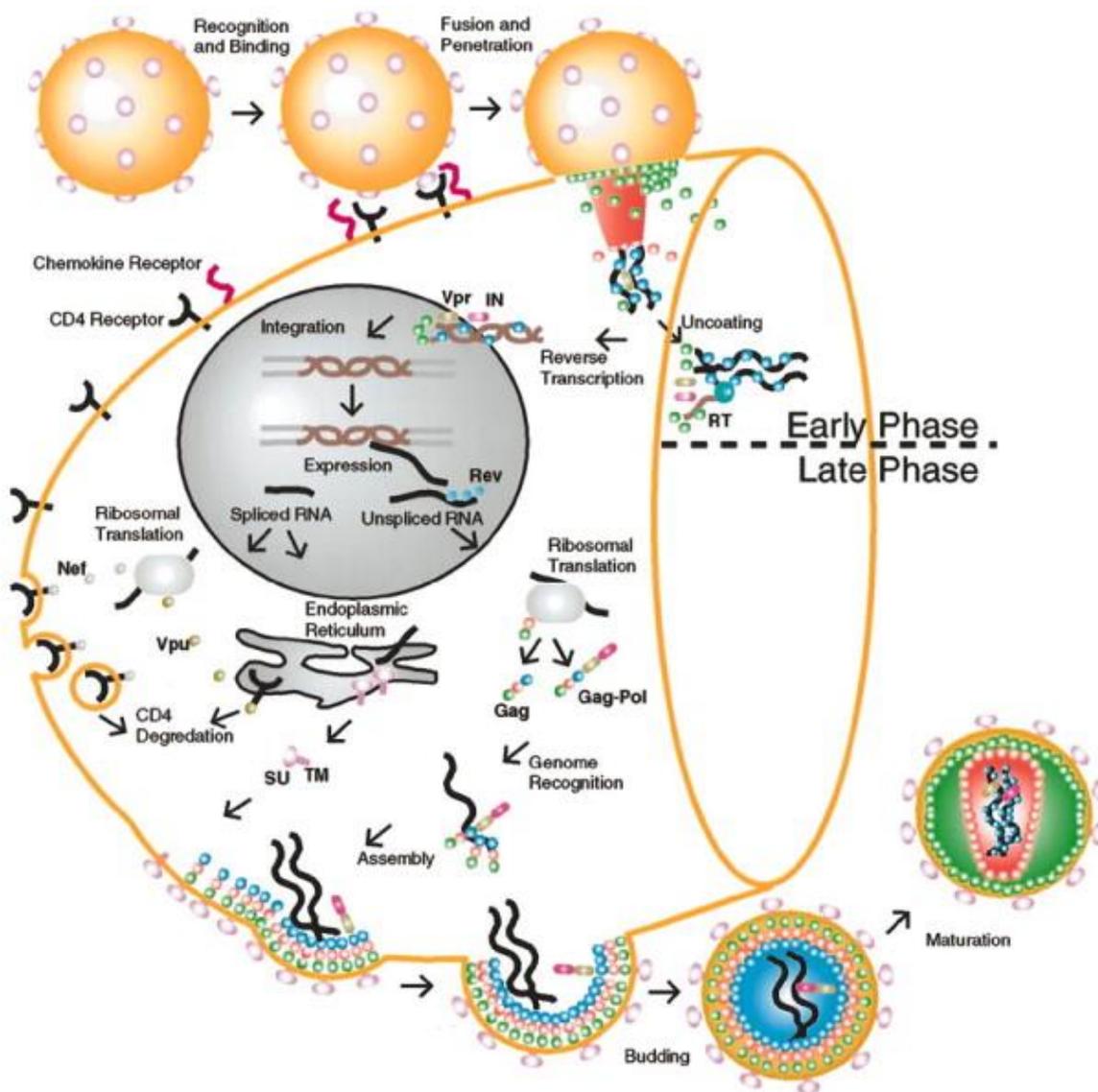


Figura 4. Ciclo Replicativo do HIV representando as fases iniciais e tardias da replicação viral. obtida a partir de Turner & Summers, 1999 (Turner and Summers, 1999)

1.1.3) Patogenia

A história natural da infecção pelo HIV é caracterizada por um quadro de síndrome viral aguda – Fase aguda; por um período assintomático – Fase assintomática ou Latência Clínica, e por um período de doença – Fase Sintomática (Fauci et al., 1996). A diferença no comportamento nessas três fases da infecção levou à classificação de 3 modelos de progressão para a doença entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, nomeados de progressores rápidos – que constituem cerca

de 10 a 15% dos infectados e progridem para aids num período de 2 a 3 anos; progressores típicos – que constituem a maioria dos indivíduos infectados (70 – 80%) e possuem um tempo de latência entre a infecção e os sintomas da doença entre 6 a 8 anos; e os não-progressores representando 5% dos casos, constituídos por indivíduos que permanecem assintomáticos por períodos longos (10 a 15 anos de infecção) (Fauci et al., 1996). Em relação ao HIV-2, sabe-se que a progressão para a doença ocorre naturalmente de forma mais lenta em relação ao HIV-1, sugerindo que indivíduos não-progressores são a maioria entre os infectados pelo HIV-2 (Nyamweya et al., 2013).

Na primeira fase da infecção, denominada de síndrome viral aguda, há uma rápida depleção de linfócitos TCD4⁺, que rapidamente é recuperada e poderá ocorrer síndrome febril (Girard et al., 2011). Diferentemente de muitos outros vírus em que a infecção induz a uma imunidade protetora persistente, no HIV, a resposta imune da fase aguda não é capaz de eliminar o vírus (Girard et al., 2011). Logo após inicia-se um período assintomático extenso, que pode variar entre 2 a 10 ou mais anos. Essa fase é caracterizada por valores normais de CD4⁺ e replicação viral mínima num primeiro momento. Sabe-se, no entanto, que nessa fase há infecção de novas células CD4⁺ e outras células do sistema imune, causando uma replicação viral acentuada e conseqüentemente infecção e perda gradual de linfócitos TCD4⁺ (Girard et al., 2011). Após este período inicia-se então a Fase Sintomática, pois a depleção imunológica provocada contribui para a perda da imunidade celular e, conseqüentemente, o aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias levando à fase de doença (Girard et al., 2011). A Figura 5 representa de forma esquemática essas fases. A introdução cada vez mais precoce da terapia antirretroviral tem contribuído sobremaneira para alterar essa história natural, permitindo um controle

precoce da replicação viral, manutenção da imunidade e redução da morbidade e mortalidade na infecção pelo HIV (Cohen et al., 2012; Montaner et al., 2014).

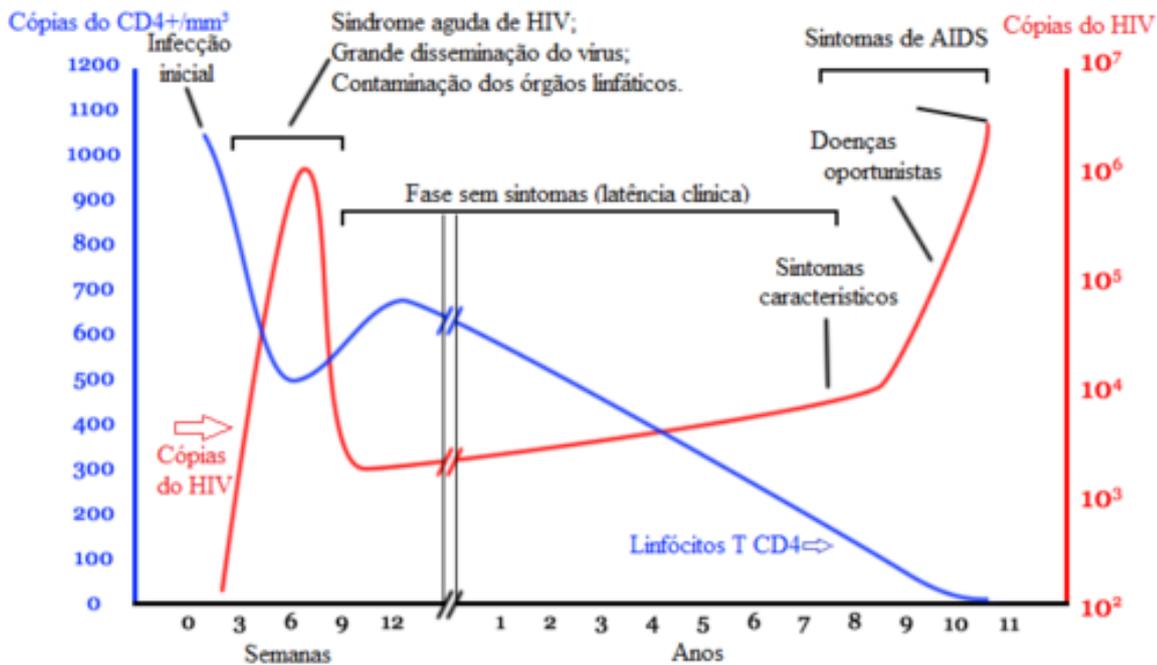


Figura 5. Curso clínico da infecção pelo HIV evidenciando a fase aguda, a latência clínica e a fase sintomática. Adaptado de Pantaleo et al., 1993 (Pantaleo et al., 1993)

1.1.4) Transmissão

A transmissão do HIV se dá por fluídos orgânicos nomeadamente sangue e seus derivados, esperma, fluido vaginal e leite materno. As principais vias de transmissão são a sexual e vertical (mãe – filho).

A transmissão através de transfusão de sangue e seus derivados, manipulação e uso de materiais infectados e acidentes com materiais contaminados, tiveram grande impacto no número de casos novos de HIV no início da epidemia, quando ainda era insípido o conhecimento das vias de transmissão e dos meios de diagnóstico. O rastreio em Bancos de Sangue, o uso de material estéril e de

proteção individual em caso de manuseio de sangue e outros fluidos biológicos foram formas eficazes na prevenção da transmissão do HIV em grande escala. O uso de preservativos nas relações sexuais, as campanhas de Informação, Educação e Comunicação (IEC) para a prevenção massivamente levada a cabo em todas as regiões e atingindo todas as pessoas e ao mesmo tempo priorizando grupos com maiores vulnerabilidades, foram essenciais para o maior conhecimento da nova epidemia e conseqüentemente um agir responsável que minimiza a transmissão. Simultaneamente, programas de Prevenção da Transmissão Vertical (PTV) foram assumidos como prioridade por governos e países, facilitando o rastreamento da infecção durante a gravidez e priorizando medidas e tratamento que evitem a transmissão de mãe para o recém-nascido. Mais recentemente, o tratamento antirretroviral, como medida de prevenção da transmissão sexual, por diminuir a carga viral e conseqüentemente a capacidade de transmissão (Cohen et al., 2012), tem sido adotado e encorajado por várias organizações e países (UNAIDS, 2013b).

1.2) Diversidade e Epidemiologia Molecular

Sendo um vírus RNA, o HIV tem alta taxa de variabilidade genética e antigênica, principalmente devido à frequência de replicação e a falta de correção da RT, elevando a taxa de mutação e de recombinação por ciclo viral. Outro fator descrito que contribui no incremento da diversidade genética do HIV-1 é a ação das APOBECs principalmente a APOBEC3G. Sabe-se que o DNAc sofre deaminação por ação das APOBECs, levando à hipermutação G → A do DNAc viral, que se acumula ao longo do genoma viral (Mangeat et al., 2003; Zhang et al., 2003). Devido a sua grande variabilidade, associado, entre outros fatores, a diferentes eventos zoonóticos, várias cepas são encontradas ao redor do mundo, o que obrigou, em 1993, o estabelecimento de uma classificação filogenética dos dois vírus. A

classificação atual de HIV com base nos genomas virais completos foi proposta em 2000, agrupando-as em dois tipos, o HIV-1 e HIV-2.

As amostras que pertencem ao tipo mais comum, o HIV-1, são divididas em quatro grupos, M, N, O e P (Vallari et al., 2011). No grupo M, responsável pela pandemia, as amostras são divididas em nove subtipos (AD, FH, J e K) sete sub-subtipos (A1-A5, F1-F2), e um grande número de formas recombinantes Circulantes (CRFs) (Brian Foley and Korber, 2013). As CRFs são atualmente representadas por 61 formas, que têm o mesmo padrão genético, com segmentos correspondentes a diferentes subtipos ou mesmo CRFs, e estão presentes em pelo menos três indivíduos não relacionados epidemiologicamente (Brian Foley and Korber, 2013). Além dos CRFs, a grande maioria das linhagens recombinantes identificadas corresponde a Formas Recombinantes Únicas (URF), as quais são bastante frequentes em regiões onde mais de um subtipo circulam. Os subtipos têm distribuição geográfica específica e seu papel na transmissão e patogenicidade é objeto de discussão.

Já o HIV-2 é classificado em grupos de A a H (Damond et al., 2004; Sharp and Hahn, 2011). Apenas os grupos A e B do HIV-2 estão bem caracterizados, sendo o HIV-2A aquele melhor caracterizado, tratando-se da variante circulante que predomina na África Ocidental (Faria et al., 2012; Peeters et al., 2013). Somente um recombinante CRFR01_AB (Ibe et al., 2010) foi descrito e recentemente uma nova linhagem numa amostra da Costa do Marfim foi caracterizado (Ayoub et al., 2013).

Esse amplo espectro de variantes genéticas está em constante expansão, como consequência da alta taxa de evolução do HIV. A análise da evolução de HIV-1 em várias populações tem mostrado um aumento progressivo da distância entre as variantes genéticas contemporâneas (diversidade intra-população), bem como o vírus que causa a doença original em função do tempo (divergência intra-população)

(Abebe et al., 2001; Korber et al., 2000; Kuiken et al., 1993; Leitner and Albert, 1999; Lemey et al., 2003; Li et al., 1988; Liu et al., 2004; Lukashov and Goudsmit, 1997; Robbins et al., 2003; Salemi et al., 2001; Sharp et al., 2001; Yusim et al., 2001). A taxa de divergência intra-população com base na região do *env*, considerada a mais variável do genoma do HIV foi estimada em cerca de $1,0 \times 10^{-3}$ substituições/local/ano, cerca de cinco milhões de vezes mais rápida do que a taxa média de desenvolvimento dos genes nucleares de mamíferos (Drummond et al., 2005; Li et al., 1988). Esta rápida evolução de HIV-1 provoca a ocorrência de populações virais cada vez mais complexas, e dentro de cada região, dificultando o diagnóstico, a produção de drogas eficazes como na probabilidade de obtenção de uma vacina eficaz contra o HIV.

Por outro lado, a ocorrência de novas variantes do HIV se deve à extensa migração das populações através das atividades de trabalho, turismo e guerras (deslocamentos militares), entre outros, contribuindo com a contínua dispersão de novas variantes a populações mais distantes. Por exemplo, a presença de diferentes subtipos virais e formas recombinantes, predominantes no continente africano têm sido identificadas em indivíduos soropositivos em Cuba, cujas introduções são atribuídas a participação de soldados cubanos em Angola durante as décadas de 70 e 80, assim como às missões de ajuda humanitária realizadas por Cuba em diferentes países do continente africano (Cuevas et al., 2002; Thomson et al., 2005). Estes fatos representam exemplos claros de como os tipos, subtipos e CRFs do HIV são transportados e podem potencialmente se estabelecer em novas regiões, assim como se recombinarem com variantes virais previamente existentes que, em associação com a alta taxa de evolução viral, contribuem para ampliar a diversidade do HIV no mundo.

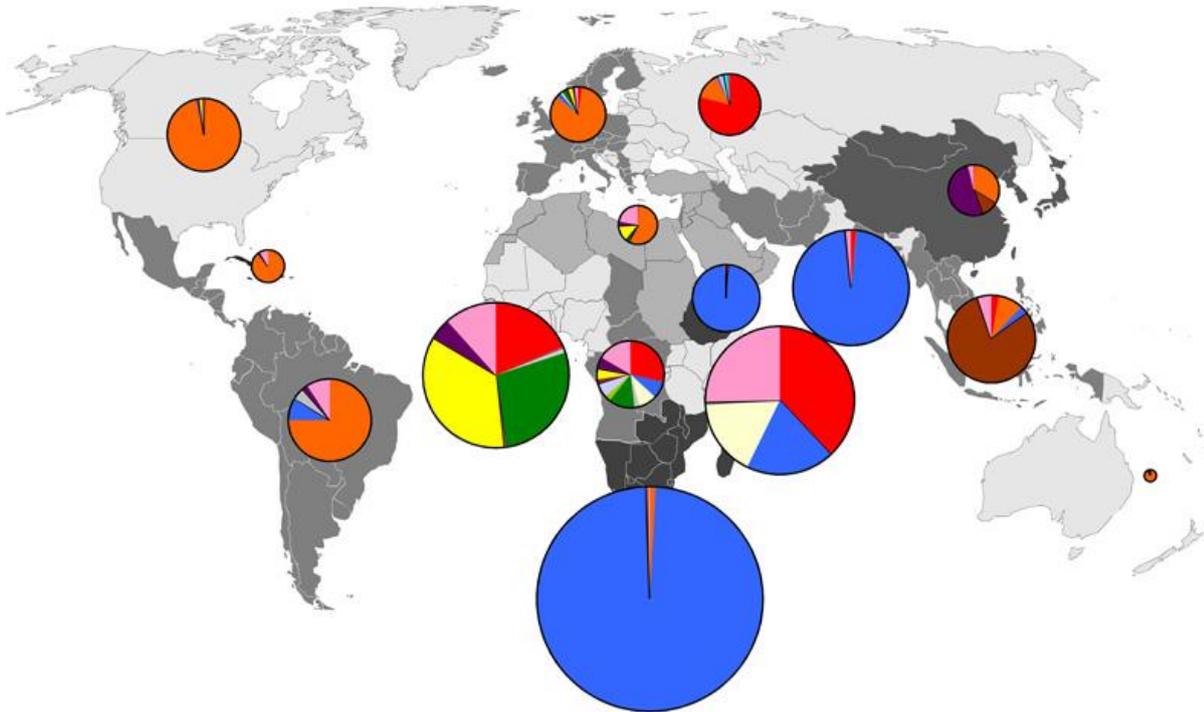
Em relação à distribuição dos subtipos de HIV-1, a nível mundial o subtipo C perfaz cerca de 48% do total das infecções diagnosticadas, seguidos do subtipos A e B (12%), CRF02_AG (8%), CRF01_AE (5%), subtipo G (5%) e D (2%), como representado na Figura 6. Os demais subtipos F, H, J and K não contribuem com mais de 1% do total das infecções. Outros CRFs e URFs contribuem com 4% cada no total das infecções, podendo chegar a 16% quando combinados todos os CRFs e a 20% quando somados todos os recombinantes (CRFs e URFs) (Hemelaar et al., 2011).

No continente africano, assim como em outros continentes, o HIV-1 é o principal responsável pela epidemia de aids, onde circula praticamente todos os subtipos de HIV-1 descritos, sendo o subtipo C a forma predominante, devido à contribuição do sul da África, onde a maioria das infecções é devido a este subtipo (Fig. 6) (Hemelaar et al., 2011). À exceção dessa região, a maioria das infecções é devida ao subtipo A, seguido do CRF02_AG e subtipo G (Fig. 6) (Hemelaar et al., 2011). O subtipo B, embora seja o mais prevalente na Europa Ocidental, no continente americano e na Oceania, é pouco encontrado no continente Africano (Fig.6). A grande variedade de subtipos de HIV-1 circulantes no Congo, a alta diversidade intra-subtipos e o alto número de recombinações possíveis do vírus, tal como as diferentes cepas não classificadas, são fatos que demonstram o quão antiga e madura é a epidemia nessa região, sugerindo que ela seja o epicentro da disseminação do HIV-1 grupo M (Vidal et al., 2000). Os grupos O, N e P do HIV-1 por sua vez, são encontrado principalmente na África Central e em indivíduos originários de Camarões (Ayoub et al., 2001; Plantier et al., 2009; Roques et al., 2004).

A África Ocidental é considerada o epicentro da epidemia pelo HIV-2, que parece estar presente nessa região desde meados do século XX, com foco em

países como Guiné-Bissau, Cabo Verde, Gâmbia e Senegal (De Cock et al., 1993; Léonard et al., 1993; Marlink et al., 1994; Reeves and Doms, 2002). O HIV-2 é encontrado também na Costa do Marfim, Benin e países como Angola e Moçambique, que embora localizados mais ao Sul são países com contatos estreitos com Cabo Verde e Guiné-Bissau, principalmente por terem tido os mesmos colonizadores (Léonard et al., 1993; Markovitz, 1993).

A. 2000-2003



B. 2004-2007

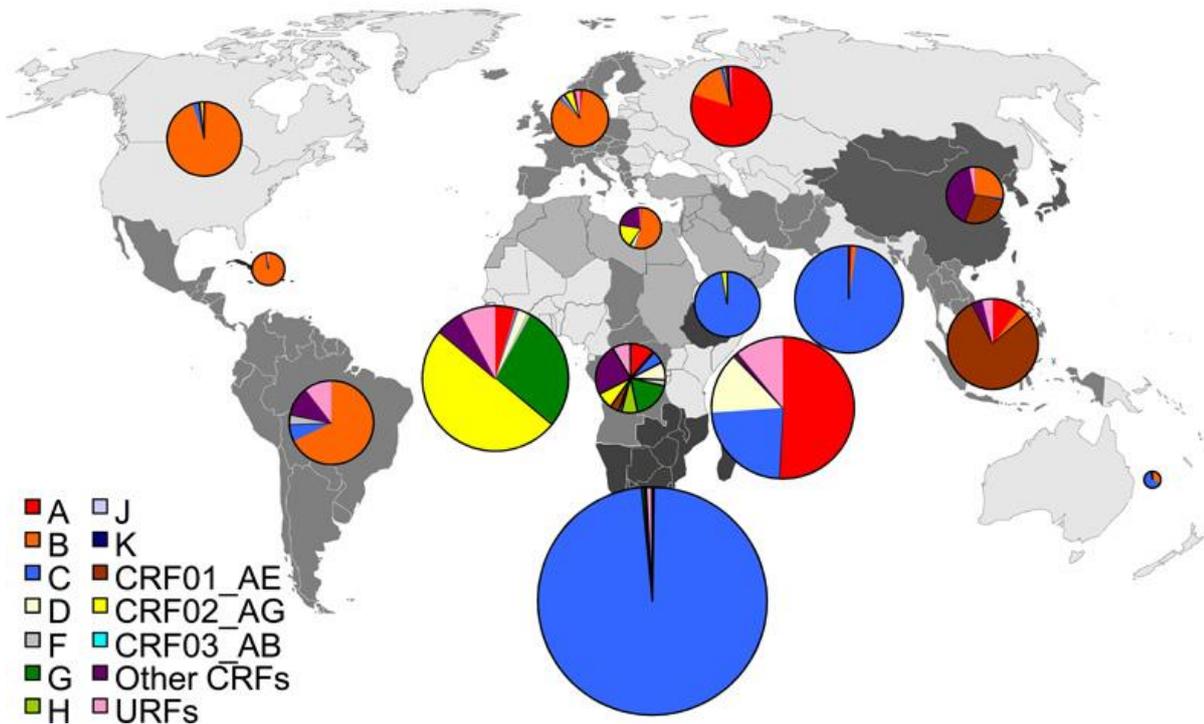


Figura 6. Distribuição Mundial dos subtipos e formas recombinantes do HIV-1.

Obtida a partir de Hemelaar, 2011 (Hemelaar et al., 2011)

1.3) Tratamento e Resistência

Desde a descoberta do HIV o desenvolvimento de drogas antirretrovirais tem sido alvo de inúmeras investigações, tanto por parte de centros de pesquisas governamentais, como por parte da indústria farmacêutica. Em alguns momentos isso tem gerado disputas e quebra de patentes, como forma de garantir acesso e eficiência no tratamento, como medida de interesse em saúde pública.

O tratamento antirretroviral, atuando em diferentes etapas do ciclo de replicação do vírus, bloqueia a replicação viral e, conseqüentemente, a infecção de novas células do sistema imune e o seu conseqüente comprometimento, reduzindo a morbidade e a mortalidade dos pacientes infectados pelo HIV. De fato, um ano após a descoberta do HIV/aids, estudos pioneiros já demonstravam o aumento no número de linfócitos TCD4+ circulantes após 6 semanas de tratamento com AZT (Yarchoan et al., 1986). Isso fez com que o primeiro medicamento autorizado para tratamento da infecção fosse a Zidovudina (AZT), um Inibidor Nucleosídico da Transcriptase Reversa (NRTI). As primeiras drogas comerciais contra o HIV tinham como alvos a Transcriptase Reversa e, logo a seguir, a Protease, impedindo a replicação e maturação viral e, conseqüentemente, a infecção de novas células. A introdução em meados da década de 90 da terapia combinada com 3 ou mais drogas atuando em diferentes alvos do ciclo de replicação viral, denominada “Terapia Antirretroviral Altamente Ativa” mais conhecida como HAART, sigla em inglês de Highly Active Antiretroviral Therapy, teve um grande impacto na diminuição da mortalidade e morbidade devido à aids (Menéndez-Arias, 2013).

Atualmente existem 29 drogas antirretrovirais em uso aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) nos Estados Unidos (Tang and Shafer, 2012). Essas drogas têm como alvos de atuação fases e mecanismos essenciais da replicação viral, tanto atuando no próprio vírus como na célula hospedeira e podem ser

classificadas em seis classes de drogas, a saber: Inibidores Nucleosídeos/Nucleotídeos da enzima transcriptase reversa (NRTI), Inibidores Não-Nucleosídeos (NNRTI), Inibidores da protease (PI), Inibidores da integrase (INI), Inibidores de Entrada e de Fusão.

A RT é a enzima responsável por converter o RNA viral de fita simples em DNA de fita dupla, capaz de se integrar no genoma da célula infectada (Menéndez-Arias, 2013). Os NRTI atuam como inibidores competitivos, ou substratos alternativos, mimetizando um nucleosídeo ou nucleotídeo, durante ligação e incorporação na cadeia nascente de DNA, impedindo a formação do DNA viral. Já os NNRTI são pequenas moléculas hidrofóbicas que atuam como inibidores alostéricos da TR, ligando-se diretamente a bolsa hidrofóbica próxima ao sítio ativo da enzima, impedindo que a RT reconheça o RNA viral. Os PI reproduzem peptídeos virais capazes de se ligarem ao sítio ativo da PR, inibindo sua ação de processamento da poliproteína *gag-pol* e, conseqüentemente a maturação viral. Os INI ligam-se à IN e bloqueiam a integração do DNA viral no genoma da célula infectada. Os inibidores de Fusão e Entrada são peptídeos que atuam interagindo, respectivamente, com a gp41 da superfície viral bloqueando sua ação ou são antagonistas do CCR5, ligando-se ao CCR5 na superfície da célula hospedeira (von Recum and Pokorski, 2013)

Segundo normas da Organização Mundial da Saúde (OMS) é indicado o tratamento a qualquer indivíduo infectado pelo HIV-1 com contagem de CD4 inferior a 350 cels/mm³ (Organization, 2010). O tratamento deve iniciar com um esquema chamado de primeira linha, normalmente composto por duas drogas NRTI + 1 NNRTI. Em caso de falha terapêutica, intolerância ou infecção por vírus já resistente, pode-se optar pelo regime de segunda linha, que inclui duas drogas NRTI + 1 PI. A

terceira linha é indicada para pacientes que falham ou não toleram o tratamento de segunda linha e pode incluir NRTI, NNRTI e PI.

A infecção pelo HIV-2 coloca-se como um desafio e implica normas diferenciadas no tratamento. O maior tempo de fase de latência em relação ao HIV-1, dificuldades na detecção e avaliação da carga viral, ausência ou número incipiente de ensaios clínicos e estudos observacionais específicos, são condições que dificultam o manejo dos pacientes infectados pelo HIV-2. No entanto, características intrínsecas ao vírus, que o fazem naturalmente resistente aos NNRTI e inibidores de fusão, e que os IP em uso para a infecção pelo HIV-1 se mostram fracos ou sem atividade inibitória frente ao HIV-2, são condições que dificultam o tratamento. Além disso, em pacientes infectados pelo HIV-2 a seleção de mutações de resistência acontece mais rapidamente do que em HIV-1 (Menéndez-Arias and Alvarez, 2014).

O tratamento com antirretrovirais tem contribuído para uma maior sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, pois diminui tanto a mortalidade como a morbidade. Além da diminuição das infecções oportunistas, devido à reconstituição e manutenção da resposta imune, o uso de ARV contribui também para a diminuição da transmissão por todas as vias conhecidas. A forma de atuação das diferentes drogas está ilustrada na Figura 7.

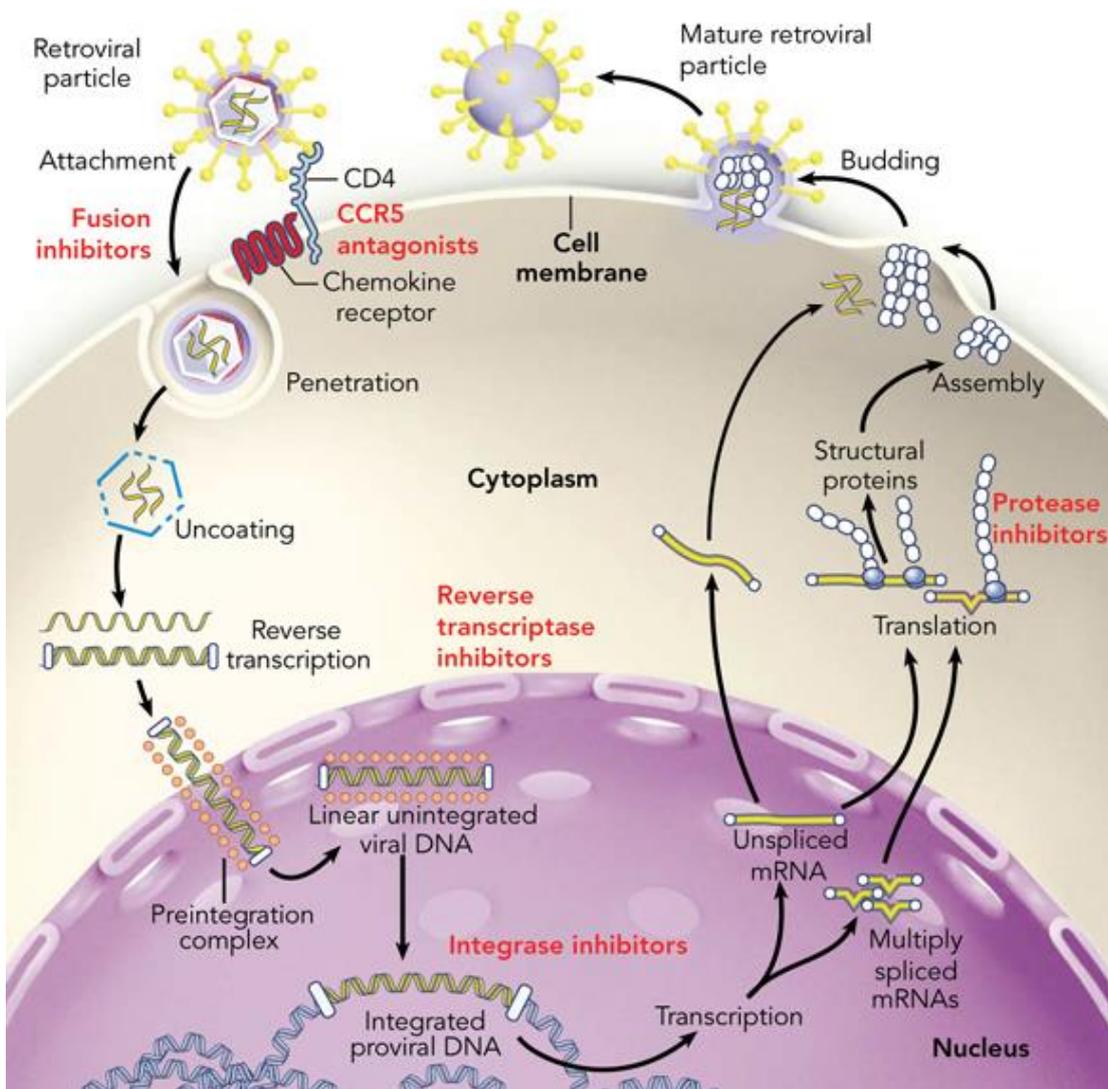


Figura 7. Alvos terapêuticos dos Antirretrovirais. São apresentados as cinco classes de antirretrovirais e os alvos de atuação. Obtida a partir de Chen et al., 2007 (Chen et al., 2007)

Os benefícios e o sucesso do tratamento podem ser comprometidos por outros fatores intrínsecos e extrínsecos ao paciente. A sensibilidade e tolerância aos princípios ativos de cada medicamento, os efeitos tóxicos dos mesmos, a forma e requisitos de administração e a posologia são informações que podem reduzir a adesão e regularidade no tratamento e conseqüentemente a sua eficácia. A intolerância aos fármacos e a descontinuidade no tratamento são condições que

favorecem e podem levar ao aparecimento de vírus resistentes aos antirretrovirais, levando à falha no tratamento e conseqüentemente aumento da carga viral, depleção dos linfócitos TCD4⁺ e aparecimento das infecções oportunistas.

A resistência ao tratamento consiste na redução ou perda da capacidade de atuação dos fármacos nos seus respectivos alvos da replicação viral, impedindo o surgimento de novas partículas virais. A pressão seletiva exercida pelos fármacos, acoplada à especificidade do HIV em produzir polimorfismos, faz com que haja falhas durante o ciclo replicativo, produzindo variantes virais resistentes aos fármacos usados.

A alta taxa de mutação do HIV, chegando a um nucleotídeo por ciclo replicativo, e a estimativa de que cerca de 10^{10} virions são produzidos por dia em indivíduos infectados isentos de tratamento, revela a quantidade de quasispécies virais produzidas, acentuada também pela alta taxa de recombinação entre as diferentes variantes que infectam uma célula. Essas mutações ocorrem em todo o genoma, incluindo nos sítios alvos da terapia e, na presença da droga, estas variantes podem ser selecionadas. É rara a ocorrência de mutações resistentes a drogas na ausência de pressão seletiva dos ARV (Tang and Shafer, 2012).

As mutações de resistência são classificadas em primárias, quando essa mutação por si só reduz ou bloqueia a susceptibilidade do vírus à droga. Já as mutações acessórias não causam resistência a drogas por si só, mas indicam a presença da pressão seletiva pelas drogas e que a população viral está evoluindo para resistência (Morand-Joubert et al., 2006). Resistência a drogas é hoje o principal fator que contribui para a falha terapêutica (Menéndez-Arias, 2013), colocando-nos o desafio da necessidade de monitoramento contínuo dos pacientes, a fim de que sejam detectadas mutações, o quanto antes, que podem conferir resistência a ARV. Essas mutações podem surgir tanto devido à pressão seletiva

provocada pelo uso dos ARV (resistência adquirida), como podem ser adquiridas pela transmissão de cepas já resistentes (resistência transmitida), dificultando ainda mais a adesão e uma combinação favorável de tratamento. Esse monitoramento se torna ainda mais urgente em situações e países com poucos recursos, onde a oferta de ARV é limitada e a ruptura de estoque dos mesmos acontece com frequência (Tang and Shafer, 2012). Adesão, tolerância e toxicidade, constituem as principais limitações para o uso adequado da terapia, apesar dos avanços e esforços na melhoria da potência, segurança e simplificação das doses necessárias (Menéndez-Arias, 2013). Resistência aos antirretrovirais tem sido descrita para todas as classes existentes. As mutações de resistência mais frequentes são as que causam resistência aos inibidores da RT e PR. No caso dos NRTI as mais comuns são: M184I e M184V que conferem alto nível de resistência à 3TC e FTC e às denominadas “Mutações de resistência ao análogo de timidina” conhecida por TAMs, da sigla em inglês “thymidine analogue resistance mutations”, normalmente causadas pelo uso de AZT e d4T (Menéndez-Arias, 2013). NNRTI de primeira geração, tais como nevirapina e efavirenz, que possuem uma baixa barreira genética de resistência, sendo uma das mutações mais frequentes a K103N (Menéndez-Arias, 2013).

A resistência transmitida se coloca como um desafio, principalmente em situações onde o tratamento está disponível em larga escala, mas não a infraestrutura para a genotipagem. Altas frequências de mutações de resistência entre pacientes virgens de tratamento podem implicar na inutilidade do uso de antirretrovirais nesses pacientes, como acontece em outras doenças como a malária (Pennings, 2013). Apesar dessa possibilidade, a frequência de mutações de resistência transmitida baixa é variável, situando-se entre 7 a 17% entre os casos novos diagnosticados em países desenvolvidos e abaixo de 7% entre os pacientes

de desenvolvimento médio e baixo (Ayoub et al., 2009; Price et al., 2011; Ssemwanga et al., 2012; Tang and Shafer, 2012). Segundo a classificação da OMS, três níveis de resistência transmitida são propostos (baixo: <5%, intermediário: 5-15% e alto: >15%) servindo de base para estabelecimento de políticas públicas locais para seu monitoramento e controle (Organization, 2012). As mutações transmitidas mais comumente encontradas conferem resistência principalmente aos NRTI e NNRTI, sendo menos comum entre os PIs (Pennings, 2013). Segundo Gupta e cols, não existe uma correlação entre a alta taxa de mutações de resistência entre os pacientes em tratamento (resistência adquirida) e entre os pacientes virgens de tratamento (resistência transmitida), mas tem sido descrito aumento de resistência transmitida após implementação da ART (Gupta et al., 2012). Apesar da maior frequência de TDRM nos países desenvolvidos em relação aos menos desenvolvidos, o impacto é menor nos países desenvolvidos devido à prática do teste de genotipagem em pacientes recentemente diagnosticados. Com isso, há possibilidade de que haja uma escolha ideal de drogas para tratamento, diminuindo a morbidade e aumentando a sobrevida e qualidade de vida do infectado (Wittkop et al., 2011). Em situações em que a genotipagem não está disponível em grande escala e para pacientes virgens de tratamento, há risco de que a combinação de ARV seja ineficiente para diminuição da carga viral, além do fato que, normalmente nessas condições, são poucos os medicamentos de 2ª linha disponíveis (Pennings, 2013). Por isso, torna-se recomendável o teste de genotipagem em pacientes recentemente infectados e/ou virgens de tratamento antes do início da terapia com antirretroviral.

1.4) Cabo Verde

Cabo Verde é um arquipélago localizado no Oceano Atlântico, a 445 quilômetros da costa Ocidental Africana (Fig. 8), "achado" por exploradores portugueses em 1460 sem presença humana. Europeus livres e os escravos trazidos da costa africana formaram o povo caboverdeano. A independência do arquipélago foi em 5 de julho de 1975. Em 2010 a população era de 491.875 habitantes - uma população jovem, com uma idade média de 26,8 anos (Verde, 2010). Tem uma densidade populacional de 100 habitantes/Km², sendo as ilhas de Santiago e S. Vicente as mais populosas. A taxa de crescimento médio anual da população passou de 1,4% em 2000 para 1,2 em 2013 e a taxa bruta de mortalidade de 5,8/1000 para 5,05/1000. A esperança de vida à nascença foi estimada em 2011, em 74,16 anos. A fecundidade tem decrescido lentamente, situando-se em 2011 em 2,37 filhos por mulher (Estatística, 2013). O português é a língua oficial, mas a língua nacional é o crioulo cabo-verdiano, que foi definida na constituição de 1999 como língua co-oficial em construção e em paridade com a língua portuguesa. O clima é tropical seco, com chuvas irregulares entre agosto e outubro, sendo aos restantes meses do ano o período seco. Possui uma rica fauna e flora, caracterizada por suas espécies endêmicas. A fauna e a flora marinha são muito abundantes, além de constituir rota de migrações de várias espécies. Na dimensão sociopolítica o país destaca-se pela sua estabilidade econômica e ausência de qualquer tipo de conflito (Verde, 2014).

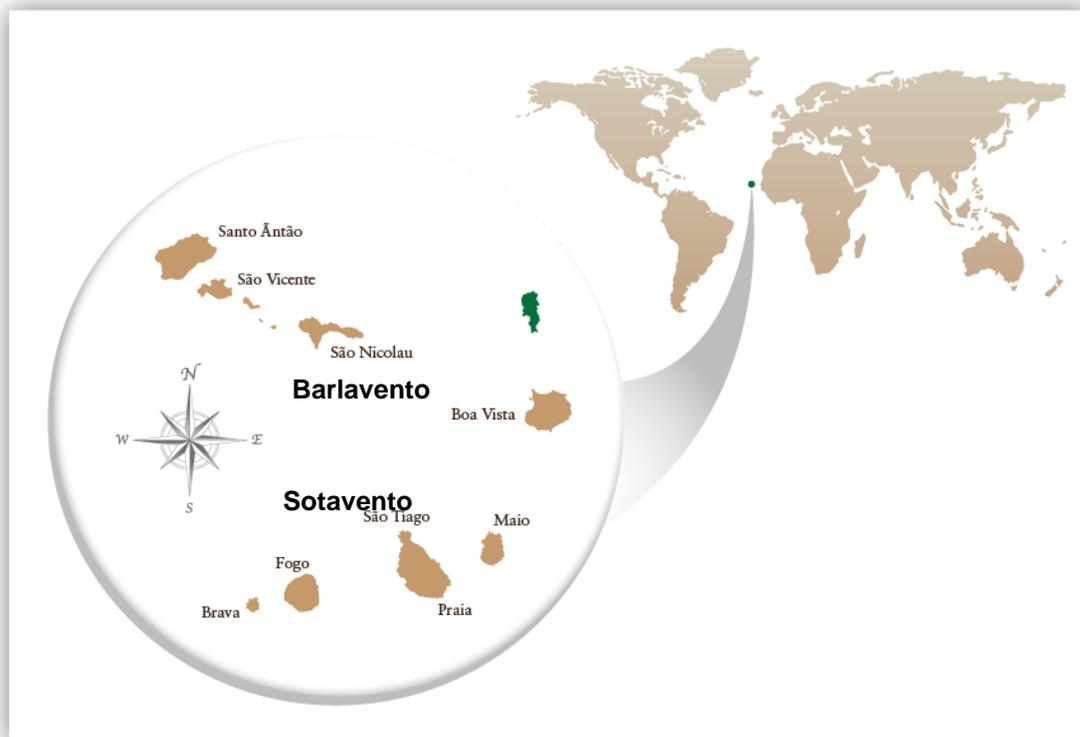


Figura 8. Localização e distribuição das ilhas de Cabo Verde

1.4.1) Características Geográficas e sociodemográficas

Com uma superfície de 4.033 Km², o país é composto de 10 ilhas e 8 ilhéus, que se dividem em dois grupos, consoante a posição das ilhas relativamente aos ventos Alísios do continente. Assim, o grupo de Barlavento é composto pelas ilhas de Santo Antão, S. Vicente, Santa Luzia (desabitada), S. Nicolau, Sal e Boavista; e o grupo Sotavento é composto por Santiago, Maio, Fogo e Brava. Praia é a principal cidade e capital do país, situada na ilha de Santiago. A segunda maior cidade é Mindelo, localizado na ilha de S. Vicente.

Sotavento foi a primeira região a ser povoada, começando por Santiago, entre 1462 e 1466, seguida pela ilha do Fogo em finais do século XV e Maio no ano de 1718. Maio foi povoada por uma população preferencialmente escrava, trazida da Costa Ocidental Africana, principalmente da Guiné-Bissau (Andrade, 1996; Carreira, 1983; Graça, 2007).

O povoamento das ilhas de Barlavento aconteceu posteriormente e em condições diferentes, dando-se principalmente por famílias europeias, com casamentos entre membros da mesma família, a fim de preservar a mestiçagem. S. Vicente (hoje a principal ilha de Barlavento) foi uma das últimas ilhas de Barlavento a ser povoada, por volta do ano de 1794 (Andrade, 1996; Carreira, 1983; Graça, 2007).

Cabo Verde é dividido em regiões, denominadas “Concelho”, num total de 22, que é a menor divisão administrativa do país, podendo se localizar numa ilha um ou mais concelhos. Santiago, a maior e principal ilha de Cabo Verde é dividida em 9 concelhos, sendo que o concelho da Praia, a capital do país e onde se localiza o maior centro urbano, concentra 26,8% da população total de Cabo Verde. Os demais concelhos de Santiago, aqui denominados - Interior de Santiago, com características essencialmente rurais, concentra 28,9% da população total do país. S. Vicente, que se constituiu um único concelho concentra 15,5% da população e constitui uma ilha urbana. As demais ilhas de Barlavento e de Sotavento contribuem, respectivamente, com 16,8% e 10,2% da população total do país (Verde, 2010). O transporte entre as ilhas se dá principalmente por via aérea, à exceção de S. Antão e Brava, onde não existem aeroportos. O transporte marítimo entre as ilhas é limitado devido à pequena frota de barcos disponíveis. Somente entre S. Antão e S. Vicente a ligação marítima é diária e estável (Verde, 2011).

O Sistema Nacional de Saúde caracteriza-se essencialmente pela presença do setor público e de um nascente setor privado, principalmente nos centros urbanos (Praia e Mindelo). O setor público, conta com dois hospitais centrais (Praia e Mindelo), três hospitais regionais (Ribeira Grande - S. Antão, Sta. Catarina - Interior de Santiago e S. Filipe - Fogo), 30 centros de saúde, 5 centros de saúde reprodutiva, 1 centro de terapia ocupacional, 1 centro de saúde mental, 34 postos

sanitários e 115 unidades sanitárias de base (Verde, 2012). A despistagem para HIV/aids pode ser realizada tanto no setor privado como em centros de saúde, centros de saúde reprodutiva e/ou hospitais, onde permanecem em acompanhamento.

1.4.2) HIV em Cabo Verde

Os testes serológicos para os anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2 tiveram início em Cabo Verde em 1987, e os dois tipos virais (HIV-1 e HIV-2) foram detectados na população. No entanto, o primeiro isolamento de HIV-2 por Clavel et al. (1986), em 1985, foi feito em um doente com aids proveniente de Cabo Verde. Se o HIV-2 leva cerca de 10 anos a manifestar-se, pode-se presumir que o vírus já estivesse presente na população há muito tempo. De acordo com dados do Ministério da Saúde de Cabo Verde no início da notificação em 1987, 62 pessoas foram diagnosticadas com infecção por HIV. Dez anos após o número de pacientes soropositivos era 553 e, até 2011, foram diagnosticados 3.816 pacientes positivos, 1443 casos de aids, e 847 mortes devido à infecção pelo HIV (Verde, 2005-2011).

O Inquérito Demográfico e de Saúde Reprodutiva (IDSR) realizado em 2005, estudou a prevalência do HIV na população, concluindo que ela é de 0.8% (Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde, 2008). Esse estudo destacou a desigualdade entre as diferentes ilhas e regiões e revelou que a prevalência mais alta se encontra na ilha Santiago (1.2%), sendo que na cidade da Praia – o principal centro urbano de Santiago e de Cabo Verde, a prevalência é de 1.9%. Outro dado importante revelado nesse inquérito foi a prevalência em diferentes grupos etários que revelou ser de 2.5% em indivíduos com idade entre 45 a 49 anos, sendo 1.8% para HIV-2 e 0.6% para HIV-1, e de 2.0% entre indivíduos de 25 a 29 anos, sendo 1.9% para HIV-1 e 0.1% para HIV-2.

Cabo Verde tem sido, desde a sua descoberta um importante *hub* de comunicação estratégica entre África, Europa e Américas. A posição geográfica e a situação socioeconômica de Cabo Verde contribuíram e ainda contribuem para que haja um movimento de cidadãos nacionais para outros países dos três continentes vizinhos à procura de trabalho, estudos e oportunidades. Por outro lado, é cada vez maior a entrada de estrangeiros desses mesmos continentes em Cabo Verde devido a negócios, turismo e acordos políticos facilitados pelos transportes fornecidos de e para Cabo Verde. Aliado a esse movimento de mercadorias, produtos e pessoas, encontra-se também um movimento de doenças e infecções, como vem sendo descrito desde a antiguidade na história humana.

Estudo realizado pelo Lemey et al. estima que a Guiné-Bissau seja a origem geográfica da introdução do HIV-2-A na população humana e na história da epidemia. Sua análise fornece evidência para uma transferência zoonótica de HIV-2 no primeiro semestre do século 20 e a sua expansão coincide com a guerra de independência (1963-1974), para a independência de Guiné-Bissau e Cabo Verde (Lemey et al., 2003). Alguns estudos, em sua maioria realizados em países europeus, como Portugal, França, Holanda, Luxemburgo, incluem indivíduos caboverdianos em sua coorte, demonstrando a importância de Cabo Verde no conhecimento da dinâmica e diversidade viral do HIV (van Veen et al., 2009; Williamson et al., 2009).

O único estudo existente sobre a diversidade viral e a resistência aos ARV em Cabo Verde data de 2012 (Oliveira et al., 2012). Esse estudo foi baseado na análise de 27 amostras HIV-1 e 14 VIH-2 de pacientes infectados residentes em Santiago e mostrou que o subtipo G era o mais prevalente (48%) entre os casos HIV-1 positivos, seguido por URFs (30%), subtipo B (7%), o subtipo de F1 (7%), e CRF02_AG (7%). Todos os 14 VIH-2 pertenciam ao grupo A. Este trabalho também

apontou para uma frequência moderada de resistência transmitida, de 12%, que deve ser olhada com cautela em função do número limitado de indivíduos analisados (2/17). Entre os pacientes em ARV, 30% (3/10) apresentaram DRM neste estudo.

O acesso universal ao tratamento gratuito pelos pacientes HIV-positivos teve início em 2004. No entanto, desde 2000 foi implementado o Programa de Prevenção da Transmissão Vertical (PTV), destinada a grávidas e respectivos recém-nascidos. Em Julho de 2004 foi validado o “Protocolo de Terapêutica Anti-Retroviral”, estando disponíveis em Cabo Verde os seguintes medicamentos em fórmulas isoladas ou combinadas: Inibidores de Protease (PI) – Ritonavir, Lopinavir, Darunavir e Nelfinavir; Inibidores Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (NRTI) – Lamivudina, Stavudina e Zidovudina; Inibidores Não-Nucleosídeo da Transcriptase Reversa (NNRTI) – Nevirapina e Efavirenz. O Protocolo de Terapêutica Anti-retroviral publicado pelo Ministério da Saúde de Cabo Verde, validado em Julho de 2004, estabelece os critérios para início de tratamento bem como as combinações recomendadas para regimes de 1ª e 2ª linha para HIV-1 e HIV-2, como representado no quadro 1 (Verde, 2004).

Quadro 1. Esquema Terapêutico usado em Cabo Verde para tratamento de pacientes infectados pelo HIV-1 e HIV-2

	HIV-1	HIV-2
1ª Linha	2NRTI+NNRTI (D4T ⁱ +3TC+NVP ⁱⁱ)	2NITR+IP (ZDV/D4T+3TC+ LPV/rtv)
2ª Linha	2NRTI+PI (ZDV/D4T+ddI+NFV)	2NITR+IP (D4T+ddI+LPV/rtv)

ⁱ Nas grávidas é substituída por AZT

ⁱⁱ Em pacientes com tuberculose (TB) é substituído por EFV

As campanhas de prevenção combinadas com outras políticas públicas, como o diagnóstico precoce e a adesão universal ao tratamento ainda carecem de uma contribuição biológica para melhor compreensão da dinâmica viral e, conseqüentemente, das formas mais eficazes para prevenir e tratar a propagação da epidemia. Estudos sobre a evolução e a diversidade viral são ferramentas que podem contribuir para o esclarecimento dessa dinâmica além de fornecer subsídios para um melhor desempenho. Através do estudo da diversidade viral, podemos ver as vias de transmissão e contato, a velocidade da disseminação e conhecer novas formas de escape viral que poderão contribuir na prevenção, no diagnóstico e no monitoramento do tratamento, uma vez que ainda não se encontram disponíveis vacinas que possam controlar esta pandemia.

1.5) JUSTIFICATIVA

Decorridos mais de 30 anos da descoberta do HIV, o conhecimento da dinâmica da epidemia mundial está bem documentado, com exceção de alguns poucos países de recursos limitados, onde não existe ainda capacidade de pesquisa e desenvolvimento de conhecimento científico e/ou países controlados por forças governamentais opressivas que impedem ou escondem informações relativas ao HIV nos seus territórios. Avanços no diagnóstico, monitoramento e tratamento, bem como políticas de prevenção da transmissão, são outras frentes que, concomitantemente com o conhecimento científico, têm contribuído para o aumento da sobrevivência de pessoas infectadas, bem como para a diminuição da discriminação e estigmatização de pessoas, governos e países.

Cabo Verde pode ser considerado um país de baixos recursos, o que compromete o desenvolvimento de estudos científicos que revelem a realidade do HIV no país. Um estudo sobre “Atualização da diversidade do HIV-1 na África: Revisão de uma década” realizado por Lihana et al. em 2012, mostrou que não existem ainda dados disponíveis sobre a diversidade viral do HIV-1 em Cabo Verde (Lihana et al., 2012). Nesse mesmo ano, pesquisadores publicaram um trabalho sobre diversidade genética do HIV-1 e HIV-2 e resistência aos ARV em pacientes de Cabo Verde, embora uma casuística muito limitada interfira diretamente nas conclusões obtidas. Em estudo prévio realizado por nosso grupo foi possível avaliar, através de ferramentas sorológicas, a distribuição do HIV-1 e HIV-2 ao longo de 20 anos em Cabo Verde, evidenciando uma mudança na prevalência dos tipos virais e claro predomínio do HIV-1 sobre o HIV-2 ao longo do tempo (Araújo, 2005). Foi a partir desse estudo que identificamos a necessidade de conhecer a diversidade viral circulante em Cabo Verde, caracterizar fluxos que possam ter influência na

diversidade e dinâmica inter-ilhas, estimar a data de entrada do HIV no país, contribuindo assim para melhor caracterizar a epidemia e identificar áreas prioritárias de ações de prevenção, monitoramento e tratamento. Assim, através de um financiamento do programa PROÁFRICA-CNPq de 2008 iniciamos o trabalho que, a partir de 2010 passou a ser o foco desta tese. Na proposta atual, utilizando ferramentas moleculares, descrevemos os subtipos de HIV-1 e grupos de HIV-2 circulando em Cabo Verde e a distribuição destes entre as ilhas que compõem o arquipélago, assim como identificamos fluxos que possam estar influenciando na difusão e caracterização da epidemia. Uma vez tendo-se iniciado o tratamento com antirretrovirais em Cabo Verde em Dezembro de 2004, consideramos pertinente identificar a existência de mutações de resistência transmitidas e adquiridas entre os infectados pelo HIV-1 e HIV-2.

Cabo Verde encontra-se numa situação privilegiada quanto às oportunidades de pesquisa em matéria do HIV/aids devido aos poucos estudos relacionados, ao fato de ser recente a introdução do tratamento com antirretrovirais, assim como pela existência dos dois tipos virais circulantes. A rapidez no aparecimento de novos subtipos, sub-subtipos e CRFs representa um desafio constante para o diagnóstico, monitoramento, tratamento e prevenção do HIV. O desenvolvimento do presente trabalho propiciou o conhecimento da epidemia HIV/aids em Cabo Verde, com fortes repercussões na prevenção, diagnóstico, tratamento e monitoramento. No seu conjunto, este projeto visa contribuir para a geração de conhecimento científico de relevância em relação a epidemia de HIV/aids em Cabo Verde, assim como qualificar profissionais para atuarem nas áreas de ensino superior e assistência no país.

II. OBJETIVOS

2.1) Objetivo Geral

Caracterizar o perfil epidemiológico molecular do HIV-1 e HIV-2 no arquipélago de Cabo Verde, estimar a origem e data de entrada dos vírus em Cabo Verde e descrever a ocorrência de mutações de resistência aos medicamentos em pacientes virgens de tratamento e pacientes em tratamento, a fim de melhor contribuir para a compreensão da diversidade e dinâmica da epidemia e na definição de políticas de saúde pública em HIV/Aids para o país.

2.2) Objetivos Específicos:

- Caracterizar o perfil sociodemográfico e clínico das infecções pelo HIV-1 e HIV-2 em Cabo Verde;
- Identificar os subtipos, CRFs e URFs do HIV-1 e grupos de HIV-2 circulantes em Cabo Verde;
- Descrever fluxos que possam ter influência na difusão e caracterização da epidemia e subsidiar uma melhor compreensão da dinâmica inter-ilhas;
- Estimar a origem, data de entrada e potencial de expansão epidêmica dos principais subtipos virais circulantes;
- Identificar a existência de mutações de resistência transmitidas e adquiridas;
- Gerar informações sobre a prevalência de mutações transmitidas e adquiridas, de relevância para a política de tratamento no país, e contribuir para futuros estudos sobre vacinas.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1) População de Estudo

Como parte de um estudo transversal, a fim de subsidiar melhor o conhecimento da epidemiologia molecular do HIV em Cabo Verde, as amostras biológicas, os dados sociodemográficos e clínico-laboratoriais foram obtidos de um total de 221 pacientes soropositivos para HIV residentes em Cabo Verde, coletadas entre 2010 e 2011, recrutados em todas as ilhas habitadas, excluindo S. Nicolau e Maio. Esta amostra de conveniência incluiu pacientes ambulatoriais HIV positivo sob avaliação e monitoramento clínico e laboratorial em distintos serviços públicos de saúde, independente da idade, tempo de infecção, tratamento e comorbidades. Pacientes hospitalizados não eram elegíveis para o estudo. O Quadro 2. apresenta a origem e a quantidade dos pacientes.

Quadro 2. Distribuição dos indivíduos participantes do estudo de acordo com as ilhas de residência.

Região	Ilha	HIV-1	HIV-2	HIV-1+2	TOTAL
Barlavento	S. Vicente	25	7	1	33
	Sto. Antão	6	1	1	8
	S. Nicolau	0	0	0	0
	Sal	11	1	1	13
	Boavista	6	4	1	11
Sotavento	Santiago	111	28	5	144
	Maio	0	0	0	0
	Fogo	8	2	0	10
	Brava	2	0	0	2

3.2) Manejo de Amostras

Após esclarecimentos sobre o projeto, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Apêndice 1), responderam a um questionário com seus dados sócio demográficos (Apêndice 2) e foram submetidos à coleta de sangue. A coleta de sangue total foi realizada em tubo com EDTA, de preferência no dia de coleta de amostra para o exame da confirmação sorológica ou de quantificação de Linfócitos T CD4⁺, e separadas em duas alíquotas de plasma e sangue total, estocadas à temperatura de -20°C. As alíquotas de plasma e sangue de outras ilhas, que não Santiago e do interior de Santiago, foram processadas localmente e enviadas ao Laboratório ELISA no Hospital Central Dr. Agostinho Neto localizado na cidade da Praia onde foram conservadas até o momento do transporte juntamente com as amostras coletadas na Praia para o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular (LabAids) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Brasil, de acordo com as normas internacionais de biossegurança, para análises moleculares. Após a chegada ao LabAids as amostras foram armazenadas a -70°C até o momento da extração de RNA e/ou DNA. A contagem de Linfócitos TCD4 foi determinada pelos serviços locais pelo método Facscount (BD Facscount Instrumento™).

3.3) Tipagem molecular do HIV

Para tipagem molecular foi selecionada a região da polimerase do HIV-1 e HIV-2, incluindo a protease e parte da transcriptase reversa por serem informativas tanto em relação a estudos filogenéticos e evolutivos, como para avaliação de ocorrência de assinaturas moleculares associadas a mutações de resistência aos antirretrovirais. Como parte inicial do trabalho foi extraído RNA a partir do plasma utilizando kit comercial (QIAmp Viral RNA – Qiagen, Valencia, CA). Para extração do

DNA foram utilizadas amostras de sangue, utilizando o kit comercial DNA QIAmp sangue – Qiagen, Valencia, CA, seguindo as instruções do fabricante. RNA e DNA foram extraídos, respectivamente, a partir de 99 amostras de plasma HIV-1 e 70 amostras de sangue HIV-1, 43 HIV-2 e 9 HIV-1/HIV-2, utilizando-se kits comerciais (QIAmp Viral RNA e DNA QIAmp sangue, QIAGEN, Valencia, CA, respectivamente), seguindo as instruções dos fabricantes. Em geral, o sucesso de amplificação e de sequenciamento foi de cerca de 80% para as amostras HIV-1 e HIV-2, totalizando 134 amostras HIV-1 e 34 amostras HIV-2. Após extração de RNA, amostras de cDNA foram obtidos por RT - PCR utilizando um método *in house*. O cDNA e o DNA extraído foram amplificados por *nested* PCR que cobre um fragmento de aproximadamente 1300bp de região *pol* do HIV que inclui toda a protease (PR; aa 1-99) e parte da transcriptase reversa (RT; aa 1-335) . Devido à complexidade das amostras estudadas, foram utilizados diferentes conjuntos de iniciadores específicos para HIV-1 que cobrem esta região. Os protocolos detalhados e as sequências dos iniciadores podem ser disponibilizados sob demanda.

A amplificação do DNA proviral do HIV-2 foi efetuada tal como descrito por Maueia et al. (Maueia et al., 2011). Os produtos de PCR foram purificados utilizando GFX PCR Illustra DNA Kit (GE Healthcare, Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido); o sequenciamento foi realizado utilizando o kit de sequenciamento Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v.3.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) e analisados no sequenciador automatizado modelo ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA). Todos os produtos purificados foram sequenciados em ambos os sentidos com os primers internos das respectivas regiões estudadas. Adicionais primers HIV-2 (H2CVp1R [3408-3427]: TATATRTATCTTTTTCTGG e H2CVp2F [3095-3113]: ATCTGTGAAAAATGGAAA) foram definidos e utilizados para o sequenciamento.

Para visualizar os cromatogramas e obter a sequência final, utilizamos o programa Seqman (DNASTAR; Lasergene, Madison , Wisconsin, EUA). As sequências foram alinhadas com o programa ClustalW e um alinhamento final para HIV-1 de 966 nucleotídeos (nucleotídeos 2256-3222 relativos ao HXB2) e de 1281 nucleotídeos para o HIV-2 foram obtidos.

A determinação do subtipo foi realizada seguindo a utilização das seguintes ferramentas: 1) Programa REGA (Alcântara et al, 2009; de Oliveira et al, 2005), 2) Análise filogenética pelo pacote MEGA v5.0 (Tamura et al., 2011) e 3) Análise do BootScan pelo Simplot 3.5.1 software (Ray, 2003). As árvores filogenéticas foram construídas pelos métodos de NJ utilizando o programa MEGA v5.0 (Tamura et al., 2011), sob o modelo de substituição de nucleotídeos Kimura-2-parâmetros (K2-P), e a confiabilidade da árvore obtida, estimada pelo método de bootstrap baseado em 1000 reamostragens. Referências dos subtipos e CRFs do HIV-1 bem como do HIV-2, grupos A e B foram obtidos a partir do banco de dados de HIV – Los Alamos (Brian Foley and Korber, 2013). Finalmente, para confirmação dos recombinantes foi feita a análise do BootScan pelo software Simplot 3.5.1 (Ray, 2003), para detecção de pontos de recombinação inter-subtipo. Nas análises de BootScan, valores de bootstrap que suportam as sequências de referências de todos os subtipos de HIV-1 do grupo M foram determinados nas árvores NJ construídas utilizando o modelo K2-P, com base em 100 re-amostragens, com uma janela deslizante de 200 pb, movendo-se em passos de 20 pb.

3.4) Análise de estruturação geográfica entre ilhas e regiões de Cabo verde

A distribuição filogenética das sequências do subtipo G e CRF02_AG do HIV-1 e HIV-2A provenientes das regiões de: Barlavento x Sotavento e Praia x Interior de Santiago foi analisada através do programa BaTS (Parker et al., 2008). Esse programa utiliza os testes estatísticos “Índice de Associação” (AI) e “Pontuação de Parcimônia” (PS) para estimar se as sequências provenientes das distintas regiões estão agrupadas ou não evidenciando alguma associação na distribuição *a posteriori* das árvores filogenéticas Bayesianas geradas com o programa MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist, 2001).

3.5) Análise da origem dos principais clados de HIV introduzidos em Cabo Verde

As sequências de Cabo Verde do subtipo G, CRF02_AG do HIV-1 e HIV-2A foram alinhadas com sequências das mesmas linhagens isoladas em outros países da África e da Europa que se encontram disponíveis no Banco de Dados de Los Alamos (Brian Foley and Korber, 2013). Em relação ao subtipo G do HIV-1 incluímos 49 sequências da nossa casuística e 317 sequências referentes aos anos de 1993 a 2011 dos seguintes países: Angola (13), Benin (15), Cabo Verde (12), República Democrática do Congo (12), Congo (8), Camarões (31), Gabão (6), Gana (8), Guiné-Equatorial (4), Nigéria (183), Senegal (12) e Togo (13). Em relação ao CRF02_AG do HIV-1 incluímos, além das 41 sequências de Cabo Verde, 306 sequências referentes aos anos de 1993 a 2010 dos seguintes países: Benin (15), Burkina Faso (18), Costa do Marfim (1), Camarões (70), Gabão (9), Gana (48), Guiné-Bissau (3), Guiné-Equatorial (4), Nigéria (40), Senegal (91) e Togo (7). Em relação ao HIV-2A, o *dataset* incluiu 30 sequências das amostras do estudo e outras 144 sequências

referentes aos anos de 1995 a 2011 dos seguintes países: Benin (13), Luxemburgo (17), Portugal (49), Índia (2), Gâmbia (10), Guiné-Bissau (2), Mali (8) e Senegal (43).

As relações filogenéticas entre as sequências de Cabo Verde e dos outros países foi primeiramente analisada pelo método de Máxima Verossimilhança (ML) e Bayesiano. As árvores de ML foram reconstruídas com o programa PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) através do servidor web on-line (Guindon et al., 2005), utilizando o modelo de substituição nucleotídica mais apropriado selecionado através do programa jModeltest (Posada, 2008), e o algoritmo de busca heurística denominado "SPR branch-swapping". A confiabilidade da topologia obtida foi avaliada pelo método de "approximate likelihood-ratio test" (aLRT) (Anisimova and Gascuel, 2006), com base no procedimento de Shimodaira-Hasegawa, e a visualização das árvores foi realizada através do programa FigTree (Rambaut, 2009).

Os estudos evolutivos e filogeográficos para avaliação do tempo de entrada e origem das principais variantes genéticas do HIV que circulam em Cabo Verde foram realizados através do programa BEAST v 1.8 (Drummond et al., 2002; Drummond and Rambaut, 2007) utilizando: 1) o melhor modelo de substituição nucleotídica; 2) o método de coalescência não-paramétrico "Bayesian Skyline plot" (Drummond et al., 2005); 3) um relógio molecular relaxado (Drummond et al., 2006); e 4) um modelo discreto de dispersão geográfica entre as localidades (Lemey et al., 2009). A convergência dos parâmetros nas análises Bayesianas foi avaliada através do cálculo de tamanho amostral efetivo (ESS) utilizando o programa TRACER v1.4 (Rambaut and Drummond, 2007), após excluir os 10% iniciais para cada corrida. As árvores Bayesianas contendo os clados de máxima credibilidade foram geradas a partir da distribuição posterior de árvores (após excluir os 10% iniciais) com o programa TreeAnnotator e visualizadas com o programa Figtree. Os eventos

migratórios inferidos foram visualizados usando os aplicativos SPREAD (Bielejec et al., 2011) e Google Earth.

3.6) Análise de Mutação de Resistência

As sequências obtidas de amostras HIV-1 e HIV-2 foram avaliadas quanto à existência de mutações que conferem resistência a drogas, tanto em pacientes virgens de tratamento, quanto em pacientes sob tratamento com ARV. Para as amostras HIV-1, as sequências foram analisadas utilizando o Banco de Dados da Stanford – Stanford HIV Database, para mutações transmitidas (TDRM/CPR Tool) Versão 6.0 em casos de pacientes virgens de tratamento (Gifford et al., 2009; Liu and Shafer, 2006), e DRM (Programa HIVdb) Versão 6.3.1, para pacientes sob tratamento com ARV (Liu and Shafer, 2006). Para os indivíduos HIV-2 virgens e sob tratamento, a análise foi realizada de acordo com HIV-GRADE e.V. Algorithm Homepage for HIV-2 sequences (2012).

3.7) Análise Estatística

Os dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos foram analisados como variáveis categóricas ou contínuas utilizando, respectivamente, as tabelas de contingência (X^2 e Fisher Exact Test) e métodos não-paramétricos, através do programa GraphPad Prism v.6.01. Num primeiro momento as amostras foram categorizadas de acordo com o tipo viral identificado pela sorologia em Cabo Verde (HIV-1, HIV-2 e HIV-1+2). Após identificação do subtipo das amostras HIV-1, essas foram classificadas em quatro categorias de acordo com os principais subtipos encontrados (G, CRF02_AG e F1) e as restantes agrupadas como “outras formas minoritárias”. As variáveis avaliadas foram: sexo, idade, ano de diagnóstico, local de residência, tipo de transmissão, uso de ARV e contagem de Linfócitos TCD4⁺.

3.8) Considerações éticas

O Projeto foi submetido e apreciado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa para a Saúde (CNEPS) de Cabo Verde, tendo sido “deliberado pela sua aprovação, ao abrigo do artigo nº11 do Decreto/Lei nº26/2007, uma vez que estão salvaguardados todos os direitos e bem-estar dos participantes do estudo.” Todos os participantes do estudo ou seu responsável em caso das crianças e adolescentes incluídos no estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este estudo foi realizado com a anuência e responsabilidade da Universidade de Cabo Verde, do Ministério da Saúde de Cabo Verde e da Fundação Oswaldo Cruz, no Brasil.

IV.RESULTADOS

No presente estudo foi incluído um total de 221 indivíduos soropositivos para o HIV, residentes em sete das nove ilhas habitadas de Cabo Verde, entrevistados no período de 2010 a 2011. Com base nos ensaios sorológicos utilizados na definição do diagnóstico em Cabo Verde, 169 (76,5%) são infectadas com o HIV-1, 43 (19,5%) pelo HIV-2 e 9 (4,1%) são co-infectados pelo HIV-1/HIV-2.

Os dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo, classificados de acordo com a sorologia efetuada para discriminação do tipo viral (HIV-1, HIV-2 e HIV-1+2), são apresentados na Tabela 1. Mais de 65% dos indivíduos são do sexo feminino, sem diferenciação entre os grupos HIV-1, HIV-2 e HIV-1+2. No entanto, em relação à idade, observamos diferenças estatisticamente significativas em relação aos grupos infectados pelo HIV-1 e HIV-2 [$p = 0,0005$]. A infecção pelo HIV-1 é mais frequente em idades abaixo de 30 anos (33,2%) e, quando comparado com os indivíduos infectados pelo HIV-2 nessa mesma faixa etária (11,7%). Em contrapartida, foi observada uma maior frequência de indivíduos infectados pelo HIV-2 na faixa acima de 49 anos (44,2%) comparado com os infectados pelo HIV-1 (16,6 %) nessa mesma faixa etária. Além disso, a mediana de idade é mais elevada entre os infectados pelo HIV-2 [47 (IQR = 12-84)] em comparação com os infectados pelo HIV-1 [34 (IQR = 1-75)] ($p < 0,0001$). Em relação à transmissão vertical, verificamos uma alta frequência de infecção pelo HIV-1 em relação ao HIV-2 (16,0% vs 2,3%; $p = 0,03$). A via sexual é a principal forma de transmissão do HIV em Cabo Verde, independente do tipo viral. Poucos são os pacientes incluídos no estudo que tiveram diagnóstico realizado antes de 2004, ano que se iniciou o programa de oferta de ARV em Cabo Verde, sendo que a maioria teve o diagnóstico realizado entre 2008 a 2011. Os dois vírus estão presentes em

pacientes de todas as ilhas e regiões de Cabo Verde nas mesmas proporções, com exceção da ilha de Santiago. Nesta, a relação entre a proporção de infecções HIV-1/HIV-2 em Praia é significativamente mais baixa do que no interior de Santiago (2,65 vs 7,25; $p = 0,03$), mostrando uma maior concentração relativa de infecções pelo HIV-1 no Interior de Santiago e por HIV-2 na Praia. Metade dos pacientes infectados pelo HIV-1 e HIV-2 está em tratamento, sendo o período médio de 26,0 meses (IQR = 1-93) para o HIV-1 e de 35,5 meses para o HIV-2 (IQR=17-68). Cerca de 59% e 56% dos indivíduos infectados pelo HIV-1 e pelo HIV-2, respectivamente, apresentam contagem de linfócitos TCD4⁺ acima de 350 células/mm³.

Tabela 1. Características sócio-demográficas e clínicas de 221 indivíduos soropositivos para o HIV de Cabo Verde distribuídas de acordo com o tipo viral

Variáveis	HIV-1	HIV-2	HIV-1+2	P Valor* (95%)
N (%)	169 (76, 5)	43 (19, 5)	9 (4,1)	
Sexo N (%)				1,0
Feminino	112 (66,3)	29 (67,4)	7 (77,8)	
Masculino	54 (32,0)	14 (32,6)	2 (22,2)	
Desconhecido	3 (1,8)	---	---	
Faixa Etária (Anos) N (%)				0,0005
0 - 15	28 (16,6)	2 (4,7)	---	
16-29	28 (16,6)	3 (7,0)	1 (11,1)	
30-49	85 (50,3)	19 (44,2)	7 (77,8)	
> 49	28 (16,6)	19 (44,2)	1 (11,1)	
Ano de Diagnóstico N (%)				0,74
Antes de 2004	7 (4,1)	2 (4,7)	1 (11,1)	
2004 - 2007	50 (29,6)	8 (18,6)	1 (11,1)	
2008 - 2011	70 (41, 4)	15 (34,9)	4 (44,4)	
Desconhecido	42 (24,9)	18 (41,9)	3 (33,3)	
Residência (Região) N (%)				0,85
Barlavento	48 (28,4)	13 (30,3)	4 (44,4)	
Sotavento	121 (71,6)	30 (69,7)	5 (55,6)	
Barlavento (N=65)	48	13	4	1,0
S. Vicente	25 (52,1)	7 (53,8)	1 (25,0)	
Barlavento (Sem S. Vicente)	23 (47,9)	6 (46,2)	3 (75,0)	
Sotavento (N=156)	121	30	5	1,0
Santiago	111 (91,7)	28 (93,3)	5 (100,0)	
Sotavento (Sem Santiago)	10 (8,3)	2 (6,7)	---	
Santiago (N=144)	111	28	5	0,03
Praia	53 (47,7)	20 (71,4)	2 (40,0)	
Interior Santiago	58 (52,3)	8 (28,6)	3 (60,0)	
Transmissão N (%)				0,03
Sexual	101 (59,8)	26 (60,5)	6 (66,7)	
Vertical	27 (16,0)	1 (2,3)	---	
Outros	2 (1,2)	1 (2,3)	1 (11,1)	
Desconhecido	39 (23,1)	15 (34,9)	2 (22,2)	
ARV N (%)				1,0
Sim	92 (54,4)	21 (48,8)	4 (44,4)	
Não	73 (43,2)	16 (37,2)	3 (33,3)	
Desconhecido	4 (2,4)	6 (14,0)	2 (22,2)	
Células TCD4 (cels/mm³) N (%)				0,5
<350	47 (27,8)	16 (37,2)	5 (55,6)	
350–500	37 (21,9)	7 (16,3)	1 (11,1)	
>500	62 (36,7)	17 (39,5)	1 (11,1)	
Desconhecido	23 (13,6)	3 (7,0)	2 (22,2)	

* Excepto Valor desconhecido e HIV-1+2

4.1) Caracterização Genética do HIV-1 e HIV-2

A caracterização genética da região *pol* foi possível para 168 amostras, sendo 134 HIV-1 e 34 HIV-2. Em relação ao HIV-1, vários subtipos, URFs e amostras CRFs-like foram encontrados na população estudada, sendo 49 amostras do subtipo G (36,6%), 41 CRF02_AG (30,6%), seguido por URFs (10,4%), subtipos F1 (9,7%) e B (5,2%), CRF05_DF (3,0 %), subtipo C (2,2%), CRF06_cpx (0,7%), CRF25_cpx (0,7%) e CRF49_cpx (0,7%), conforme demonstrado na Figura 7. Cabe ressaltar que cerca de 70% das amostras analisadas corresponderam ao subtipo G e ao CRF02_AG.

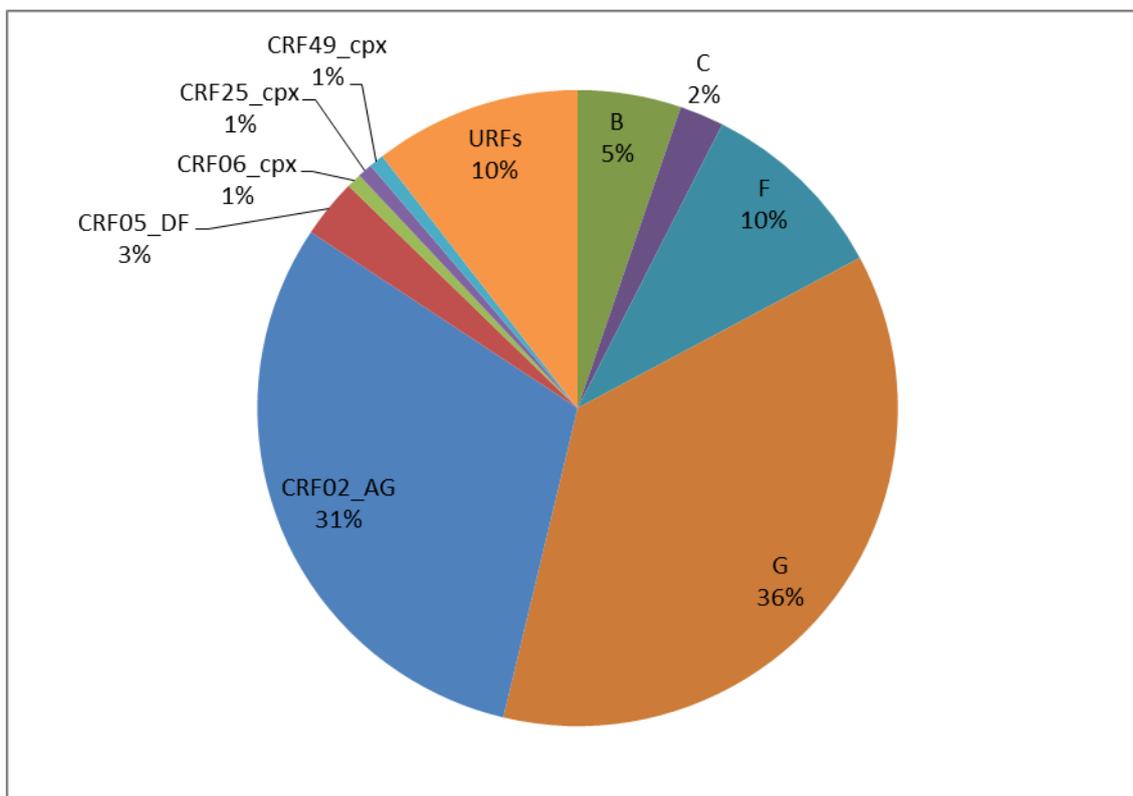


Figura 9. Gráfico representativo da diversidade molecular do HIV-1 em Cabo Verde

Para melhor compreensão da alta diversidade do HIV-1 existente em Cabo Verde, incluindo as amostras com genomas considerados “puros” para a região gênica analisada e os recombinantes (CRFs e URFs), construímos árvores

filogenéticas distintas apresentadas nas Figuras 9-11. A árvore filogenética apresentada na Figura 9 revela o agrupamento das amostras “puras” de HIV-1 com as referências dos subtipos virais A-H. Por esta análise confirmamos a classificação das amostras nos subtipos B, C, F1 e G e a inexistência de amostras do subtipo A na população estudada.

Na Figura 10 apresentamos a análise filogenética das amostras com perfis recombinantes referentes a CRFs previamente identificados, assim como dois perfis recombinantes únicos de maior prevalência na nossa população.

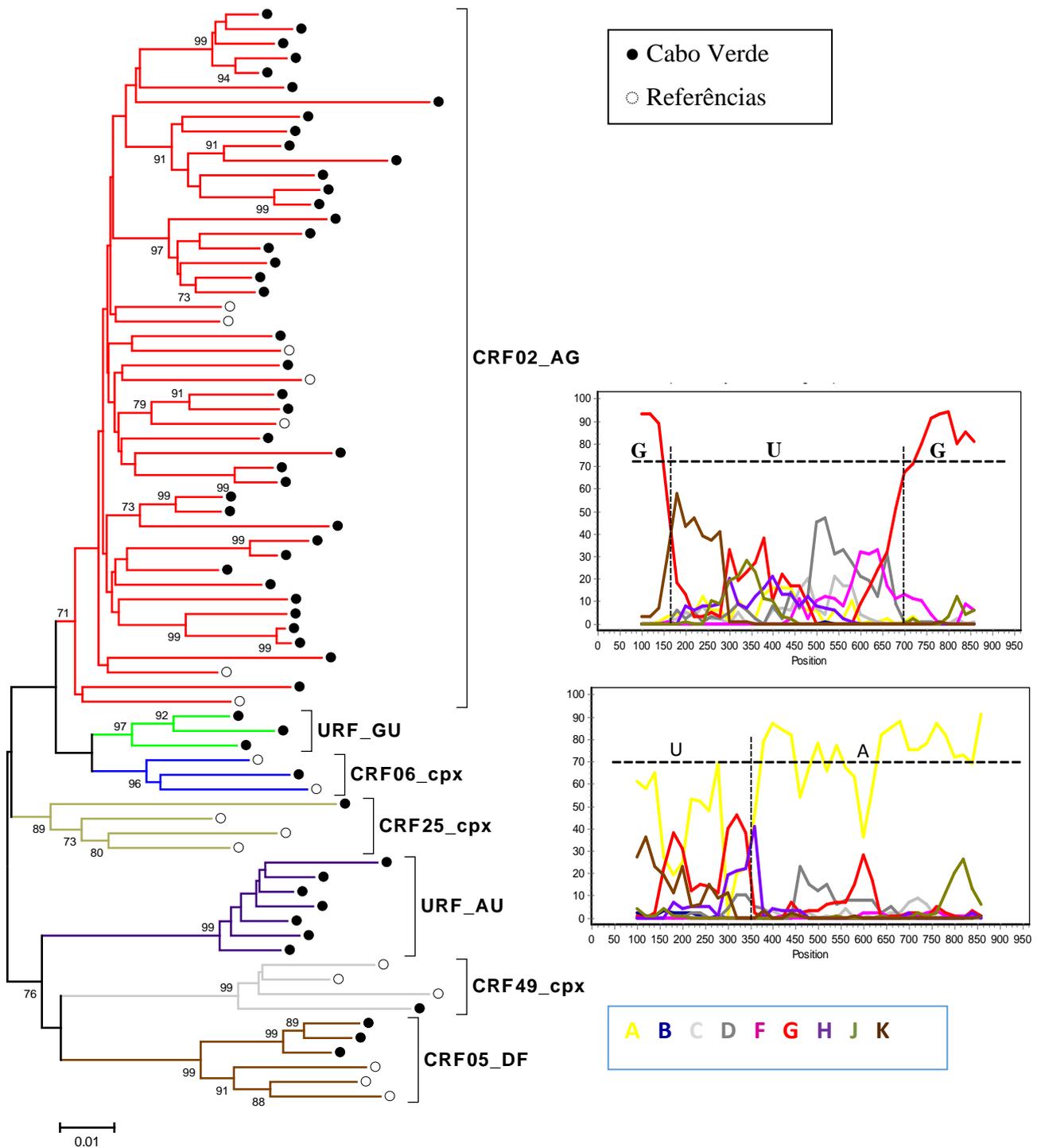


Figura 11. Árvore filogenética da região *pol* do HIV-1 com os principais CRFs e URFs das amostras de Cabo Verde. As inferências filogenéticas foram realizadas pelo algoritmo de Neighbor-Joining/Kimura-2 parâmetro e o modelo de substituição de nucleotídeos usando o programa MEGA v5.0. A escala representa o número de substituições por sítio. Cabo Verde e sequências de referência são representados por círculos pretos e brancos, respectivamente. Análise de BootScan dos principais HIV-1 URF são apresentados à direita. Perfis recombinantes foram inferidos usando janela de 200bp, por 20 pb e o modelo Kimura-2 parâmetros usando o software SimPlot 3.5.1. As amostras de referência correspondentes aos principais subtipos de HIV-1 são indicadas por diferentes cores.

Nessa árvore identificamos o CRF02_AG, um dos grupos majoritários em Cabo Verde e os CRFs 05_DF (3,0%), 06_cpx (0,7%), 25_cpx (0,7%) e 49_cpx (0,7%). No que diz respeito às URFs, identificamos dois clusters com suportes significativos. Um deles compreende sete amostras, que também se agruparam com suporte mais baixo com o CRF49_cpx e o CRF05_DF. A análise detalhada do perfil destas amostras pelo Simplot revelou genomas recombinantes AU, que corresponde a 5,2% do total de amostras de HIV-1 de Cabo Verde sequenciadas. Cabe ressaltar que o fragmento A destas amostras não se agrupou especificamente com nenhum dos sub-subtipos A1-A4 já descritos. O outro cluster, inclui três amostras que não se agruparam com nenhum dos CRFs incluídos na árvore, com exceção do CRF06_cpx, porém sem valor de bootstrap significativo (55). Na análise detalhada pelo Simplot, as amostras incluídas neste cluster apresentaram o perfil recombinante GU, totalizando 2,2% das amostras de HIV-1 sequenciadas. As demais quatro amostras não incluídas nas duas análises filogenéticas anteriores foram analisadas separadamente tendo como referência os diferentes subtipos e sub-subtipos de HIV-1 e o CRF02_AG por ser altamente prevalente em Cabo Verde. O resultado dessa análise está representado na Figura 11A.

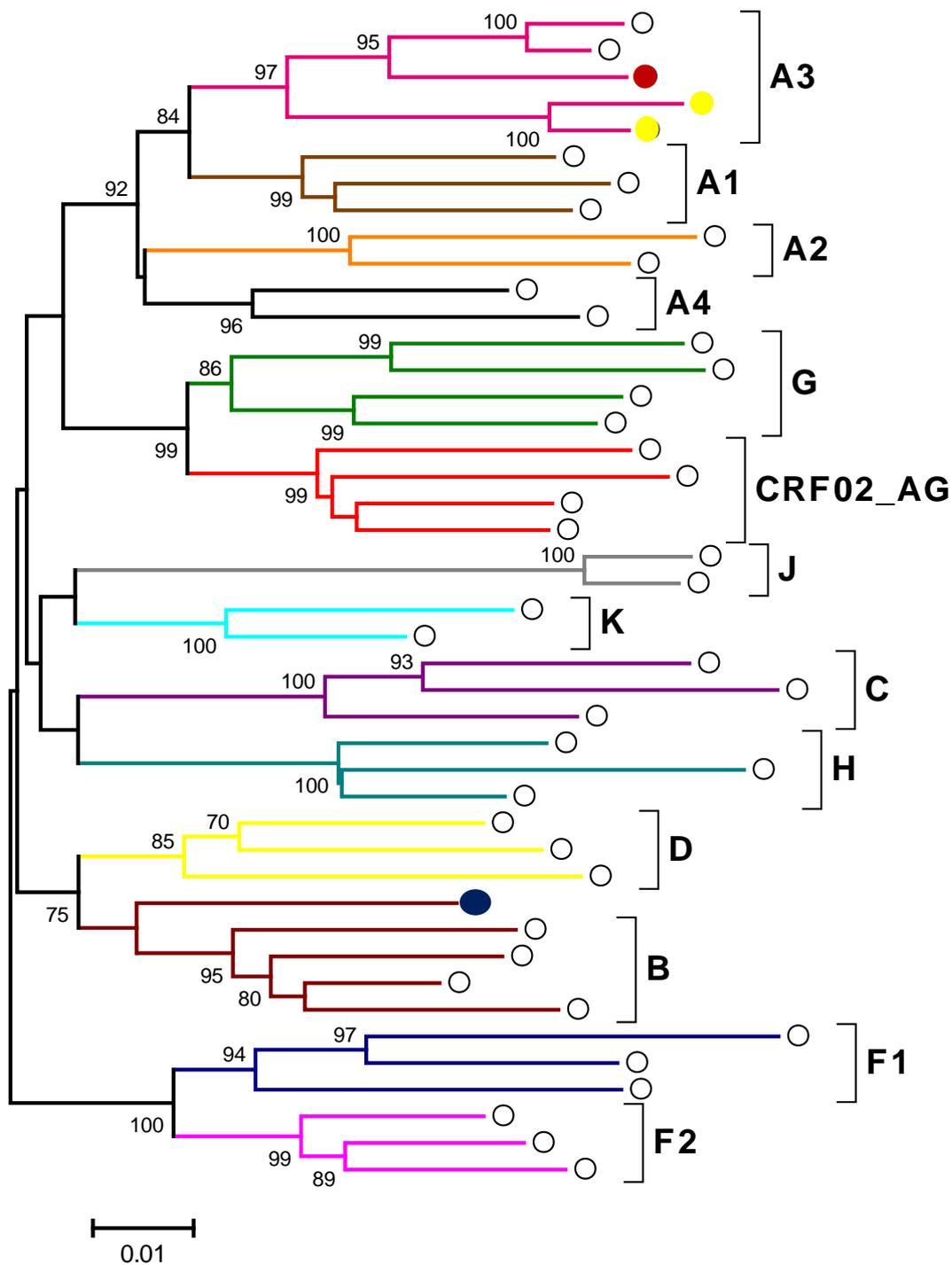


Figura 12. (A) Árvore filogenética da região *pol* do HIV-1 com os URFs das amostras de Cabo Verde. As inferências filogenéticas foram realizadas pelo algoritmo de Neighbor-Joining/Kimura-2 parâmetro e o modelo de substituição de nucleotídeos usando o programa MEGA v5.0. A escala representa o número de substituições por sítio. As amostras de Cabo Verde são representadas por círculos coloridos e as sequências de referência são representadas por círculos brancos.

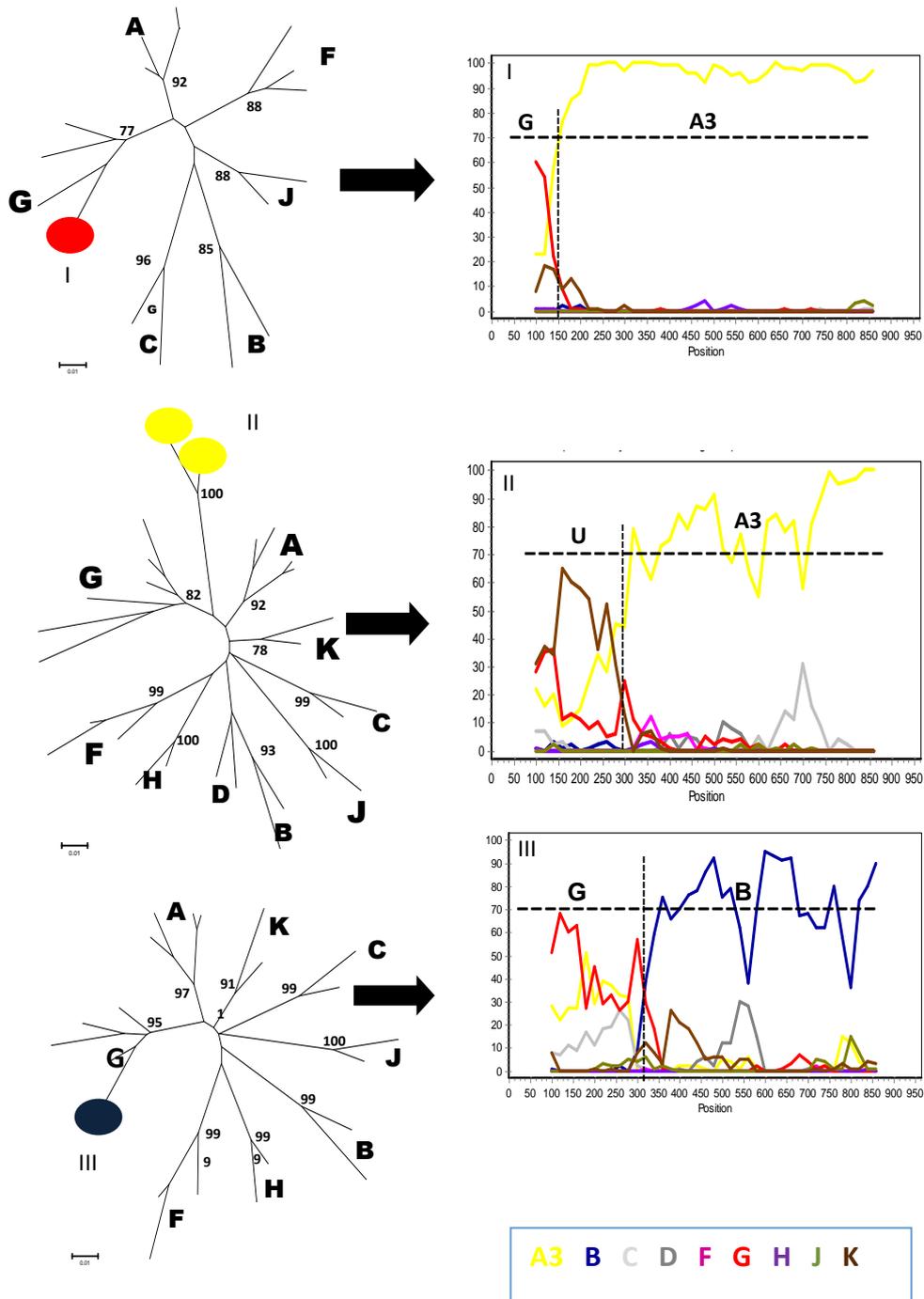


Figura 12. (B) Análise de BootScan dos principais HIV-1 URF são apresentados à direita. Perfis recombinantes foram inferidos usando janela de 200bp, por 20 pb e o modelo Kimura-2 parâmetros usando o software SimPlot 3.5.1. As amostras de referência correspondentes aos principais subtipos de HIV-1 são indicadas por diferentes cores.

Três destas amostras se agruparam com o sub-subtipo A3 com alto valor de bootstrap (97). No entanto, a análise pelo Simplot revelou perfis recombinantes distintos: dois URFs_AU e um URF_AG. Além destes, identificamos uma amostra que saiu em um ramo entre os subtipos B e D que, pela análise pelo Simplot, foi caracterizada como URF_BG (Fig. 11B). Os fragmentos correspondentes aos diferentes pontos de corte obtidos através do Simplot foram confirmados pela análise filogenética. Estas três formas recombinantes correspondem, respectivamente, a 1,4%, 0,7% e 0,7% das amostras de Cabo Verde sequenciadas. No geral, além do CRF02_AG (30,6%), os demais genomas recombinantes de HIV-1 perfazem 15,5% do total de amostras analisadas de Cabo Verde.

Quanto ao HIV-2 todas as sequências analisadas pertencem ao grupo A, como representado na Figura 12. Por esta análise filogenética identificamos um cluster com alto valor de bootstrap (82) constituído por 6 amostras (54,5%) do total de 11 amostras de HIV-2 sequenciadas provenientes da região de Barlavento. Já as amostras obtidas na região de Sotavento, que totalizam 68% do total de amostras HIV-2 de Cabo Verde incluídas neste estudo, se distribuem de forma mais dispersa na árvore filogenética, sem evidenciação de um perfil de similaridade mais definido.

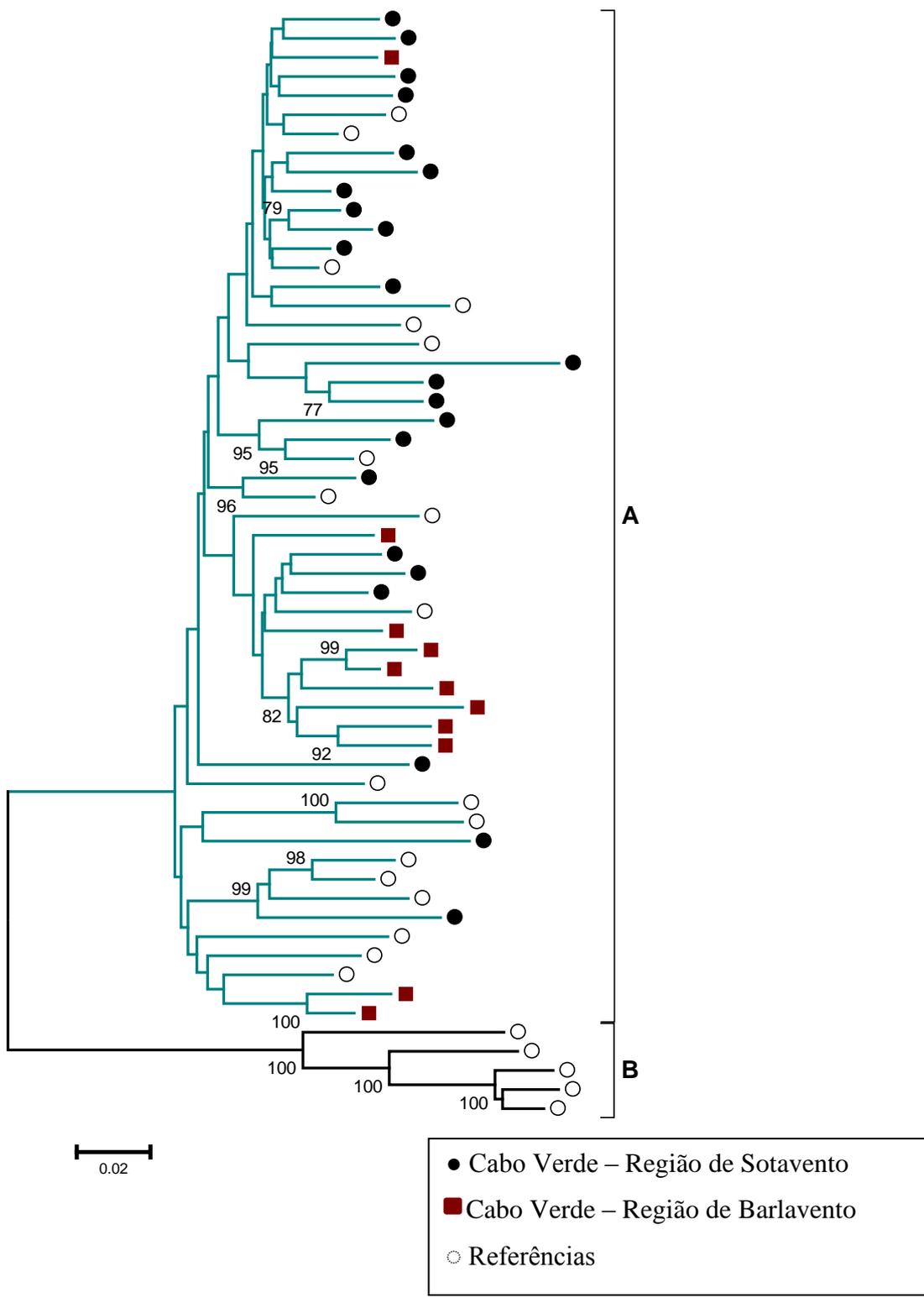


Figura 13. Árvore filogenética da região pol do HIV-2 das amostras de Cabo Verde. As inferências filogenéticas foram realizadas pelo algoritmo de Neighbor-Joining/Kimura-2 parâmetro e o modelo de substituição de nucleotídeos usando o programa MEGA v5.0. A escala representa o número de substituições por sítio. Sequências de referência dos grupos A e B do HIV-2 foram incluídas e estão representados por círculos brancos.

4.2) Análise dos dados sociodemográficos e clínicos de pacientes HIV-1 de Cabo Verde, de acordo com a diversidade molecular

A fim de entender o papel da variabilidade genética do HIV-1 na epidemia local, os dados sociodemográficos e clínicos foram analisados de acordo com as principais variantes genéticas circulantes em Cabo Verde: subtipo G, CRF02_AG, subtipo F1 e os demais subtipos, CRFs e URFs de HIV-1 formaram um único grupo denominado “Outras formas circulantes” como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Características sócio-demográficas e clínicas das 134 sequências dos indivíduos soropositivos para o HIV-1 distribuídas de acordo com a caracterização molecular

Variáveis	G	CRF02_AG	F1	Outras Formas Circulantes	P Valor* (95%)
N (%)	49 (36,6)	41 (30,6)	13 (9,7)	31 (23,1)	
Sexo N (%)					0,48
Feminino	36 (73,5)	26 (63,4)	7 (53,8)	21 (67,7)	
Masculino	12 (24,5)	14 (34,1)	6 (46,2)	10 (32,3)	
Desconhecido	1 (2,0)	1 (2,4)	---	---	
Faixa Etária (Anos) N (%)					0,12
0 - 15	9 (18,4)	10 (24,4)	---	4 (12,9)	
16-29	10 (20,4)	7 (17,1)	3 (23,1)	2 (6,5)	
30-49	24 (49,0)	20 (48,8)	10 (76,9)	17 (54,8)	
> 49	6 (12,2)	4 (9,8)	---	8 (25,8)	
Transmissão N (%)					0,08
Heterossexual	29 (59,2)	17 (41,5)	9 (69,2)	23 (74,2)	
Vertical	9 (18,4)	10 (24,4)	---	4 (12,9)	
Outros	---	---	2 (15,4)	---	
Desconhecido	11 (22,4)	14 (34,1)	2 (15,4)	4 (12,9)	
Ano de Diagnóstico					0,71
Antes de 2004	2 (4,1)	1 (2,4)	---	3 (9,7)	
2004 - 2007	16 (32,7)	10 (24,4)	5 (38,5)	8 (25,8)	
2008 - 2011	20 (40,8)	19 (46,3)	6 (46,2)	14 (45,2)	
Desconhecido	11 (22,4)	11 (26,8)	2 (15,4)	6 (19,4)	
Residência (Região) N (%)					<0,0001
Barlavento	6 (12,2)	14 (34,1)	12 (92,3)	6 (19,4)	
Sotavento	43 (87,8)	27 (65,9)	1 (7,7)	25 (80,6)	
Barlavento					0,001
S. Vicente	1 (17,7)	3 (21,4)	11 (91,7)	3 (50,0)	
Barlavento (Sem S. Vicente)	5 (83,3)	11 (78,6)	1 (8,3)	3 (50,5)	
Sotavento					0,004
Santiago	37 (86,0)	25 (92,6)	---	25 (100,0)	
Sotavento (Sem Santiago)	6 (14,0)	2 (7,4)	1 (100,0)	---	
Santiago					0,019
Praia	14 (37,8)	18 (72,0)	---	10 (40,0)	
Interior Santiago	23 (62,2)	7 (28,0)	---	15 (60,0)	
ARV n (%)					0,41
Sim	24 (49,0)	22 (53,7)	5 (38,5)	19 (61,3)	
Não	25 (51,0)	17 (41,5)	8 (61,5)	11 (35,5)	
Desconhecido	---	2 (4,9)	---	1 (3,2)	
CD₄ T cell count (cells/mm³) N (%)					0,91
<350	19 (38,8)	11 (26,8)	3 (23,1)	11 (35,5)	
350–500	8 (16,3)	8 (19,5)	4 (30,8)	6 (19,4)	
>500	17 (34,7)	12 (29,3)	5 (38,5)	11 (35,5)	
Desconhecido	5 (10,2)	10 (24,4)	1 (7,7)	3 (9,7)	

* Excepto Valor desconhecido

Não foram detectadas diferenças significativas com relação às variáveis gênero, idade, ano de diagnóstico, via de transmissão, uso de ARV e contagem de células T CD4⁺ entre os pacientes infectados com as diferentes variantes virais. No entanto podemos observar que a razão entre o sexo feminino e masculino difere entre os grupos. Enquanto nas infecções pelo subtipo F a razão F/M é de 1,2, para CRF02_AG, esta é de 1,9 e de 3 para o subtipo G. A forma mais prevalente entre as crianças é o CRF02_AG, concordando com a maior frequência de casos de transmissão vertical verificado em nosso estudo para este mesmo grupo. Na faixa etária de 15 a 29 anos a proporção é idêntica para as infecções pelos subtipos G e F1 e pelo CRF02_AG. No entanto, infecções pelas demais formas circulantes parecem ser mais comuns na população acima de 30 anos (80,6%). Retirando da análise as crianças que foram infectadas por transmissão vertical, observamos que a média de idade entre os diferentes grupos divergem, embora sem significância estatística. Ela é de 38,9 (IQR=20-64) para o subtipo G, 36,7 (IQR=22-59) para o CRF02_AG, 32,7 para o subtipo F (IQR=23-42) e 45,9 (IQR=26-75) anos para as demais formas circulantes.

Diferenças significativas foram encontradas quando realizamos análise estratificada das variantes genéticas de acordo com o local de residência dos pacientes incluídos no estudo, como pode ser observado na Figura 14. Estas diferenças foram tanto em relação às regiões de: Barlavento e Sotavento ($p < 0,0001$), como entre ilhas destas regiões como São Vicente e outras ilhas do Barlavento [$p = 0,001$], e Santiago e outras ilhas de Sotavento ($p = 0,004$). Em relação à ilha de Santiago, verificamos ainda diferença significativa quando comparamos a capital do país, Praia, com o interior de Santiago ($p = 0,018$). Tais diferenças parecem ser impulsionadas, principalmente, pela alta frequência relativa do subtipo F1 na região de Barlavento, com foco na ilha de São Vicente (61%). Já o

subtipo G corresponde a 51% das infecções provenientes do Interior de Santiago e a 67% nas outras ilhas de Sotavento enquanto que o CRF02_AG corresponde a 43% das infecções provenientes de Praia e a 55% das outras ilhas de Barlavento. Vale a pena ressaltar que, das sete amostras do subtipo B identificadas no presente estudo, todas provêm de indivíduos residentes em Santiago, sendo que 6 (85,7%) no interior e um em Praia. Entre os adultos infectados por este subtipo residentes no interior de Santiago, a razão F/M é de 4 e a média de idade de 49,6 (IQR=41-65) anos.

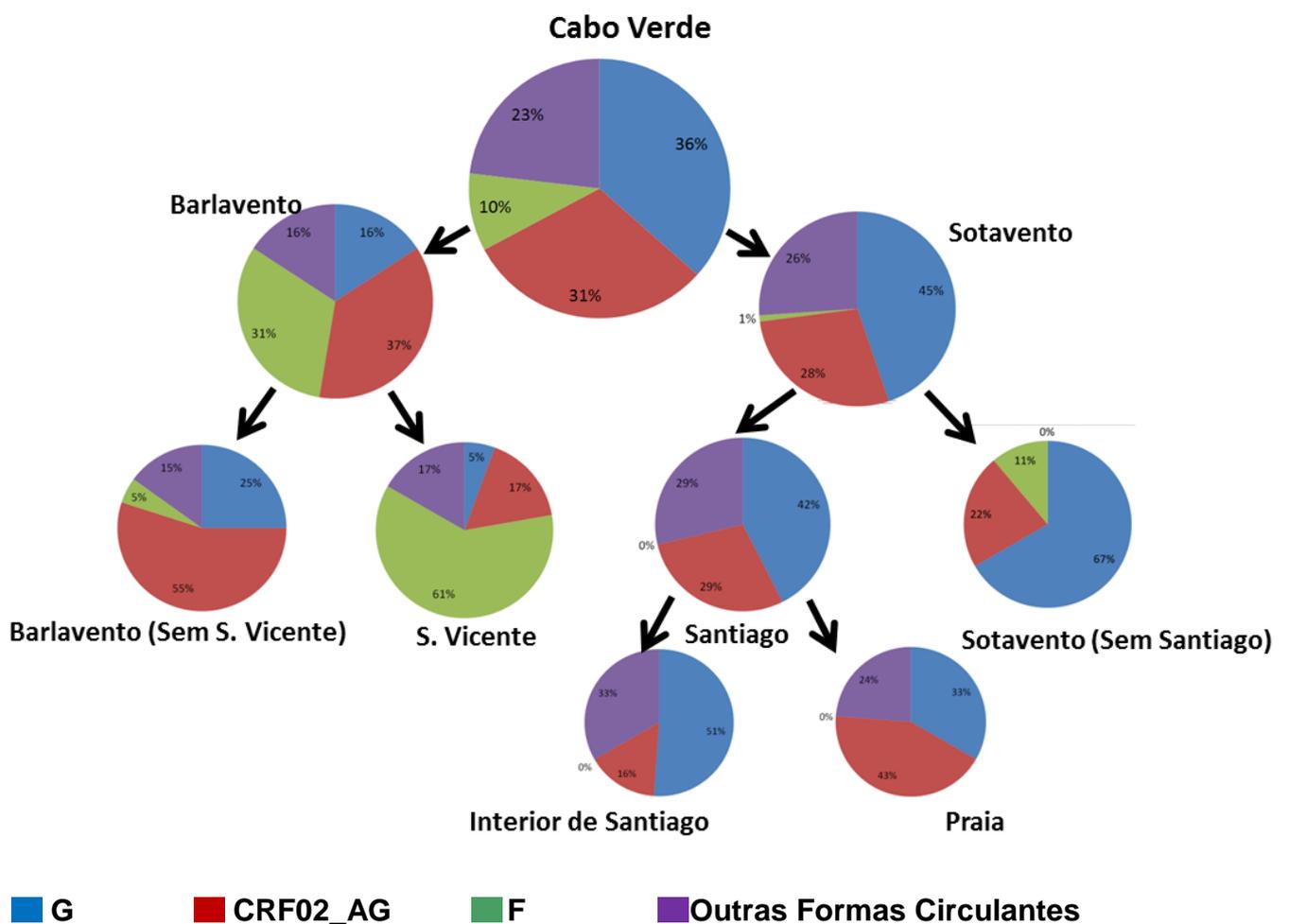


Figura 14. Distribuição dos principais subtipos e formas recombinantes de HIV-1 encontrados em Cabo Verde de acordo com o local de residência

4.3) Estudo de relações de transmissão entre Regiões

No conjunto das principais variantes genéticas de HIV-1 (subtipo G e CRF02_AG) e HIV-2 circulantes em Cabo Verde, realizamos uma análise estatística a fim de avaliar se a distribuição das sequências virais entre as regiões estudadas (Barlavento x Sotavento; Praia x Interior de Santiago) apresentava algum padrão de associação de distribuição geográfica (Tabela 3).

Tabela 3. Teste de agrupamento filogenético das sequências de HIV de Cabo Verde de acordo com a região geográfica de origem

HIV	Região Geográfica	Estatística	Valor Observado (95% CI)	Valor Esperado ^a (95% CI)	P-valor	
G	BA-SO	AI	0.98 (0.61-1.27)	1.05 (0.57-1.58)	0.39	
		PS	5.00 (5.00-5.00)	5.61 (4.97-6.00)	0.22	
	PR-IS	AI	1.37 (0.97-1.78)	1.64 (1.06-2.21)	0.21	
		PS	10.18 (9.00-11.00)	11.23 (8.64-12.87)	0.14	
	02_AG	BA-SO	AI	1.49 (1.21-1.79)	2.03 (1.39-2.58)	0.10
			PS	10.96 (10.00-12.00)	11.53 (9.67-13.66)	0.33
PR-IS		AI	1.20 (0.88-1.45)	1.24 (0.72-1.86)	0.43	
		PS	7.00 (7.00-7.00)	6.63 (5.00-7.97)	0.72	
HIV-2	BA-SO	AI	0.39 (0.20-0.61)	1.60 (1.00-2.23)	<0.0001	
		PS	4.02 (4.00-4.00)	8.55 (7.13-9.96)	<0.0001	
	PR-IS	AI	1.34 (0.96-1.63)	0.96 (0.47-1.37)	0.90	
		PS	6.89 (6.00-7.00)	5.49 (3.88-6.78)	1.0	

^a Valor de AI ou PS esperado sob a hipótese nula de não agrupamento filogenético das sequências por região geográfica de origem.

BA: Barlavento. SO: Sotavento. PR: Praia. IS: Interior de Santiago. AI: Índice de Associação. PS: Pontuação de Parcimônia

Essa análise não revelou associação entre as amostras do subtipo G e do CRF02_AG quando analisadas de acordo com a região de origem. Entre as sequências do subtipo G, como as CRF02_AG, não se evidenciou associação no padrão de distribuição geográfica, tanto entre Barlavento e Sotavento ($p=0.39/0.22$ para HIV-1G e $p=0.10/0.33$ para HIV-102_AG), como entre Praia e Interior de Santiago ($p=0.21/0.14$ para HIV-1G e $p=0.43/0.72$ para HIV-102_AG). Em relação ao HIV-2 parece existir associação entre as amostras estudadas das regiões de Barlavento e Sotavento ($p=<0,0001$), mas não entre Praia e Interior de Santiago ($p=0.90/1.00$). Isso nos mostra que as amostras de HIV-2 de uma mesma região tendem a ficar mais próximas entre si na árvore filogenética do que com amostras da outra região, como observada na Figura 12.

4.4) Análise Filogeográfica e Origem do HIV

Primeiro analisamos a origem e disseminação do HIV-2A em Cabo Verde, como apresentado na Figura 12. Para essa análise incluímos sequências de países do Oeste Africano, onde o HIV-2 está presente, da Índia e de dois países europeus, onde já foram identificados indivíduos infectados pelo HIV-2. Há evidência, de acordo com essa análise, de oito introduções independentes de HIV-2 em Cabo Verde, sendo a mais antiga de 1967 [1959-1973] – HIV-2_{CV-I}, constituída por 12 sequências de Cabo Verde. Esse clado tem sua gênese provavelmente em Portugal. O segundo clado mais importante, constituído por 10 amostras – HIV-2_{CV-II}, parece ter data de entrada semelhante ao clado HIV-2_{CV-I}, estimada em 1967 [1959-1975], também provavelmente originário de Portugal. De Portugal também se origina o terceiro clado, com data de entrada em 1970 [1959-1980] - HIV-2_{CV-III}. Em 1996 [1986-2003], identifica-se uma nova introdução do HIV-2, proveniente do Senegal -

HIV-2_{CV-IV}. Outras quatro introduções são identificadas sendo uma do Senegal e as demais de Portugal, constituída por uma única sequência.

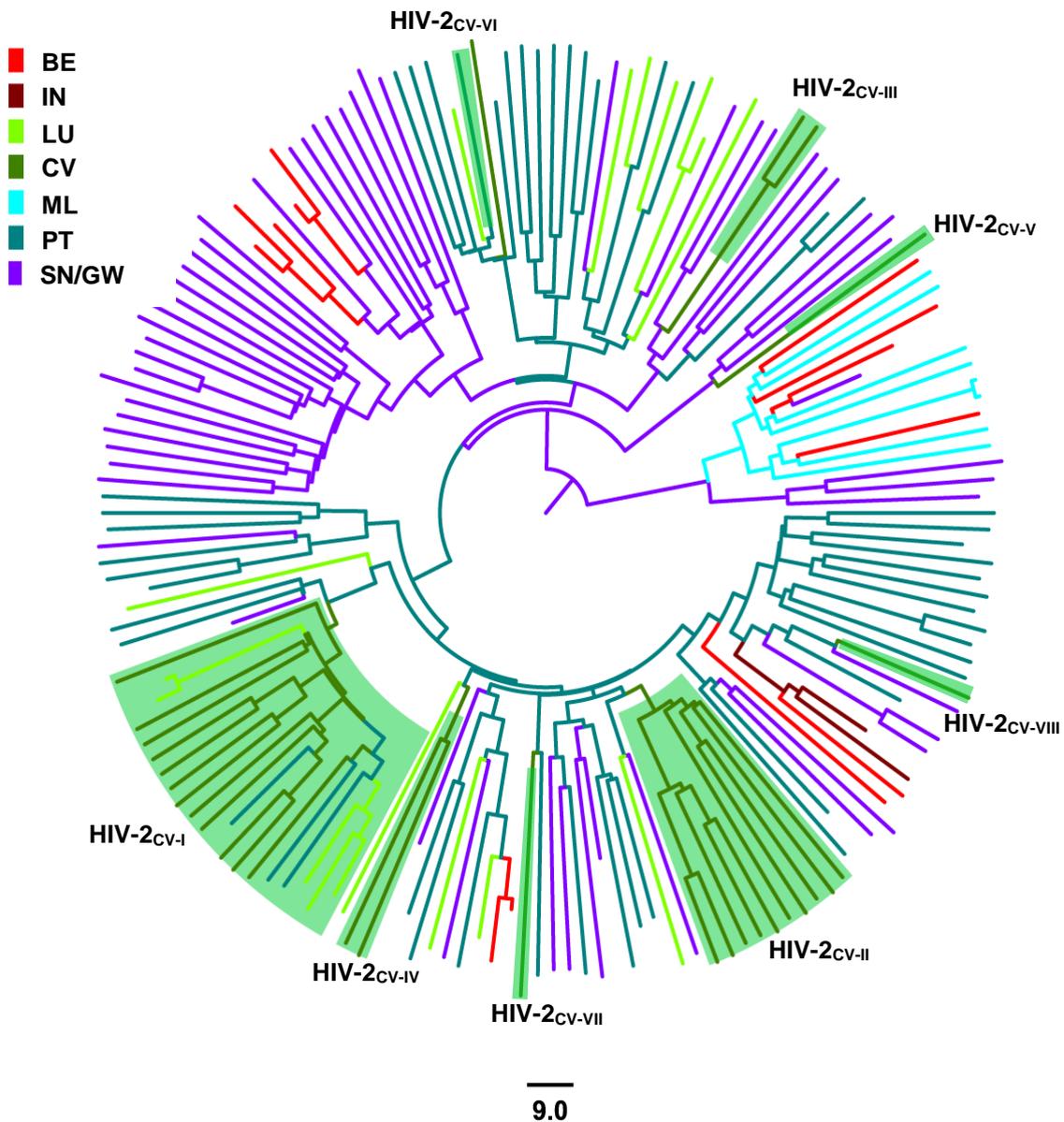


Figura 15. Análise Bayesiana de amostras africanas, europeias e asiáticas classificadas como HIV-2A na região da *pol*. As cores dos ramos representam a origem geográfica das amostras, de acordo com a legenda acima. Caixa colorida em verde destaca os diferentes clusters que circulam em Cabo Verde de acordo com o número de amostras. O comprimento dos ramos tem como referência a barra indicada abaixo, que indica substituições de nucleotídeos por sítio.

BN: Benin; IN: Índia; LU: Luxemburgo; CV: Cabo Verde; ML: Mali; PT: Portugal e SN: Senegal.

O subtipo G do HIV-1 aparece como o segundo vírus introduzido em Cabo Verde. Numa primeira etapa foram incluídas sequências da África oeste e central. Nesta análise observamos quatro introduções de HIV-1G em Cabo Verde (Tb. 4).

Tabela 4. Origem e data de introdução das principais variantes de HIV-1 e HIV-2 que circulam em Cabo Verde.

Clado	N (%)	Origem	Probabilidade	T _{MRCA}
G _{CV-I}	49 (80.3%)	AO/CG/DC	0.97	1979 [1972-1984]
G _{CV-II}	9 (14.8%)	Nigéria	1	1993 [1985-1998]
G _{CV-III}	2 (3.3%)	Nigéria	1	1998 [1992-2002]
G _{CV-IV}	1 (1.6%)	AO/CG/DC	0.99	-
CRF02 _{CV-I}	7 (17.1%)	GW/SN	1	1986 [1979-1990]
CRF02 _{CV-II}	6 (14.6%)	GW/SN	0.98	1987 [1980-1994]
CRF02 _{CV-III}	5 (12.2%)	GW/SN	1	1998 [1992-2003]
CRF02 _{CV-IV}	3 (7.3%)	GW/SN	0.94	1990 [1983-1998]
CRF02 _{CV-V}	3 (7.3%)	GW/SN	1	1995 [1987-2001]
CRF02 _{CV-VI}	2 (4.9%)	GW/SN	0.98	1997 [1989-2003]
CRF02 _{CV-VII}	2 (4.9%)	GW/SN	0.99	2003 [1998-2007]
CRF02 _{CV-VIII}	2 (4.9%)	Senegal	0.99	2003 [1997-2007]
CRF02 _{CV-IX}	1 (2.4%)	Camarões	0.99	-
CRF02 _{CV-X}	1 (2.4%)	GW/SN	0.98	-
CRF02 _{CV-XI}	1 (2.4%)	GW/SN	0.99	-
CRF02 _{CV-XII}	1 (2.4%)	GW/SN	0.99	-
CRF02 _{CV-XIII}	1 (2.4%)	GW/SN	0.98	-
CRF02 _{CV-XIV}	1 (2.4%)	GW/SN	0.97	-
CRF02 _{CV-XV}	1 (2.4%)	GW/SN	0.98	-
CRF02 _{CV-XVI}	1 (2.4%)	GW/SN	0.98	-
CRF02 _{CV-XVII}	1 (2.4%)	GW/SN	0.91	-
CRF02 _{CV-XVIII}	1 (2.4%)	GW/SN	0.93	-
CRF02 _{CV-IXX}	1 (2.4%)	GW/SN	0.96	-
HIV-2 _{CV-I}	12 (40.0%)	Portugal	0.91	1967 [1959-1973]
HIV-2 _{CV-II}	10 (33.3%)	Portugal	0.98	1967 [1959-1975]
HIV-2 _{CV-III}	2 (6.7%)	GM/GW/SN	0.62	1996 [1986-2003]
HIV-2 _{CV-IV}	2 (6.7%)	Portugal	0.96	1970 [1959-1980]
HIV-2 _{CV-V}	1 (3.3%)	GM/GW/SN	0.77	-
HIV-2 _{CV-VI}	1 (3.3%)	Portugal	1	-
HIV-2 _{CV-VII}	1 (3.3%)	Portugal	0.97	-
HIV-2 _{CV-VIII}	1 (3.3%)	Portugal	0.97	-

AO: Angola; CG: República do Congo; CD: República Democrática do Congo. GM: Gambia; GW: Guiné Bissau; SN: Senegal. T_{MRCA}: Tempo do ancestral comum mais recente.

O maior clado, como representado na Figura 13, é constituído por 49 amostras de Cabo Verde e com relações filogenéticas com sequências de amostras originárias de países da África Central, como Angola, República Democrática do Congo e Congo - G_{CV-I}. A data de introdução de infecção foi estimada para o ano de 1979 [1972-1984]. O segundo maior clado - G_{CV-II} com data prevista de introdução no ano de 1993 [1985-1998], tem como sequências relacionadas amostras da Nigéria, como também a terceira introdução identificada no ano de 1998 [1992-2002] - G_{CV-III}. A quarta e última introdução, proveniente da mesma região do maior clado identificado, isto é, da África Central, é composta apenas por uma única sequência, não sendo possível estimar a data de entrada.

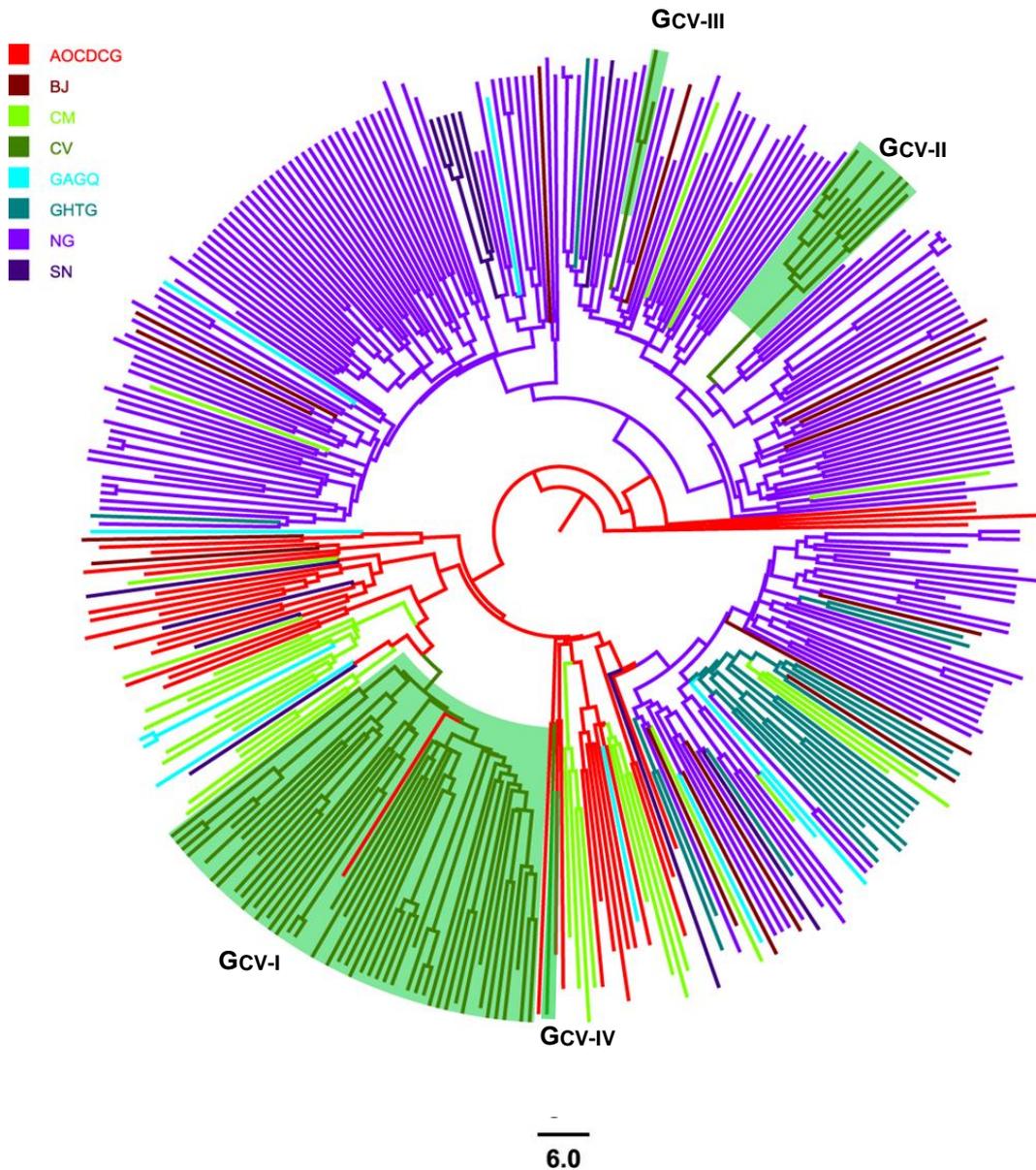


Figura 16. Análise Bayesiana de amostras classificadas como subtipo G do HIV-1 na região da *pol*. As cores dos ramos representam a origem geográfica das amostras, de acordo com a legenda acima. Caixa colorida em verde destaca os diferentes clusters que circulam em Cabo Verde de acordo com o número de amostras. O comprimento dos ramos tem como referência a barra indicada abaixo, que indica substituições de nucleotídeos por sítio.

Sequências Africanas: AO/CD/CG: Angola, República Democrática do Congo e Congo; BJ: Benin; CM: Camarões; CV: Cabo Verde; GA/GQ: Gabão e Guiné Equatorial; GH/TG: Gana e Togo; NG: Nigéria e SN: Senegal.

Para maior compreensão do fenômeno da origem do subtipo G do HIV-1 em Cabo Verde, construímos uma árvore de ML com amostras do subtipo G e CRF14_BG de Portugal e da Espanha como representada na Figura 14.



Figura 17. Árvore filogenética de ML de amostras do subtipo G e CRF14_BG do HIV-1 na região da *pol*. As cores dos ramos representam a origem geográfica das amostras, de acordo com a legenda acima. Caixa colorida destaca o cluster formado por amostras de Cabo Verde, Portugal e Espanha. O comprimento dos ramos tem como referência a barra indicada abaixo, que indica substituições de nucleotídeos por sítio.

Sequências Africanas e Europeias: AO/CD/CG: Angola, República Democrática do Congo e Congo; BJ: Benin; CV: Cabo Verde; CM: Camarões; ES: Espanha; GH/TG: Gana e Togo colapsadas; NG: Nigéria colapsada; PT: Portugal e SN: Senegal.

Verificamos que as sequências de Portugal e da Espanha estão muito fortemente relacionadas com as sequências do clado principal G_{CV-1} , pelo que optamos por recortar este clado e fazer uma nova análise introduzindo sequências provenientes de Portugal, Espanha e da África central como apresentada na Figura 15.

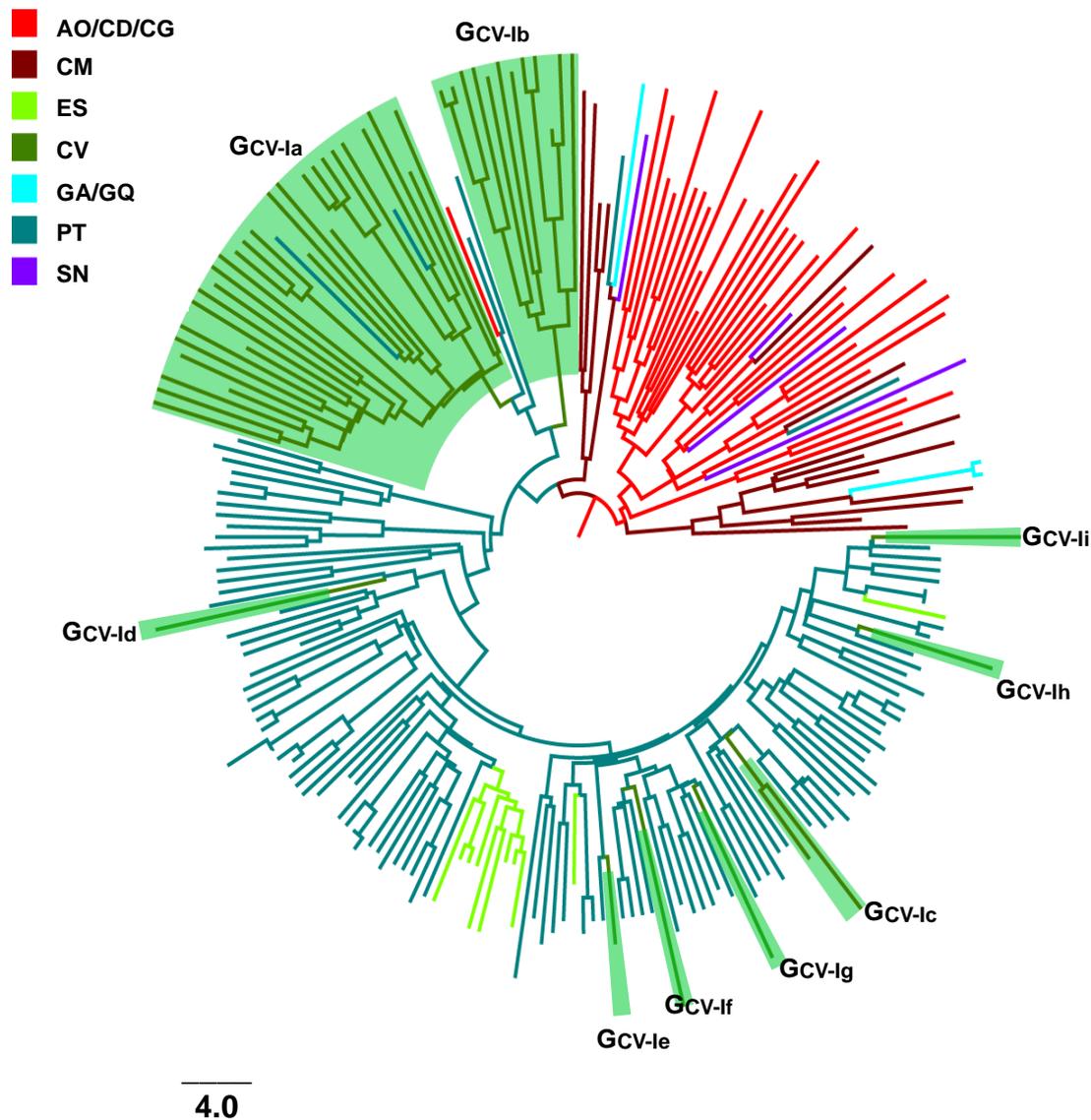


Figura 18. Análise Bayesiana de amostras do subtipo G de Cabo Verde classificadas como clado G_{CV-I} e seqüências relacionadas selecionadas a partir da árvore de ML (Fig. 8). As cores dos ramos representam a origem geográfica das amostras, de acordo com a legenda acima. Caixa colorida em verde destaca os diferentes clusters que circulam em Cabo Verde de acordo com o número de amostras. O comprimento dos ramos tem como referência a barra indicada abaixo, que indica substituições de nucleotídeos por sítio.

Seqüências Africanas e Europeias: AO/CD/CG: Angola, República Democrática do Congo e Congo; CM: Camarões; ES: Espanha; CV: Cabo Verde; GA/GQ: Gabão e Guiné Equatorial; PT: Portugal e SN: Senegal.

Essa nova análise sugere que a introdução do subtipo G do HIV-1 em Portugal deva ter ocorrido em 1978 [1967-1986], proveniente da África Central ou Camarões. O maior clado identificado na Figura 13, constituído por 49 amostras de Cabo Verde, quando analisadas em conjunto com amostras de Portugal e da Espanha é agora subdividido em 9 linhagens independentes, todas relacionadas com sequências de Portugal. Segundo essa nova análise, a primeira introdução do subtipo G do HIV-1 em Cabo Verde data de 1983 [1974-1992], proveniente de Portugal (G_{CV-Ib}). Uma segunda introdução ocorrida desde Portugal em 1985 [1976-1992] se estabeleceu e disseminou de forma mais eficaz pelas ilhas (G_{CV-Ia}). Uma terceira introdução (G_{CV-Ic}) aconteceu mais tarde, em 1998 [1991-2003], também proveniente de Portugal, como as demais introduções constituídas por uma única sequência (G_{CV-Id-Ih}), para as quais não foi possível estimar a data de entrada (Tabela 5).

Tabela 5. Origem e data de introdução do clado G_{CV-I}.

Clado	N	Origem	Probabilidade	T _{MRCA}
G _{CV-IPT}	166	AO/CG/DC	0.42	1978 [1967-1986]
		Camarões	0.53	
G _{CV-Ia}	29	Portugal	0.87	1985 [1976-1992]
G _{CV-Ib}	12	Portugal	0.98	1983 [1974-1992]
G _{CV-Ic}	2	Portugal	0.95	1998 [1991-2003]
G _{CV-Id}	1	Portugal	0.99	-
G _{CV-Ie}	1	Portugal	0.98	-
G _{CV-If}	1	Portugal	1	-
G _{CV-Ig}	1	Portugal	1	-
G _{CV-Ih}	1	Portugal	1	-
G _{CV-Ii}	1	Portugal	1	-

AO: Angola; CG: Republica do Congo; CD: Republica Democrática do Congo. T_{MRCA}: Tempo do ancestral comum mais recente

A variante que parece ter entrado mais tardiamente em Cabo Verde é o CRF02_AG. Segundo essa análise, apresentada na Figura 16, houve 19 introduções do CRF02_AG do HIV-1 em Cabo Verde, sendo 17 delas (94,7%) originárias a partir do Senegal e uma única introdução a partir de Camarões (CRF02_{CV-IX}). A primeira introdução estima-se ter ocorrido em 1986 [1979-1990] - CRF02_{CV-I}, seguida de outras em 1987 [1980-1994] - CRF02_{CV-II}, 1998 [1992-2003] - CRF02_{CV-III}, 1990 [1983-1998] - CRF02_{CV-IV}, 1995 [1987-2001] - CRF02_{CV-V}, 1997 [1989-2003] - CRF02_{CV-VI}, 2003 [1998-2007] - CRF02_{CV-VII} e 2003 [1997-2007] - CRF02_{CV-VIII}. Não foi possível estimar a data das demais introduções por representarem apenas uma amostra.

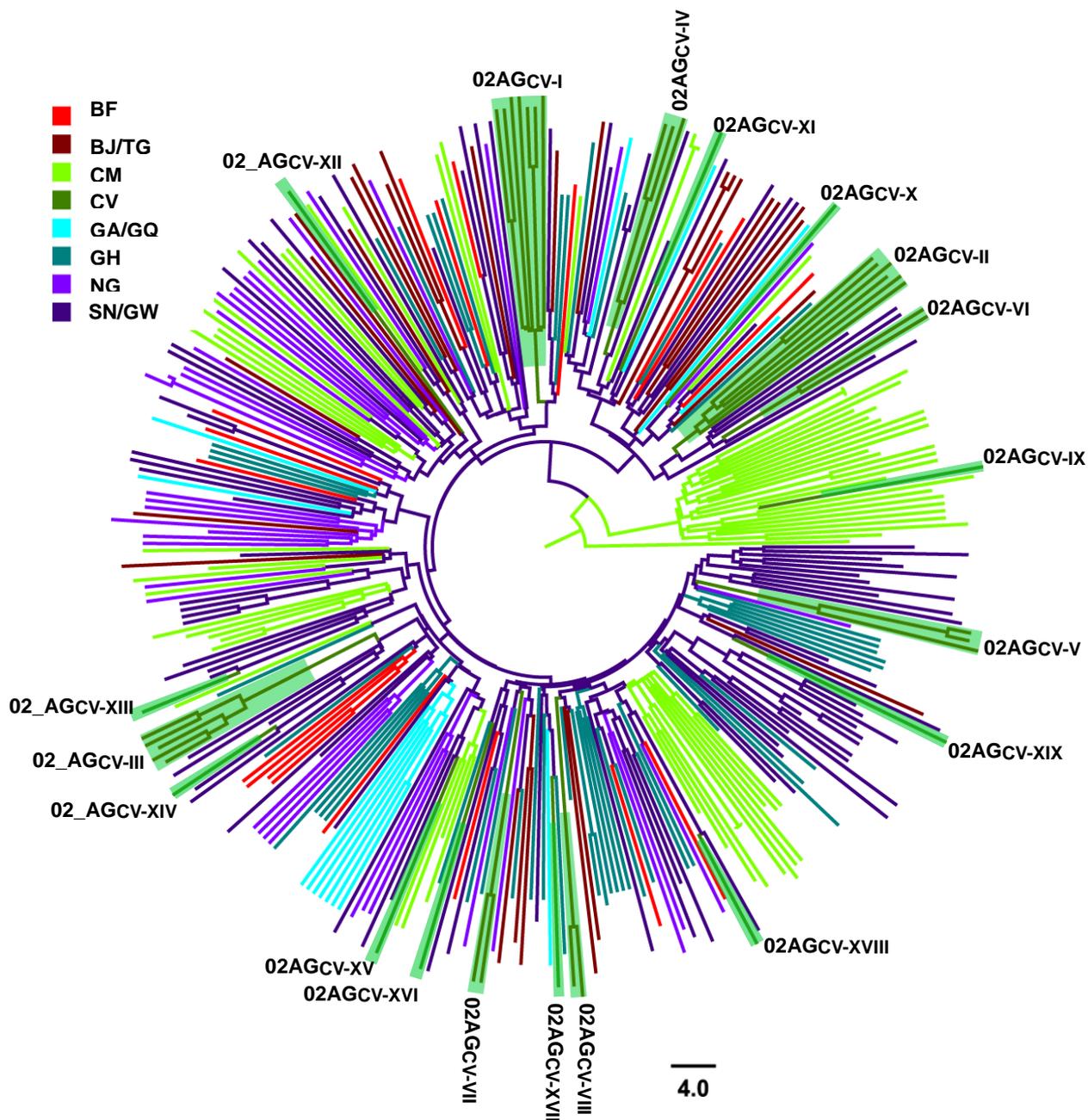


Figura 19. Análise Bayesiana de amostras africanas classificadas como CRF02_AG do HIV-1 na região da *pol*. As cores dos ramos representam a origem geográfica das amostras, de acordo com a legenda acima. Caixa colorida em verde destaca os diferentes clusters que circulam em Cabo Verde de acordo com o número de amostras. O comprimento dos ramos tem como referência a barra indicada abaixo, que indica substituições de nucleotídeos por sítio.

BF: Burkina Faso; BJ/TG: Benin e Togo; CM: Camarões; CV: Cabo Verde; GA: Gabão; GH: Gana; NG: Nigéria e SN: Senegal.

4.5) Identificação e caracterização de Mutações de resistência a drogas ARV em pacientes virgens de tratamento e pacientes sob tratamento infectados pelo HIV-1 e HIV-2

Com base nas sequências da região da polimerase obtidas dos indivíduos soropositivos para o HIV-1 e o HIV-2 avaliamos a ocorrência de DRMs aos medicamentos antirretrovirais implementado no país no final de 2004. Dos 164 indivíduos infectados pelo HIV-1 ou HIV-2 analisados para resistência às drogas 74 são virgens de tratamento (ARTv) enquanto que 87 estão em uso de tratamento antirretroviral (ARTexp). Para três pacientes esta informação não estava disponível. Entre os pacientes em tratamento 63,8% e 41,2%, infectados, respectivamente, pelo HIV-1 e HIV-2, são do sexo feminino; a média de idade entre os indivíduos acima de 15 anos é de 40,0 (IQR=15-70) e 53,4 (IQR=32-84) para as infecções pelo HIV-1 e HIV-2, respectivamente. A Tabela 6 apresenta o perfil de mutações de resistência transmitida e adquirida entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 e HIV-2.

Tabela 6. Distribuição das Mutações de Resistência a Drogas em pacientes HIV-1 virgens de tratamento e HIV-1 e HIV-2 em tratamento

Categoria de Resistência	HIV-1		HIV-2
	Naive	Tratados	Tratados
N (%)	58	69	17
Seq. sem mutação	56 (96,6)	36 (52,2)	14 (82,4)
Seq. com mutação	2 (3,4)	33 (47,8)	3 (17,6)
Seq PR com mutações para PI*	1 (1,7)	5 (7,4)	2 (11,8)
Seq RT com mutações para NRTI*	1 (1,7)	26 (37,7)	3 (17,6)
Seq RT com mutações para NNRTI*		26 (38,2)	NA

* Com base no total de amostras

Mutações transmitidas de resistência aos antirretrovirais (TDRM) foram encontradas em 3,4% (CI -1.3%-8.1%) dos indivíduos virgens de tratamento infectados pelo HIV-1, sendo 1,7% para PI e 1,7% para NRTI. Nenhuma TDRM foi encontrada no grupo de indivíduos infectados pelo HIV-2. Entre os 69 pacientes infectados pelo HIV-1 em uso de ART 33 (47,8%) apresentaram mutações de resistência aos antirretrovirais (DRM), sendo 37,7% para NRTI, 37,7% para NNRTI e 7,4% para PI. Entre os 17 pacientes infectados pelo HIV-2 em tratamento, três (17,6%) apresentaram DRM, sendo todos para NRTI e dois para a PI. A ocorrência de DRM para duas ou mais classes de drogas foi verificada tanto em pacientes infectados pelo HIV-1 (33,8%), como pelo HIV-2 (11,8%). Chama atenção a ocorrência da mutação K20I da protease, associada a uma potencial resistência de baixo nível para Nelfinavir, observada como um polimorfismo típico em todas as amostras do subtipo G e CRF02_AG.

Um caso de DRM para as três classes de drogas foi encontrado em uma criança de 8 anos residente na Praia, infectada pelo subtipo G do HIV-1. Dentre os 33 casos de infecção pelo HIV-1 apresentando alguma DRM, 66,7% eram mulheres, 36,4% estavam infectados com o subtipo G, 30,3% com CRF02_AG e 15,6% com subtipo B.

A mediana do tempo de tratamento dos indivíduos incluídos nesta análise foi de 23 (IQR=1-78) meses para os infectados pelo HIV-1 e de 37 (IQR=17-60) meses para os infectados pelo HIV-2. Entre os indivíduos com mutações de resistência para ARV o tempo médio de tratamento foi de 23 (IQR=1-78) e de 35,5 (IQR=34-37) meses para as infecções pelo HIV-1 e HIV-2, respectivamente. Analisando as demais variáveis entre os indivíduos infectados pelo HIV-1 que apresentaram DRM (Tabela 4) observamos uma proporção maior entre as mulheres e as crianças. Dos 13 indivíduos que tiveram diagnóstico entre 2004 – 2007, 92,3% já apresentam

alguma DRM em contraste com os que tiveram diagnóstico entre 2008 – 2011, que foi de 41,4%. Analisando a frequência de DRM em relação ao local de residência, constatamos que esta é maior entre os indivíduos residentes na região de Sotavento e, principalmente, entre os residentes no interior de Santiago. Em relação ao número de linfócitos TCD4/mm³, a porcentagem de indivíduos em tratamento que possuem alguma DRM é de 56,5 para os que têm menos de 350 cels/mm³ e 52,0% para os com contagem acima de 500 cels/mm³.

O Quadro 3 descreve o perfil de resistência dos pacientes em tratamento ativo, discriminados de acordo com a diversidade viral. Observamos que entre a população infectada pelo HIV-1 sob tratamento, 52,2% dos indivíduos infectados pelo subtipo G tem alguma DRM. Essa porcentagem é de 20,0% e de 45,5% para os infectados pelo subtipo F e CRF02_AG, respectivamente, e de 52,5% entre o grupo denominado “Outras Formas Circulantes”. O subtipo B que contribui com a maioria dos casos nesse grupo (36,8%), tem uma frequência de DRM de 71,4. Todas as amostras identificadas como URF_GU, CRF05_DF e CRF25_cpx sob tratamento possuem alguma DRM. As mutações M184V (71,9%) e K103N (31,3%) foram as principalmente encontradas para NRTI e NNRTI, respectivamente. Dentre os 33 pacientes em tratamento com alguma mutação de resistência, 26 (78,8%) apresentaram alto nível de resistência, 16 (48,5%) apresentaram resistência intermediária e 29 (87,9%) apresentaram resistência baixa ou potencialmente baixa para uma ou mais classes de antirretrovirais. Destacamos ainda que dentre os 33 pacientes com DRM, foi possível identificar o esquema terapêutico utilizado em apenas 25. Desses 22 (88,0%) são pacientes em 1ª linha de tratamento e apenas 3 (12,0%) já tinham iniciado a 2ª linha de tratamento com introdução de uma droga inibidora da protease.

Em relação aos casos de infecção pelo HIV-2, observamos que 17,6% (3/17) apresentaram alguma DRM, sendo que dois apresentaram a mutação Q151M, que leva a alta resistência à maioria dos NRTI, com exceção do TDF. A mutação M184V foi identificada nos 3 pacientes HIV-2 positivos que apresentaram DRM, levando a alta resistência ao 3TC e FTC, enquanto que 2 apresentaram alta resistência ao PI em uso (Lopinavir).

Quadro 3. Mutações de resistência do HIV-1 e do HIV-2 de acordo com a classe de antirretroviral em uso e diversidade genética do vírus

Diversidade Molecular	ID	Esquema Terapêutico	Classe de Antirretroviral			Resistência aos antirretrovirais		
			NRTI	NNRTI	PI	Alta	Média	Baixa ou Potencialmente baixa
HIV-1								
G	1	d4T+3TC+NVP	K65E, D67EK					AZT, d4T
	2	d4T+3TC+NVP	M184V	K103N		3TC, FTC; EFV, NVP		ABC, DDI
	3	d4T+3TC+NVP	M184MV	Y181CY, H221HY		3TC, FTC; NVP	EFV, ETR; RPV	ABC, DDI
	4	AZT+3TC+NVP	K70KR, M184MV	Y181CY, H221HY		3TC, FTC; NVP	AZT; EFV, ETR, RPV	ABC, d4T, DDI, TDF;
	5	d4T+3TC+NVP	M184MV	K101E, E138G, G190AG		3TC, FTC; EFV, NVP	ETR, RPV	ABC, DDI
	6	d4T+3TC+NVP	M184MV	K103N, K238KT		3TC, FTC; EFV, NVP		ABC, DDI
	7	d4T+3TC+NVP	M184MV	K103KN, Y181CY		3TC, FTC; EFV, NVP	ETR, RPV	ABC, DDI
	8	d4T+3TC+NFV	M184V	K103N		3TC, FTC; EFV, NVP		ABC, DDI,
	9	NI	M184V	V179E, Y181C		3TC, FTC; NVP	EFV, ETR; RPV	ABC, DDI
	10	NI	M41L, M184V, L210W, T215Y	K103N, Y188L		3TC, ABC, AZT, d4T, DDI, FTC; EFV, NVP, RPV	TDF	ETR
	11	NI	D67DN, T69ADNT, K70KR, M184V, T215FIST, K219KQ	G190AG	G48GMRV, I54IV, V82IS	3TC, ABC, AZT, d4T, DDI, FTC; NVP; ATV/r, IDV/r, NFV, SQV/r	TDF; EFV; FPV/r, LPV/r,	ETR, RPV
	12	d4T+3TC+NVP			M46LM			ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV
CRF02_AG	13	NI		V90I, E138AE				RPV
	14	d4T+3TC+NVP	T69N, Y115FY				ABC	DDI, TDF
	15	AZT+3TC+NVP	M184IM			3TC, FTC		ABC, DDI
	16	AZT+3TC+NVP	M184V, T215Y	K101H, G190A, Y318F		3TC, FTC; EFV, NVP	ABC, AZT, d4T	DDI; ETR, RPV
	17	d4T+3TC+NVP	V75IV, M184V	A98AG, V108IV, Y181C, H221HY		3TC, FTC; EFV, NVP, RPV	EFV, ETR; RPV	ABC, DDI
	18	AZT+3TC+NVP	M184MV	V106AEV, G190AG		3TC, FTC; EFV, NVP		ABC, DDI; ETR, RPV
	19	AZT+3TC+NVP+(LPV+RTV)	D67N, T69NT, K70R, M184V,	V90I, K103N, Y318FY		3TC, AZT, d4T, DDI, FTC; EFV, NVP	ABC, TDF	

			T215Y, K219Q					
	20	AZT+3TC+(LPV+RTV)	M184MV	G190AG		3TC, FTC; NVP	EFV	ABC, DDI; ETR, RPV
	21	NI	M184V	K103N		3TC, FTC; EFV, NVP		ABC, DDI
	22	d4T+3TC+NVP		V90I	N83DN			NFV, TPV/r
F	23	d4T+3TC+NVP	M184V	Y188FL		3TC, FTC; EFV, NVP, RPV		ABC, DDI, ETR
B	24	d4T+NVP+LPV	A62V, V75I, F116Y, Q151M, M184V	Y188L		3TC, ABC, AZT, d4T, DDI, FTC; EFV, NVP, RPV		TDF; ETR
	25	NI	M41L, D67G, M184V		V32I, M46I, I47A	3TC, FTC; FPV/r, LPV/r, NFV	ATV/r, DRV/r, IDV/r	ABC, AZT, d4T, DDI; SQV/r, TPV/r
	26	AZT+3TC+(LPV+RTV)	M41LM, M184MV, L210LW, T215NSTY	K103NS, V106IM		3TC, ABC, AZT, d4T, DDI, FTC, TDF; EFV, NVP		
	27	d4T+3TC+NVP		K103KN, Y181CY, Y188CY, G190AE		EFV, ETR, NVP, RPV		
	28	d4T+3TC+NVP			G73GS			ATV/r, NFV, SQV/r
CRF05_DF	29	AZT+3TC+EFV		V179D				EFV, NVP
	30	NI	M184IMV	V179DV, G190AG		3TC, FTC; NVP	EFV	ABC, DDI; ETR, RPV
CRF25_cpx	31	d4T+3TC+NVP	K65R, T69d, K219R	K103N, Y181C, G190A, H221HY		ABC, d4T, DDI, TDF; EFV, NVP, RPV	3TC, FTC; ETR	
CRF_AU	32	NI	D67N, T69KNT, K70R, M184V, T215AITV, K219Q	K103N, E138A		3TC, AZT, d4T, FTC; EFV, NVP	ABC, DDI, TDF	RPV
CRF_GU	33	d4T+3TC+NVP		G190GS		EFV, NVP		ETR, RPV
HIV-2								
A	1	AZT+LPV	M184V	NA	V47A, I82F	3TC, FTC; LPV/r	SQV/r	
	2	AZT+EFV(?) +LPV	Q151M, M184V	NA		3TC, ABC, AZT, d4T, DDI, FTC		
	3	d4T+3TC+LPV+RTV	Q151M, M184V	NA	V47A, I50V	3TC, ABC, AZT, d4T, DDI, FTC; LPV/r	DRV/r	

V. DISCUSSÃO

Neste estudo procuramos realizar uma caracterização molecular da epidemia do HIV em Cabo Verde, incluindo amostras de indivíduos soropositivos de todas as ilhas habitadas, exceto S. Nicolau e Maio, localizados respectivamente na região de Barlavento e Sotavento, que contribuíram entre 2005 e 2011 com menos de 2,5% do total de casos de HIV diagnosticados por ano em Cabo Verde (Verde, 2005-2011). Boletins Epidemiológicos e Relatórios Estáticos disponíveis no site do Ministério da Saúde de Cabo Verde (www.minsaude.gov.cv) mostram que estas ilhas contribuem com 0,8% e 1,6%, respectivamente, no total de casos diagnosticados por ano em Cabo Verde (Verde, 2005-2011).

Identificamos que a epidemia do HIV em Cabo Verde apresenta características próprias, bem como, outras que são semelhantes ao cenário molecular e epidemiológico já descrito em outros países da África Ocidental (Andreasson et al., 1993; de Silva et al., 2013; Esbjörnsson et al., 2011; Hamel et al., 2007; Toure-Kane et al., 2000). Entre os 221 pacientes incluídos no estudo 169 (76,5%) são infectados com o HIV-1, 43 (19,5%), com o HIV-2 e 9 (4,1%) estão infectados pelos dois tipos virais (HIV-1+HIV-2). Estes valores coincidem com os percentuais de infecções causadas pelos tipos de HIV que circulam atualmente em Cabo Verde. Segundo relatórios estatísticos publicados pelo Ministério da Saúde de Cabo Verde, de 2007 a 2011, o percentual médio de indivíduos HIV-1, HIV-2 e HIV-1+2 diagnosticados por ano no país é de 67,8%, 21,8% e 5,5%, respectivamente (Verde, 2005-2011).

A alta proporção (70,0%) de mulheres nesta pesquisa também reflete o maior número de mulheres diagnosticadas em Cabo Verde. Esse número pode estar diretamente relacionado à vigilância ativa da prevenção de transmissão vertical, o

que estimula um maior número de mulheres a buscarem conhecer o seu status sorológico para a infecção pelo HIV, como também por fenômenos sociais e de promoção da saúde mais voltados para indivíduos do sexo feminino. Esses fenômenos implicam numa maior adesão ao acompanhamento e tratamento médico e mostra ainda a necessidade de programas para melhorar as estratégias de atração do homem para o diagnóstico e acompanhamento e/ou tratamento médico.

Em relação às faixas etárias, destaca-se o percentual de indivíduos infectados pelo HIV-2 (44,2%) com idade acima de 49 anos, muito maior em relação aos indivíduos infectados pelo HIV-1 (16,6%) nessa faixa etária. Isso pode estar associado a uma infecção mais remota, num período onde a infecção devido ao HIV-2 era mais prevalente e/ou ao fato do HIV-2 ter um período maior de latência clínica, levando ao aparecimento dos primeiros sintomas após 15–20 anos da infecção e, conseqüentemente, maior demora na procura dos serviços de saúde para diagnóstico e assistência. Por outro lado, a proporção de indivíduos infectados pelo HIV-1 mais jovens, na faixa etária de 15-29 anos (17,2%), é muito maior do que a proporção correspondente de entre os infectados pelo HIV-2 (7,0%), destacando a necessidade de programas de prevenção que visem aos jovens. De fato, um estudo realizado em 2005 em Cabo Verde mostrou que 21,4% e 45,6%, respectivamente, dos meninos e meninas entre 15-19 anos de idade teve sua primeira relação sexual antes dos 15 anos e 87,4 meninas e 93,3 meninos nessa mesma faixa etária, referem conhecimento do preservativo como uma forma de prevenção contra o HIV (Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde, 2008). Estes dados também são concordantes com estudos anteriores realizados em outros países da África Ocidental que mostram uma maior frequência da infecção pelo HIV-2 entre os indivíduos com mais de 49 anos e uma maior prevalência de HIV-1 entre os

indivíduos mais jovens (Poulsen et al., 2000; Wilkins et al., 1991; Wilkins et al., 1993).

A forma de transmissão mais comum tanto do HIV-1 como do HIV-2 em Cabo Verde, segundo dados do presente estudo é através do contato sexual, principalmente a heterossexual. Não há referências de transmissão por transfusão de sangue e/ou seus derivados e pouco se sabe sobre transmissão por uso de droga intravenosa e/ou por relação homossexual. A frequência de crianças infectadas por transmissão vertical foi mais baixa para o VIH-2 (2,3%) em comparação com o VIH-1 (16,0%), tal como descrito para outros países em que ambos os tipos circulam (Adjorlolo-Johnson et al., 1994; Andreasson et al., 1993).

Os dois tipos de vírus, HIV-1 e HIV-2, circulam em todas as ilhas de Cabo Verde estudadas em proporções semelhantes nas diferentes ilhas. Na Praia e Interior de Santiago, ambos localizados na maior e mais populosa ilha de Cabo Verde (Santiago), as frequências relativas das infecções pelo HIV-1 e pelo HIV-2 diferem em mais de 20%.

O perfil da caracterização molecular das amostras HIV-1 incluídas no presente estudo, que abrange sete das nove habitadas ilhas de Cabo Verde, apresentou um padrão mais complexo, com uma predominância do subtipo G (36,6%), seguido por CRF02_AG (30,6%), subtipo F1 (9,7%), subtipo B (5,2%), subtipo C (2,2%), e outras formas recombinantes (15,5%). A presença, mesmo sendo em baixa frequência dos subtipo B e C e dos CRF05_DF, CRF06_cpx, CRF25_cpx e CRF49_cpx detectados entre as amostras estudadas de Cabo Verde retratam um cenário molecular único da epidemia HIV/aids em Cabo Verde. Este perfil de distribuição é diferente do anteriormente estimado para Cabo Verde que prevê uma frequência de 48% para o subtipo G, 7% para o subtipo B, 7% para o subtipo F1, 7% para o CRF02_AG e 30% para as demais formas recombinantes

(Oliveira et al., 2012). O baixo número de pacientes infectados pelo HIV-1 analisados nesse estudo (n=27), combinada com a alta complexidade da epidemia de HIV-1 em Cabo Verde pode explicar tais diferenças. Por outro lado, a diferença de 5 anos entre os tempos de coleta das amostras pode influenciar nos resultados. O perfil da epidemiologia molecular do HIV-1 em Cabo Verde também é diferente do que é descrito em outros países da África Ocidental, onde a epidemia de aids é dominada pelo CRF02_AG (50%), seguido pelo subtipo G (28%), outros recombinantes (8%) e subtipo A (4%) (Hemelaar et al., 2011). Assim, as características moleculares mais notáveis da epidemia pelo HIV-1 em Cabo Verde parece ser a alta prevalência dos subtipos G e F1 e a ausência do subtipo A.

Em relação à caracterização molecular, todas as sequências das amostras consideradas positivas para HIV-2 analisadas pertenciam ao grupo A, semelhante ao que já foi anteriormente descrito em Cabo Verde (Oliveira et al., 2012) e outros países do Oeste Africano (Parreira et al., 2000; Peeters et al., 1998). No nosso estudo, a análise da árvore filogenética do HIV-2 chama atenção pela presença de um cluster com alto suporte, incluindo a maioria das amostras da região Barlavento, sugerindo possíveis introduções independentes e/ou dinâmicas distintas de distribuição do HIV-2 entre as ilhas de Cabo Verde.

Com base no teste de agrupamento filogenético evidenciamos que a distribuição do HIV-2 em Santiago não sugere associação entre as amostras. Já entre Barlavento e Sotavento, esta sugere associação entre as amostras ($p < 0,0001$), sendo as amostras de cada região mais próximas entre si na árvore filogenética. Embora não tenhamos todos os subsídios que possam esclarecer essa diferença, propomos aqui duas hipóteses para este fato. Em primeiro lugar, como acontece e aconteceu em vários outros países, a capital e a maior ilha de Cabo Verde, Santiago (pertencente à região de Sotavento) foi, provavelmente, a porta de

entrada da epidemia de aids que, no início foi principalmente devido à infecção pelo HIV-2, correspondendo a mais de 90% dos casos diagnosticados na década de 80 (Direcção Geral de Saúde, 2007). Esta hipótese pode ser subsidiada pelos resultados da análise bayesiana para determinação da origem e data de entrada das principais variantes de HIV-1 e HIV-2 que circulam em Cabo Verde. Nessa análise identificamos que a primeira introdução de HIV em Cabo Verde foi em 1967 pelo HIV-2, a partir provavelmente de Portugal. Outros subsídios importantes são o fato de que o primeiro isolamento do HIV-2 tenha sido feito em um paciente hospitalizado na França originário de Cabo Verde (Clavel et al., 1986); pelo grande número de estudos realizados nos Estados Unidos (Kloser et al., 1989; Smallman-Raynor and Cliff, 1991; van der Ende et al., 1990; van Veen et al., 2009) e na Europa (Clavel et al., 1987; Wood et al., 2012) relatando casos de HIV-2 em pacientes de origem caboverdeana e pelo fato de que a origem do HIV-2 grupo A estar relacionada à Guiné-Bissau, presume-se que sua expansão tenha se dado durante a guerra colonial pela libertação da Guiné e Cabo Verde (Faria et al., 2012; Lemey et al., 2003), que coincide com a data do mais recente ancestral comum (1967 [1959 – 1973]). Provavelmente, a disseminação de HIV-2 para as outras regiões do país ocorreu mais tarde, através de Santiago ou através de novas introduções posteriores, coincidindo com a introdução e dispersão do HIV-1. Por outro lado, a ilha de Santiago e mais especificamente, Interior de Santiago, sempre foi a região com maior concentração de população caboverdeana e o grosso da população que emigrou no período colonial para a Guiné-Bissau e Portugal, devido à guerra de independência de Cabo Verde e Guiné-Bissau, ocorrida na Guiné-Bissau no período de 1961 a 1974. Estudo realizado em Bissau apontou como fator de risco para infecção com HIV-2, indivíduos com mais de 50 anos que relatam sexo extramatrimonial, prostituição e transfusão de sangue (Poulsen et al., 2000).

Segundo estudo conduzido por Gomes et al., a maioria dos casos de infecção por HIV-2 diagnosticados em Portugal são em indivíduos originários de Guiné-Bissau e Cabo Verde, sendo que a maioria (67%) nasceu entre 1940 – 1970 (Gomes et al., 2003). No entanto, outro estudo levado a cabo em Portugal, relata presença de HIV-2 entre portugueses que estiveram na Guiné durante a guerra colonial e outros indivíduos relacionados a esses soldados que contraíram o vírus por transmissão sexual, ou com história de viagem para África (Mota-Miranda et al., 2004; Victorino et al., 1992). Tratando-se de um vírus que pode ser adquirido por transmissão sexual, não está descartada a hipótese da entrada em Cabo Verde tenha sido através de indivíduos caboverdeanos que tenham adquirido essa infecção na Guiné-Bissau ou Portugal, ou de Portugueses e guineenses que viajaram para Cabo Verde, quer seja durante a guerra, ou após a independência, sendo posteriormente o HIV-2 disseminado em Santiago e posteriormente para outras regiões de Cabo Verde.

Vários países em que a predominância do HIV-2 no início da epidemia de aids era maior do que o HIV-1, relatam alterações nessa predominância ao longo do tempo. Isso tem acontecido principalmente em países da África Ocidental, como Senegal, Gâmbia e Guiné-Bissau (de Silva et al., 2013; Hamel et al., 2007; van der Loeff et al., 2006), países esses vizinhos a Cabo Verde. A maior prevalência de HIV-2 em relação ao HIV-1 nesses países, diferente da dinâmica da epidemia de aids nas outras regiões do mundo, levou a uma discussão científica sobre o possível efeito protetor do HIV-2 contra o HIV-1, o que não foi provado até então posto que, uma vez o HIV-1 entrando no país, sua disseminação se deu de forma similar a países onde apenas circula o HIV-1 (Greenberg, 2001; Wiktor et al., 1999). Em Cabo Verde também observamos uma diminuição relativa de HIV-2 em relação ao HIV-1, apesar do número absoluto de HIV-2 entre os casos diagnosticados por ano permanecer constante, enquanto que há um aumento no número de casos de

infecção pelo HIV-1 ao longo dos anos (Direcção Geral de Saúde, 2007; Verde, 2005-2011).

Em relação ao HIV-1, o subtipo G, apontado neste estudo como o mais prevalente em Cabo Verde, vale dizer que também é frequente em alguns países da África Ocidental e Central, incluindo Nigéria, Togo, Camarões e República do Congo (Lihana et al., 2012). Esse subtipo foi encontrado principalmente entre pacientes positivos pelo HIV-1 residentes na região de Sotavento, provavelmente indicando um efeito fundador local. Os resultados do nosso estudo de filodinâmica para estimar a origem e dispersão do subtipo G, apoiam a tese de Oliveira et al. (Oliveira et al., 2012) quando sugere a origem do subtipo G de Cabo Verde a partir de Portugal e/ou Angola. Em Angola, país Africano com estreitas relações com Cabo Verde, foi descrita a presença do subtipo G na população local (Afonso et al., 2012a).

A data estimada da primeira introdução, quando comparada somente com amostras africanas, indica o ano de 1979, que coincide com a independência das ex-colônias Portuguesas e, conseqüentemente, com o retorno de caboverdeanos residentes em Angola para Cabo Verde e de portugueses para Portugal (Graça, 2007). A introdução a partir da Nigéria, como demonstrada, acontece posteriormente (1993 [1985 – 1998]) e pode estar relacionada à proximidade geográfica e pela adesão de Cabo Verde à Comunidade Econômica dos Estados da África Ocidental (CEDEAO), que concede livre trânsito de pessoas entre os respectivos países. Segundo o Recenseamento Geral da População e Habitação realizado em 2010 (RGPH 2010) residem em Cabo Verde cerca de 740 nigerianos (Verde, 2010). No entanto, o subtipo G do HIV-1 é também o subtipo não-B mais prevalente em Portugal (Abecasis et al., 2013; Esteves et al., 2003; Esteves et al., 2002; Palma et al., 2007), outro país com estreitas relações com Cabo Verde, onde está concentrada a maior comunidade de emigrantes caboverdeanos na Europa. A

árvore filogenética de ML demonstrou que a maioria das amostras de Cabo Verde identificadas na análise bayesiana construída apenas com amostras africanas (Gcv-1), também está fortemente relacionada com amostras do subtipo G e CRF14_BG de Portugal e Espanha. A segunda análise bayesiana realizada a partir desse clado (Gcv-1) e incluindo amostras africanas e europeias, apresentam uma nova dinâmica de origem e data de introdução. A origem e data de entrada em Portugal coincidem com a origem e data de entrada prevista para Cabo Verde, quando analisada somente com amostras africanas, isto é, a partir da África Central (Angola ou Camarões ou República Democrática do Congo). Segundo o teste de agrupamento filogenético das sequências majoritárias de HIV em Cabo Verde de acordo com a região geográfica de origem, evidenciamos que em relação ao HIV-1, as duas maiores variantes genéticas circulantes no país (G e CRF02_AG) não apresentam nenhum padrão de distribuição geográfica entre as regiões (BA x SO) e em Santiago (PR x IS). Diferentemente do HIV-2 grupo A, não temos subsídios para relacionar essa infecção a partir de soldados portugueses que estiveram na guerra para independência de Guiné e Cabo Verde. No entanto, não podemos descartar a volta para Portugal de soldados portugueses que participaram da guerra em Angola, bem como, referido anteriormente, de indivíduos caboverdeanos residentes em Angola, para Cabo Verde e/ou Portugal (Graça, 2007). As múltiplas introduções do subtipo G apresentadas na tabela 6, todas relacionadas a sequências identificadas no Banco de Dados como sendo de Portugal, e sendo a última introdução com data prevista em 1998, evidenciam uma forte relação entre indivíduos de Cabo Verde e Portugal, com história de transmissão do HIV ao longo do tempo. Outro dado do nosso estudo que reforça essa relação de transmissão é a quantidade de amostras do subtipo B sequenciadas nesse trabalho. Todas as sete amostras HIV-1 do subtipo B identificadas são de indivíduos residentes na ilha de Santiago, sendo que seis dentre

eles são do interior de Santiago, região essa como referida acima, com maior número de emigrantes caboverdeanos em Portugal. Estudo realizado por Esteves et al. entre africanos residentes em Lisboa, revelou que entre os de origem caboverdeana, o subtipo B é o subtipo não-G mais frequente nessa população (Esteves et al., 2002).

O CRF02_AG, apesar da sua tardia introdução, parece ser melhor distribuído entre as ilhas, provavelmente devido a introduções independentes que ocorrem ao longo do tempo a partir de Senegal e Guiné-Bissau. CRF02_AG é a forma recombinante mais prevalente do HIV-1 encontrada em maior frequência na maioria dos países da África Ocidental incluindo Guiné-Bissau e Senegal (Esbjörnsson et al., 2011; Hamel et al., 2007; Hemelaar et al., 2011; Lihana et al., 2012). Esses são os países mais próximos de Cabo Verde e com os quais o país sempre teve ligação, quer por via marítima como por ligação aérea, mais recentemente. Estudos realizados em países de outros continentes, onde o CRF02_AG não é comumente encontrado, relaciona a entrada dessa forma recombinante com países da Costa Ocidental Africana, nomeadamente Guiné-Bissau e Senegal (Bracho et al., 2014; Delatorre et al., 2012; Giuliani et al., 2013). Durante os períodos de seca e fome em Cabo Verde, antes mesmo dos conflitos que culminaram com a guerra de libertação do colonialismo português de Cabo Verde e Guiné, que aconteceu na Guiné-Bissau, muitos caboverdeanos emigraram para Senegal e Guiné-Bissau, por serem países próximos com melhores possibilidades de trabalho e sustento. Em 1980 houve um golpe de estado na Guiné-Bissau e posteriormente outros conflitos políticos que provocaram uma crise econômica, social e humanitária. Isto fez com que muitos caboverdeanos que ainda residiam em Guiné, voltassem para Cabo Verde e muitos guineenses, aproveitando do acordo de livre circulação da CEDEAO, imigraram para

Cabo Verde em busca de melhores condições de vida. Cerca de seis mil guineenses e dois mil senegaleses vivem hoje em Cabo Verde (Verde, 2010).

Embora presente em uma frequência baixa (9,7%), o subtipo F1 é o subtipo mais frequente na ilha de S. Vicente, possivelmente originado por uma única ou poucas introduções. Este subtipo é ocasionalmente encontrado em alguns países da África Ocidental, como Guiné Conakry, Mali e Senegal (Derache et al., 2008; Freimanis et al., 2012; Toure-Kane et al., 2000) e é frequentemente detectada em outros países, com relações históricas com Cabo Verde, como Angola, Cuba e Brasil (Afonso et al., 2012b; Cuevas et al., 2002; Morgado et al., 2002).

É de notar a ausência de subtipo A "puro" do HIV-1, em Cabo Verde, como descrito em países da África Ocidental, próximos geográfica e culturalmente com Cabo Verde e cuja diversidade viral do HIV-1 se assemelham (Esbjörnsson et al., 2011; Hamel et al., 2007; Hemelaar et al., 2011; Lihana et al., 2012). No entanto, fragmentos do subtipo A foram encontrados em amostras com genomas recombinantes na região *pol* identificados como URFs_UA. É interessante notar que sete amostras URFs_AU formam um cluster monofilético com o subtipo A com alto valor de bootstrap, sugerindo que pode ter evoluído a partir de um ancestral comum. Outras três amostras com estruturas recombinantes independentes apresentam um fragmento do sub-subtipo A3 correspondente à região de transcriptase reversa. O sub- subtipo A3 já foi descrito, como tendo alta prevalência em alguns países do Oeste Africano, como Senegal, Guiné-Bissau e Guiné Equatorial (Esbjörnsson et al., 2011; Hamel et al., 2007; Meloni et al., 2004). Mais estudos, utilizando genomas inteiros do HIV-1 serão necessários para confirmar a ocorrência de novos CRFs em Cabo Verde.

A emigração de caboverdeanos é uma realidade desde o início do século XX, favorecida pela captura de baleias em Cabo Verde, principalmente por barcos

americanos, o que provocou a primeira onda de emigração cabo-verdiana para os Estados Unidos da América. Mais tarde, na década de 60, durante constantes períodos de seca e fome, instabilidade política e os conflitos que culminaram com a independência, em 1975, houve uma forte emigração para países vizinhos da Costa Oeste da África (S. Tomé e Príncipe, Guiné-Bissau, Senegal e Costa do Marfim), bem como para a América do Sul (Brasil) e Europa (Portugal e Holanda) (Graça, 2007). Após a independência, a emigração continuou, principalmente para a Europa e Estado Unidos da América, diminuindo nos anos 90 com o início da recessão económica na Europa. Nessa mesma época, começou a migração de trabalhadores sazonais para Cabo Verde a partir de países como a Guiné-Bissau, Senegal e Nigéria com prevalência de HIV/aids, em 2012, em torno de 2.5%, 0.7% e 3.7% respectivamente (Unaid, 2013). Esses deslocamentos de e para Cabo Verde certamente têm impacto na atual diversidade genética do HIV-1 e HIV-2 no país, como foi relatado em outros países africanos (Imamichi et al., 2009).

O acesso universal ao tratamento antirretroviral tem impacto importante e direto sobre a mortalidade e morbidade, bem como na redução da transmissão (Cohen et al., 2012). Por outro lado, o aumento da disponibilidade de ART é um desafio para o controle das DRMs em pacientes virgens de tratamento e tratados, e passa a ser de maior importância em situações em que há ruptura de stock na oferta dos medicamentos e/ou baixa aderência.

Em Cabo Verde, em 2004, o tratamento com ARV tornou-se disponível para todos os pacientes com contagem de linfócitos TCD4 inferior a 200 células/mm³ ou aqueles que apresentam doença definidora de aids. Isso poderá justificar o número de pacientes cujo diagnóstico foi efetuado antes de 2004, quer pela baixa adesão de indivíduos aos testes sorológicos oferecidos, como por uma morbidade e mortalidade maior antes da oferta do tratamento. Ao mesmo tempo, a quantidade de

indivíduos com diagnóstico realizado após 2004 e mais concretamente após 2008, aponta para uma maior procura, maior capacidade de fidelização dos serviços de saúde e/ou por uma maior sobrevivência e qualidade de vida dos infectados. No entanto, indivíduos cabo-verdianos infectados com HIV-1 ou HIV-2 que vivem em outros países ou mesmo em Cabo Verde podem ter iniciado o tratamento antes de 2004, como comprovado por um paciente incluído nessa análise.

A baixa frequência e um aumento não significativo de DRM em pacientes infectados pelo HIV-1 já foi descrita em pacientes virgens de tratamento na África Ocidental (Derache et al., 2008; Gupta et al., 2012), mas vários estudos mostram aumento de TDRM, afetando especialmente a África subsaariana, impulsionado pela resistência a NNRTI (Aghokeng et al., 2011; Gupta et al., 2012). Para o HIV-2, DRM foi descrito em um paciente virgem de tratamento residente em Guiné-Bissau (Jallow et al., 2009). No presente estudo, DRM foi encontrada em baixa frequência entre os pacientes soropositivos para HIV-1 virgens de tratamento e não foi detectada nenhuma DRM em pacientes virgens de tratamento infectados pelo HIV-2. A frequência de TDRM encontrada no nosso trabalho contrasta com o que foi anteriormente publicado, provavelmente pelo menor número de pacientes virgens de tratamento analisados (Oliveira et al., 2012). Nossos resultados, no entanto, estão de acordo com outros estudos realizados em regiões de recursos limitados, onde o programa de acesso a tratamento com antirretrovirais foi implementado em 2000 e anos seguintes, relatando uma frequência de menos de 5% de novas infecções com vírus resistentes (Ayoubba et al., 2009; Price et al., 2011; Ssemwanga et al., 2012; Tang and Shafer, 2012). Em Senegal país vizinho a Cabo Verde há relato de que a resistência adquirida seja de 76,4% (Thiam et al., 2013), enquanto que a frequência de resistência transmitida seja de 4% (Diop-Ndiaye et al., 2010), frequências similares do que foi encontrado no nosso trabalho. No estudo conduzido por Oliveira

et al (Oliveira et al., 2012), foram analisados 17 pacientes virgens de tratamento e 2 (12%) apresentaram resistência transmitida, em contraste com os 3,4% citados em nosso trabalho. Supomos que a diferença entre esses dois estudos, tem muito a ver com o número de amostra utilizada em cada trabalho. Isso nos mostra a necessidade de estudos em larga escala, a fim de se conhecer a verdadeira frequência de resistência transmitida entre a população soropositiva em Cabo Verde para melhor enquadramento de acordo com a classificação da OMS no que diz respeito à resistência de mutações transmitida. Apesar da baixa frequência de DRM em pacientes virgens na região, consideramos ser relevante essa vigilância, a fim de se obter subsídios para estabelecer programas de vigilância no monitoramento de TDRM em Cabo Verde e nos países vizinhos (Hamers et al., 2011).

A prevalência de DRM entre os pacientes HIV-1 positivos em tratamento (50%) incluídos neste estudo de 2009-2011 é maior do que a prevalência estimada anteriormente (30%) para Cabo Verde (Oliveira et al., 2012). A frequência de DRM em Cabo Verde é menor do que a observada em Senegal (Thiam et al., 2013), mas superior em comparação com os outros países da África Ocidental (Charpentier et al., 2011) e Portugal (Vercauteren et al., 2013). Considerando que os pacientes incluídos no nosso estudo estão em acompanhamento ambulatorial e, em sua maioria, com esquema terapêutico de 1ª linha, esta alta frequência de resistência aos antirretrovirais em uso (78,8%), sugere a necessidade urgente de um monitoramento por carga viral e o teste de genotipagem de forma rotineira de forma a assegurar o sucesso terapêutico. M184V (71,9%) e K103N (31,3%) foram as principais mutações NRTI e NNRTI, respectivamente encontradas em Cabo Verde, como descrito em outros países (Hamers et al., 2012; Thiam et al., 2013).

Entre os pacientes HIV-2 positivos em terapia antirretroviral, 17,6% apresentaram DRMs, sendo todas para NRTI e duas para PI e a mutação M184V

está presente em todos os pacientes com DRMs. Este dado é semelhante ao dos estudos realizados no Senegal e Guiné-Bissau (Gottlieb et al., 2009; Rodés et al., 2000). Estudos mais abrangentes se fazem necessários a fim de caracterizar melhor a resistência a antirretrovirais com base no tratamento efetuado, pois diferenças descritas na susceptibilidade do HIV-1 e HIV-2 para as diferentes classes de antirretrovirais atualmente disponíveis (Menéndez-Arias, 2013), constituem um desafio para os pacientes em países onde os dois vírus co-circulam.

Em suma, Cabo Verde tem uma diversidade molecular do HIV complexa e uma epidemia dominada pelo subtipo G e CRF02_AG do HIV-1 e pelo grupo A do HIV-2, sendo que genomas recombinantes contendo sub-subtipo A3 foi descrita pela primeira vez em Cabo Verde. A primeira introdução do HIV no país parece ter acontecido a partir do HIV-2, tendo como origem Portugal no final da década de 60. O HIV-1 parece ter entrada mais tarde, primeiramente pelo subtipo G a partir de Portugal no ano de 1978 e mais tarde pelo CRF02_AG a partir de Guiné-Bissau ou Senegal em 1986.

Além disso, nossos dados também evidenciam a necessidade de colocar subtipos não-B, CRF e da URF como prioridade de investigação para melhorar o conhecimento sobre o diagnóstico, a patogênese, o desenvolvimento de vacinas e tratamento (Cardoso et al., 2004). Estudos que relatam uma progressão mais rápida para Aids e morte entre os indivíduos recém-infectados com o vírus recombinante prevalente na África Ocidental apoiam essa necessidade (Cardoso et al., 2004; Easterbrook et al., 2010; Kaleebu et al., 2001; Palma et al., 2007; Sacktor et al., 2009). Devido à sua localização estratégica, Cabo Verde pode ter um papel importante no movimento de doenças infecciosas, incluindo HIV/AIDS, como documentado para a dispersão global do HIV-2A (Faria et al., 2012).

Chama atenção a frequência de TDRM entre as amostras HIV-1 observadas no país depois de apenas 5-6 anos de acesso ao tratamento gratuito. O monitoramento contínuo dos pacientes em TARV, incluindo a introdução de genotipagem, deverão ser políticas públicas a serem implementadas.

VI. CONCLUSÕES

1. A análise dos dados sociodemográficos e clínicos dos participantes do estudo evidenciou:

- a. Participação importante de mulheres entre os pacientes incluídos no estudo;
- b. Diferenças quanto à infecção por HIV-1 e HIV-2 de acordo com a faixa etária, sendo o HIV-1 mais frequente em indivíduos menores do que 30 anos e HIV-2 em indivíduos maiores do que 49 anos;
- c. Presença dos dois tipos virais em todas as ilhas, mas com diferenças na concentração relativa de HIV-1 e HIV-2 na ilha de Santiago, sendo maior a concentração de HIV-1 no interior de Santiago e maior a concentração relativa de HIV-2 na Praia;
- d. Metade da amostra encontra-se em tratamento com antirretrovirais;
- e. Mais da metade da amostra possui contagem de Linfócitos TCD4⁺ acima de 350 células/mm³.

2. Quanto à diversidade genética das amostras estudadas observamos:

- a. Alta diversidade molecular do HIV-1, com presença de vários subtipos, CRFs e URFs, sendo o subtipo G, CRF02_AG, URFs e subtipo F1 as formas mais frequentes;
- b. Presença do HIV-2 grupo A;
- c. Evidência de URFs que podem representar novos CRFs;
- d. Casos de genomas recombinantes contendo o sub-subtipo A3;
- e. Heterogeneidade na distribuição entre as ilhas, onde o subtipo F1 e B concentram-se numa ilha (S. Vicente e Santiago, respectivamente), o

subtipo G é mais frequente no interior de Santiago e Sotavento (sem Santiago), enquanto que o CRF02_AG é mais frequente na cidade da Praia e Barlavento (sem S. Vicente).

3. Quanto à origem e data de entrada dos tipos virais encontramos evidências quanto à:

- a. Não foi observada associação no padrão de distribuição geográfica dos principais clados do HIV-1 (subtipo G e CRF02_AG) entre Barlavento e Sotavento, e entre Praia e Interior de Santiago;
- b. Existência de associação entre as amostras HIV-2 de Barlavento e Sotavento;
- c. Primeira introdução do HIV em Cabo Verde ter se dado pelo HIV-2 grupo A em 1967 com gênese provável em Portugal. Outras introduções se seguiram sendo a mais recente, de 1996, a partir do Senegal;
- d. Introdução do segundo tipo viral do HIV em Cabo Verde, o subtipo G do HIV-1, sem precisão de sua origem ou data de entrada, podendo ser em 1979 a partir da África Central ou Camarões ou em 1983 a partir de Portugal;
- e. Introdução mais recente do CRF02_AG em 1986 a partir do Senegal.

4. Quanto à análise de mutações de resistência a drogas observamos:

- a. Presença de TDRM em 3,4% dos pacientes infectados com HIV-1 e ausência de TDRM entre pacientes infectados pelo HIV-2;
- b. DRM em 47,8% e 17,6% de pacientes infectados respectivamente, pelo HIV-1 e pelo HIV-2;

- c. Presença de mutações para duas ou mais drogas em 33,8% de pacientes infectados pelo HIV-1 e 11,8% de pacientes infectados pelo HIV-2;
- d. Que as principais mutações encontradas são a M184V para os NTRI e K103N para os NNRTI.

VII. PERSPECTIVAS

Esse trabalho possibilitou uma ampla cooperação entre duas instituições de Cabo Verde – a Universidade de Cabo Verde (Uni-CV) e o Ministério da Saúde - e entre essas duas e o Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Esperamos e desejamos que essa cooperação avance e que outras iniciativas de colaboração aconteçam em prol do conhecimento científico e tecnológico.

Análise de outras regiões do genoma das amostras a fim de melhor definir o perfil genético e identificar presença de recombinações e de novas formas recombinantes circulantes.

Aumentar o número de amostras de S. Vicente e demais ilhas de Barlavento e outras ilhas de Sotavento à exceção de Santiago, para melhor caracterizar o perfil molecular e a presença do subtipo F e B.

Estimar a origem e data de entrada do subtipo F1 em Cabo Verde.

Estudar um maior número de pacientes virgens de tratamento e em tratamento para identificação de TDRM e DRM, respectivamente, tanto entre os infectados pelo HIV-1 e pelos infectados pelo HIV-2.

Dar subsídios e estimular a introdução de dosagem de carga viral como rotina no monitoramento de pacientes assim como a genotipagem antes do início de tratamento e em caso de falha terapêutica.

Estudar a co-infecção por outros vírus, nomeadamente HTLV e Hepatites.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2012, HIV-GRADE e.V. Algorithm Homepage, <http://www.hiv-grade.de/cms/grade/homepage.html>.
- Abebe, A., V. V. Lukashov, G. Pollakis, A. Kliphuis, A. L. Fontanet, J. Goudsmit, and T. F. de Wit, 2001, Timing of the HIV-1 subtype C epidemic in Ethiopia based on early virus strains and subsequent virus diversification: *AIDS*, v. 15, p. 1555-61.
- Abecasis, A. B., A. M. Wensing, D. Paraskevis, J. Vercauteren, K. Theys, D. A. Van de Vijver, J. Albert, B. Asjö, C. Balotta, D. Beshkov, R. J. Camacho, B. Clotet, C. De Gascun, A. Giskevicius, Z. Grossman, O. Hamouda, A. Horban, T. Kolupajeva, K. Korn, L. G. Kostrikis, C. Kücherer, K. Liitsola, M. Linka, C. Nielsen, D. Otelea, R. Paredes, M. Poljak, E. Puchhammer-Stöckl, J. C. Schmit, A. Sönnernborg, D. Stanekova, M. Stanojevic, D. Struck, C. A. Boucher, and A. M. Vandamme, 2013, HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics: *Retrovirology*, v. 10, p. 7.
- Adjorlolo-Johnson, G., K. M. De Cock, E. Ekpini, K. M. Vetter, T. Sibailly, K. Brattegaard, D. Yavo, R. Doorly, J. P. Whitaker, and L. Kestens, 1994, Prospective comparison of mother-to-child transmission of HIV-1 and HIV-2 in Abidjan, Ivory Coast: *JAMA*, v. 272, p. 462-6.
- Afonso, J. M., G. Bello, M. L. Guimarães, M. Sojka, and M. G. Morgado, 2012a, HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance mutations among patients from the North, Central and South regions of Angola: *PLoS One*, v. 7, p. e42996.
- Afonso, J. M., M. G. Morgado, and G. Bello, 2012b, Evidence of multiple introductions of HIV-1 subtype C in Angola: *Infect Genet Evol*, v. 12, p. 1458-65.
- Aghokeng, A. F., C. Kouanfack, C. Laurent, E. Ebong, A. Atem-Tambe, C. Butel, C. Montavon, E. Mpoudi-Ngole, E. Delaporte, and M. Peeters, 2011, Scale-up of antiretroviral treatment in sub-Saharan Africa is accompanied by increasing HIV-1 drug resistance mutations in drug-naive patients: *AIDS*, v. 25, p. 2183-8.
- Ana Rodrigues, P. M. A. a. A. C., 2011, Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus: <http://www.intechopen.com/books/viral-gene-therapy/production-of-retroviral-and-lentiviral-gene-therapy-vectors-challenges-in-the-manufacturing-of-lipi>.

- Andrade, E., 1996, *As Ilhas de Cabo Verde da “Descoberta” à Independência Nacional (1460 – 1975)*. Paris: Éditions L’Itarmattan.
- Andreasson, P. A., F. Dias, A. Naucleur, S. Andersson, and G. Biberfeld, 1993, A prospective study of vertical transmission of HIV-2 in Bissau, Guinea-Bissau: *AIDS*, v. 7, p. 989-93.
- Anisimova, M., and O. Gascuel, 2006, Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative: *Syst Biol*, v. 55, p. 539-52.
- Araújo, I. I. M. d. P., 2005, *Caracterização da Epidemia HIV/AIDS em Cabo Verde: uma abordagem soropidemiológica no período de 1987-2002*, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 116 p.
- Ayouba, A., C. Akoua-Koffi, S. Calvignac-Spencer, A. Esteban, S. Locatelli, H. Li, Y. Li, B. H. Hahn, E. Delaporte, F. H. Leendertz, and M. Peeters, 2013, Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire: *AIDS*, v. 27, p. 2488-91.
- Ayouba, A., T. T. Lien, J. Nouhin, L. Vergne, A. F. Aghokeng, N. Ngo-Giang-Huong, H. Diop, C. T. Kane, D. Valéa, F. Rouet, D. Joulia-Ekaza, T. D. Toni, E. Nerrienet, E. M. Ngole, E. Delaporte, D. Costagliola, M. Peeters, and M. L. Chaix, 2009, Low prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in untreated, recently infected patients from Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Senegal, Thailand, and Vietnam: the ANRS 12134 study: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 25, p. 1193-6.
- Ayouba, A., P. Maucière, P. M. Martin, P. Cunin, J. Mfoupouendoun, B. Njinku, S. Souquières, and F. Simon, 2001, HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998: *Emerg Infect Dis*, v. 7, p. 466-7.
- Balasubramaniam, M., and E. O. Freed, 2011, New insights into HIV assembly and trafficking: *Physiology (Bethesda)*, v. 26, p. 236-51.
- Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier, 1983, Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS): *Science*, v. 220, p. 868-71.
- Bielejec, F., A. Rambaut, M. A. Suchard, and P. Lemey, 2011, SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics: *Bioinformatics*, v. 27, p. 2910-2.

- Bracho, M. A., V. Sentandreu, I. Alastrué, J. Belda, A. Juan, E. Fernández-García, C. Santos, T. Zafra, T. Tasa, S. Colomina, and F. González-Candelas, 2014, Emerging Trends in CRF02_AG Variants Transmission Among Men Who Have Sex With Men in Spain: *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 65, p. e130-3.
- Brian Foley, T. L., Cristian Apetrei, Beatrice Hahn, Ilene Mizrahi, James Mullins, Andrew Rambaut, Steven Wolinsky and, and B. Korber, 2013, HIV Sequence Compendium 2013, Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics, Los Alamos, New Mexico. LA-UR-13-26007.
- Cardoso, A. R., C. Gonçalves, D. Pascoalinho, C. Gil, A. F. Ferreira, I. Bártolo, and N. Taveira, 2004, Seronegative infection and AIDS caused by an A2 subtype HIV-1: *AIDS*, v. 18, p. 1071-4.
- Carreira, A., 1983, Migrações nas Ilhas de Cabo Verde.
- Charpentier, C., P. Bellecave, M. Cisse, S. Mamadou, M. Diakite, G. Peytavin, S. Tchiombiano, P. Teisseire, L. Pizarro, A. Storto, F. Brun-Vézinet, C. Katlama, V. Calvez, A. G. Marcelin, B. Masquelier, and D. Descamps, 2011, High prevalence of antiretroviral drug resistance among HIV-1-untreated patients in Guinea-Conakry and in Niger: *Antivir Ther*, v. 16, p. 429-33.
- Chen, L. F., J. Hoy, and S. R. Lewin, 2007, Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection: *Med J Aust*, v. 186, p. 146-51.
- Clavel, F., D. Guétard, F. Brun-Vézinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, and C. Rouzioux, 1986, Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS: *Science*, v. 233, p. 343-6.
- Clavel, F., K. Mansinho, S. Chamaret, D. Guetard, V. Favier, J. Nina, M. O. Santos-Ferreira, J. L. Champalimaud, and L. Montagnier, 1987, Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa: *N Engl J Med*, v. 316, p. 1180-5.
- Cohen, M. S., M. McCauley, and T. R. Gamble, 2012, HIV treatment as prevention and HPTN 052: *Curr Opin HIV AIDS*, v. 7, p. 99-105.
- Cuevas, M. T., I. Ruibal, M. L. Villahermosa, H. Díaz, E. Delgado, E. V. Parga, L. Pérez-Alvarez, M. B. de Armas, L. Cuevas, L. Medrano, E. Noa, S. Osmanov, R. Nájera, and M. M. Thomson, 2002, High HIV-1 genetic diversity in Cuba: *AIDS*, v. 16, p. 1643-53.

- Damond, F., M. Worobey, P. Campa, I. Farfara, G. Colin, S. Matheron, F. Brun-Vézinet, D. L. Robertson, and F. Simon, 2004, Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 20, p. 666-72.
- De Cock, K. M., G. Adjuorlolo, E. Ekpini, T. Sibailly, J. Kouadio, M. Maran, K. Brattegaard, K. M. Vetter, R. Doorly, and H. D. Gayle, 1993, Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic: *JAMA*, v. 270, p. 2083-6.
- de Silva, T. I., C. van Tienen, C. Onyango, A. Jabang, T. Vincent, M. F. Loeff, R. A. Coutinho, A. Jaye, S. Rowland-Jones, H. Whittle, M. Cotten, and S. Hué, 2013, Population dynamics of HIV-2 in rural West Africa: comparison with HIV-1 and ongoing transmission at the heart of the epidemic: *AIDS*, v. 27, p. 125-34.
- Delatorre, E. O., G. Bello, W. A. Eyer-Silva, S. L. Chequer-Fernandez, M. G. Morgado, and J. C. Couto-Fernandez, 2012, Evidence of multiple introductions and autochthonous transmission of the HIV type 1 CRF02_AG clade in Brazil: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 28, p. 1369-72.
- Derache, A., A. I. Maiga, O. Traore, A. Akonde, M. Cisse, B. Jarrousse, V. Koita, B. Diarra, G. Carcelain, F. Barin, C. Pizzocolo, L. Pizarro, C. Katlama, V. Calvez, and A. G. Marcelin, 2008, Evolution of genetic diversity and drug resistance mutations in HIV-1 among untreated patients from Mali between 2005 and 2006: *J Antimicrob Chemother*, v. 62, p. 456-63.
- Diop-Ndiaye, H., C. Toure-Kane, N. Leye, N. F. Ngom-Gueye, C. Montavon, M. Peeters, and S. Mboup, 2010, Antiretroviral drug resistance mutations in antiretroviral-naive patients from Senegal: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 26, p. 1133-8.
- Direcção Geral de Saúde, P. d. L. c. a. S. S. d. E., Ministério da Saúde de Cabo Verde, 2007, Situação epidemiológica do VIH/SIDA em Cabo Verde, http://www.minsaude.gov.cv/index.php/documentos/cat_view/34-documentacao/48-sida?start=5.
- Drummond, A. J., S. Y. Ho, M. J. Phillips, and A. Rambaut, 2006, Relaxed phylogenetics and dating with confidence: *PLoS Biol*, v. 4, p. e88.
- Drummond, A. J., G. K. Nicholls, A. G. Rodrigo, and W. Solomon, 2002, Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data: *Genetics*, v. 161, p. 1307-20.

- Drummond, A. J., and A. Rambaut, 2007, BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees: *BMC Evol Biol*, v. 7, p. 214.
- Drummond, A. J., A. Rambaut, B. Shapiro, and O. G. Pybus, 2005, Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences: *Mol Biol Evol*, v. 22, p. 1185-92.
- Easterbrook, P. J., M. Smith, J. Mullen, S. O'Shea, I. Chrystie, A. de Ruiter, I. D. Tatt, A. M. Geretti, and M. Zuckerman, 2010, Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy: *J Int AIDS Soc*, v. 13, p. 4.
- Esbjörnsson, J., M. Mild, F. Månsson, H. Norrgren, and P. Medstrand, 2011, HIV-1 molecular epidemiology in Guinea-Bissau, West Africa: origin, demography and migrations: *PLoS One*, v. 6, p. e17025.
- Estatística, I. N. d., 2013, Portal de Dados. Cabo Verde, www.ine.cv/capeverde.africadata.org.
- Esteves, A., R. Parreira, J. Piedade, T. Venenno, M. Franco, J. Germano de Sousa, L. Patrício, P. Brum, A. Costa, and W. F. Canas-Ferreira, 2003, Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 19, p. 511-7.
- Esteves, A., R. Parreira, T. Venenno, M. Franco, J. Piedade, J. Germano De Sousa, and W. F. Canas-Ferreira, 2002, Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 18, p. 313-25.
- Faria, N. R., I. Hodges-Mameletzis, J. C. Silva, B. Rodés, S. Erasmus, S. Paolucci, J. Ruelle, D. Pieniazek, N. Taveira, A. Treviño, M. F. Gonçalves, S. Jallow, L. Xu, R. J. Camacho, V. Soriano, P. Goubau, J. D. de Sousa, A. M. Vandamme, M. A. Suchard, and P. Lemey, 2012, Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A: *J Gen Virol*, v. 93, p. 889-99.
- Fauci, A. S., G. Pantaleo, S. Stanley, and D. Weissman, 1996, Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: *Ann Intern Med*, v. 124, p. 654-63.
- Freed, E. O., 2004, HIV-1 and the host cell: an intimate association: *Trends Microbiol*, v. 12, p. 170-7.

- Freimanis, G. L., A. Loua, and J. P. Allain, 2012, HIV-1 subtypes D and F are prevalent in Guinea Conakry: *J Clin Virol*, v. 53, p. 350-3.
- Gifford, R. J., T. F. Liu, S. Y. Rhee, M. Kiuchi, S. Hue, D. Pillay, and R. W. Shafer, 2009, The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance: *Bioinformatics*, v. 25, p. 1197-8.
- Girard, M. P., S. Osmanov, O. M. Assossou, and M. P. Kieny, 2011, Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review: *Vaccine*, v. 29, p. 6191-218.
- Giuliani, M., M. M. Santoro, A. Lo Presti, E. Cella, P. Scognamiglio, A. Lai, A. Latini, L. Fabeni, C. Gori, C. Pinnetti, E. Girardi, C. F. Perno, G. Zehender, and M. Ciccozzi, 2013, Circulation of HIV-1 CRF02_AG among MSM population in central Italy: a molecular epidemiology-based study: *Biomed Res Int*, v. 2013, p. 810617.
- Gomes, P., A. Abecasis, M. Almeida, R. Camacho, and K. Mansinho, 2003, Transmission of HIV-2: *Lancet Infect Dis*, v. 3, p. 683-4.
- Gottlieb, G. S., N. M. Badiane, S. E. Hawes, L. Fortes, M. Toure, C. T. Ndour, A. K. Starling, F. Traore, F. Sall, K. G. Wong, S. L. Cherne, D. J. Anderson, S. A. Dye, R. A. Smith, J. I. Mullins, N. B. Kiviat, P. S. Sow, and U. o. W.-D. H.-S. Group, 2009, Emergence of multiclass drug-resistance in HIV-2 in antiretroviral-treated individuals in Senegal: implications for HIV-2 treatment in resource-limited West Africa: *Clin Infect Dis*, v. 48, p. 476-83.
- Graça, C. Q. L. d., 2007, Cabo Verde: Formação e Dinâmicas Sociais, 184 p.
- Greenberg, A. E., 2001, Possible protective effect of HIV-2 against incident HIV-1 infection: review of available epidemiological and in vitro data: *AIDS*, v. 15, p. 2319-21.
- Guindon, S., and O. Gascuel, 2003, A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood: *Syst Biol*, v. 52, p. 696-704.
- Guindon, S., F. Lethiec, P. Duroux, and O. Gascuel, 2005, PHYML Online--a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference: *Nucleic Acids Res*, v. 33, p. W557-9.

- Gupta, R. K., M. R. Jordan, B. J. Sultan, A. Hill, D. H. Davis, J. Gregson, A. W. Sawyer, R. L. Hamers, N. Ndembu, D. Pillay, and S. Bertagnolio, 2012, Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naive individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis: *Lancet*, v. 380, p. 1250-8.
- Haase, A. T., 1986, Pathogenesis of lentivirus infections: *Nature*, v. 322, p. 130-6.
- Hamel, D. J., J. L. Sankalé, G. Eisen, S. T. Meloni, C. Mullins, A. Gueye-Ndiaye, S. Mboup, and P. J. Kanki, 2007, Twenty years of prospective molecular epidemiology in Senegal: changes in HIV diversity: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 23, p. 1189-96.
- Hamers, R. L., K. C. Sigaloff, A. M. Wensing, C. L. Wallis, C. Kityo, M. Siwale, K. Mandaliya, P. Ive, M. E. Botes, M. Wellington, A. Osibogun, W. S. Stevens, T. F. Rinke de Wit, R. Schuurman, and P. A. S. t. E. R. (PASER), 2012, Patterns of HIV-1 drug resistance after first-line antiretroviral therapy (ART) failure in 6 sub-Saharan African countries: implications for second-line ART strategies: *Clin Infect Dis*, v. 54, p. 1660-9.
- Hamers, R. L., C. L. Wallis, C. Kityo, M. Siwale, K. Mandaliya, F. Conradie, M. E. Botes, M. Wellington, A. Osibogun, K. C. Sigaloff, I. Nankya, R. Schuurman, F. W. Wit, W. S. Stevens, M. van Vugt, T. F. de Wit, and P. A. S. t. E. R. (PASER), 2011, HIV-1 drug resistance in antiretroviral-naive individuals in sub-Saharan Africa after rollout of antiretroviral therapy: a multicentre observational study: *Lancet Infect Dis*, v. 11, p. 750-9.
- Hemelaar, J., E. Gouws, P. D. Ghys, S. Osmanov, and W.-U. N. f. H. I. a. Characterisation, 2011, Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007: *AIDS*, v. 25, p. 679-89.
- Huelsenbeck, J. P., and F. Ronquist, 2001, MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees: *Bioinformatics*, v. 17, p. 754-5.
- Ibe, S., Y. Yokomaku, T. Shiino, R. Tanaka, J. Hattori, S. Fujisaki, Y. Iwatani, N. Mamiya, M. Utsumi, S. Kato, M. Hamaguchi, and W. Sugiura, 2010, HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2: *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 54, p. 241-7.
- Imamichi, H., O. Koita, D. Dabita, S. Dao, M. Ibrah, D. Sogoba, R. L. Dewar, S. C. Berg, M. K. Jiang, M. Parta, J. A. Washington, M. A. Polis, H. C. Lane, and A. Tounkara, 2009, Identification and characterization of CRF02_AG, CRF06_cpx, and CRF09_cpx recombinant subtypes in Mali, West Africa: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 25, p. 45-55.

- Instituto Nacional de Estatística de Cabo Verde, M. d. S. d. C. V. e. M. I., 2008, Segundo Inquérito Demográfico e de Saúde Reprodutiva, Cabo Verde, IDSR-II, 2005, Calverton, Maryland, USA: INE, p. 313.
- Jallow, S., T. Vincent, A. Leligdowicz, T. De Silva, C. Van Tienen, A. Alabi, R. Sarge-Njie, P. Aaby, T. Corrah, H. Whittle, A. Jaye, G. Vanham, S. Rowland-Jones, and W. Janssens, 2009, Presence of a multidrug-resistance mutation in an HIV-2 variant infecting a treatment-naive individual in Caio, Guinea Bissau: *Clin Infect Dis*, v. 48, p. 1790-3.
- Kaleebu, P., A. Ross, D. Morgan, D. Yirrell, J. Oram, A. Rutebemberwa, F. Lyagoba, L. Hamilton, B. Biryahwaho, and J. Whitworth, 2001, Relationship between HIV-1 Env subtypes A and D and disease progression in a rural Ugandan cohort: *AIDS*, v. 15, p. 293-9.
- Kloser, P. C., A. J. Mangia, J. Leonard, J. M. Lombardo, J. Michaels, T. N. Denny, L. Sharer, S. Sathe, S. H. Weiss, and C. Schable, 1989, HIV-2-associated AIDS in the United States. The first case: *Arch Intern Med*, v. 149, p. 1875-7.
- Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya, 2000, Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains: *Science*, v. 288, p. 1789-96.
- Kuiken, C. L., G. Zwart, E. Baan, R. A. Coutinho, J. A. van den Hoek, and J. Goudsmit, 1993, Increasing antigenic and genetic diversity of the V3 variable domain of the human immunodeficiency virus envelope protein in the course of the AIDS epidemic: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 9061-5.
- Le Guenno, B., 1989, HIV1 and HIV2: two ancient viruses for a new disease?: *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 83, p. 847.
- Leitner, T., and J. Albert, 1999, The molecular clock of HIV-1 unveiled through analysis of a known transmission history: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, p. 10752-7.
- Lemey, P., O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi, and A. M. Vandamme, 2003, Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, p. 6588-92.
- Lemey, P., A. Rambaut, A. J. Drummond, and M. A. Suchard, 2009, Bayesian phylogeography finds its roots: *PLoS Comput Biol*, v. 5, p. e1000520.

- Li, W. H., M. Tanimura, and P. M. Sharp, 1988, Rates and dates of divergence between AIDS virus nucleotide sequences: *Mol Biol Evol*, v. 5, p. 313-30.
- Lihana, R. W., D. Ssemwanga, A. Abimiku, and N. Ndembi, 2012, Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review: *AIDS Rev*, v. 14, p. 83-100.
- Liu, T. F., and R. W. Shafer, 2006, Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation: *Clin Infect Dis*, v. 42, p. 1608-18.
- Liu, Y., D. C. Nickle, D. Shriner, M. A. Jensen, G. H. Learn, J. E. Mittler, and J. I. Mullins, 2004, Molecular clock-like evolution of human immunodeficiency virus type 1: *Virology*, v. 329, p. 101-8.
- Lukashov, V. V., and J. Goudsmit, 1997, Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 subtype-specific V3 domain is confined to a sequence space with a fixed distance to the subtype consensus: *J Virol*, v. 71, p. 6332-8.
- Léonard, G., A. Chaput, V. Courgnaud, A. Sangaré, F. Denis, and C. Brechot, 1993, Characterization of dual HIV-1 and HIV-2 serological profiles by polymerase chain reaction: *AIDS*, v. 7, p. 1185-9.
- Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono, 2003, Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts: *Nature*, v. 424, p. 99-103.
- Markovitz, D. M., 1993, Infection with the human immunodeficiency virus type 2: *Ann Intern Med*, v. 118, p. 211-8.
- Marlink, R., P. Kanki, I. Thior, K. Travers, G. Eisen, T. Siby, I. Traore, C. C. Hsieh, M. C. Dia, and E. H. Gueye, 1994, Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1: *Science*, v. 265, p. 1587-90.
- Maueia, C., D. Costa, B. Meggi, N. Ismael, C. Walle, R. Curvo, C. Abreu, N. Bhatt, A. Tanuri, I. V. Jani, and O. C. Ferreira, 2011, Frequency of human immunodeficiency virus type-2 in hiv infected patients in Maputo City, Mozambique: *Virol J*, v. 8, p. 408.
- Meloni, S. T., B. Kim, J. L. Sankalé, D. J. Hamel, S. Tovanabutra, S. Mboup, F. E. McCutchan, and P. J. Kanki, 2004, Distinct human immunodeficiency virus type 1 subtype A virus circulating in West Africa: sub-subtype A3: *J Virol*, v. 78, p. 12438-45.

- Menéndez-Arias, L., 2013, Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments: *Antiviral Res*, v. 98, p. 93-120.
- Menéndez-Arias, L., and M. Alvarez, 2014, Antiretroviral therapy and drug resistance in human immunodeficiency virus type 2 infection: *Antiviral Res*, v. 102, p. 70-86.
- Montaner, J. S., V. D. Lima, P. R. Harrigan, L. Lourenço, B. Yip, B. Nosyk, E. Wood, T. Kerr, K. Shannon, D. Moore, R. S. Hogg, R. Barrios, M. Gilbert, M. Kraiden, R. Gustafson, P. Daly, and P. Kendall, 2014, Expansion of HAART coverage is associated with sustained decreases in HIV/AIDS morbidity, mortality and HIV transmission: the "HIV Treatment as Prevention" experience in a Canadian setting: *PLoS One*, v. 9, p. e87872.
- Morand-Joubert, L., C. Charpentier, G. Poizat, G. Chêne, E. Dam, G. Raguin, A. M. Taburet, P. M. Girard, A. J. Hance, and F. Clavel, 2006, Low genetic barrier to large increases in HIV-1 cross-resistance to protease inhibitors during salvage therapy: *Antivir Ther*, v. 11, p. 143-54.
- Morgado, M. G., M. L. Guimarães, and B. Galvão-Castro, 2002, HIV-1 polymorphism: a challenge for vaccine development - a review: *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 143-50.
- Mota-Miranda, A., H. Gomes, R. Serrão, and F. Araújo, 2004, Transmission of HIV-2: another perspective: *Lancet Infect Dis*, v. 4, p. 265-6.
- Nyamweya, S., A. Hegedus, A. Jaye, S. Rowland-Jones, K. L. Flanagan, and D. C. Macallan, 2013, Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis: *Rev Med Virol*, v. 23, p. 221-40.
- Oliveira, V., I. Bártolo, P. Borrego, C. Rocha, E. Valadas, J. Barreto, E. Almeida, F. Antunes, and N. Taveira, 2012, Genetic diversity and drug resistance profiles in HIV type 1- and HIV type 2-infected patients from Cape Verde Islands: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 28, p. 510-22.
- Organization, W. H., 2010, *Antiretroviral Therapy for HIV Infection in Adults and Adolescents: Recommendations for a Public Health Approach. – 2010 rev.*, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, p. 145.
- Organization, W. H., 2012, *World Health Organization Global Strategy for the Surveillance and Monitoring of HIV Drug Resistance*, http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77349/1/9789241504768_eng.pdf, p. 17.

- Palma, A. C., F. Araújo, V. Duque, F. Borges, M. T. Paixão, R. Camacho, and P. S. Network, 2007, Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal: *Infect Genet Evol*, v. 7, p. 391-8.
- Pantaleo, G., C. Graziosi, and A. S. Fauci, 1993, New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection: *N Engl J Med*, v. 328, p. 327-35.
- Parker, J., A. Rambaut, and O. G. Pybus, 2008, Correlating viral phenotypes with phylogeny: accounting for phylogenetic uncertainty: *Infect Genet Evol*, v. 8, p. 239-46.
- Parreira, R., A. Esteves, C. Santos, J. Piedade, T. Venenno, and W. F. Canas-Ferreira, 2000, Genetic variability of human immunodeficiency virus type 2 C2V3 region within and between individuals from Bissau, Guinea-Bissau, West Africa: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 16, p. 1307-12.
- Peeters, M., M. Jung, and A. Ayouba, 2013, The origin and molecular epidemiology of HIV: *Expert Rev Anti Infect Ther*, v. 11, p. 885-96.
- Peeters, M., B. Koumare, C. Mulanga, C. Brengues, B. Mounirou, F. Bougoudogo, S. Ravel, F. Bibollet-Ruche, and E. Delaporte, 1998, Genetic subtypes of HIV type 1 and HIV type 2 strains in commercial sex workers from Bamako, Mali: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 14, p. 51-8.
- Pennings, P. S., 2013, HIV Drug Resistance: Problems and Perspectives: *Infect Dis Rep*, v. 5, p. e5.
- Plantier, J. C., M. Leoz, J. E. Dickerson, F. De Oliveira, F. Cordonnier, V. Lemée, F. Damond, D. L. Robertson, and F. Simon, 2009, A new human immunodeficiency virus derived from gorillas: *Nat Med*, v. 15, p. 871-2.
- Posada, D., 2008, jModelTest: phylogenetic model averaging: *Mol Biol Evol*, v. 25, p. 1253-6.
- Poulsen, A. G., P. Aaby, H. Jensen, and F. Dias, 2000, Risk factors for HIV-2 seropositivity among older people in Guinea-Bissau. A search for the early history of HIV-2 infection: *Scand J Infect Dis*, v. 32, p. 169-75.
- Price, M. A., C. L. Wallis, S. Lakhi, E. Karita, A. Kamali, O. Anzala, E. J. Sanders, L. G. Bekker, R. Twesigye, E. Hunter, P. Kaleebu, K. Kayitenkore, S. Allen, E. Ruzagira, M. Mwangome, G. Mutua, P. N. Amornkul, G. Stevens, S. L. Pond,

M. Schaefer, M. A. Papathanasopoulos, W. Stevens, J. Gilmour, and I. E. I. C. S. Group, 2011, Transmitted HIV type 1 drug resistance among individuals with recent HIV infection in East and Southern Africa: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 27, p. 5-12.

Rambaut, A., 2009, FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool, <http://treebioedacuk/software/figtree/>.

Rambaut, A., and A. J. Drummond, 2007, Tracer v1.4, <http://beastbioedacuk/Tracer>.

Rambaut, A., D. Posada, K. A. Crandall, and E. C. Holmes, 2004, The causes and consequences of HIV evolution: *Nat Rev Genet*, v. 5, p. 52-61.

Ray, S., 2003, SimPlot v3.5.1., <http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/simplot/>.

Reeves, J. D., and R. W. Doms, 2002, Human immunodeficiency virus type 2: *J Gen Virol*, v. 83, p. 1253-65.

Robbins, K. E., P. Lemey, O. G. Pybus, H. W. Jaffe, A. S. Youngpairoj, T. M. Brown, M. Salemi, A. M. Vandamme, and M. L. Kalish, 2003, U.S. Human immunodeficiency virus type 1 epidemic: date of origin, population history, and characterization of early strains: *J Virol*, v. 77, p. 6359-66.

Rodés, B., A. Holguín, V. Soriano, M. Dourana, K. Mansinho, F. Antunes, and J. González-Lahoz, 2000, Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy: *J Clin Microbiol*, v. 38, p. 1370-4.

Roques, P., D. L. Robertson, S. Souquière, C. Apetrei, E. Nerrienet, F. Barré-Sinoussi, M. Müller-Trutwin, and F. Simon, 2004, Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N: *AIDS*, v. 18, p. 1371-81.

Sacktor, N., N. Nakasujja, R. L. Skolasky, M. Rezapour, K. Robertson, S. Musisi, E. Katabira, A. Ronald, D. B. Clifford, O. Laeyendecker, and T. C. Quinn, 2009, HIV subtype D is associated with dementia, compared with subtype A, in immunosuppressed individuals at risk of cognitive impairment in Kampala, Uganda: *Clin Infect Dis*, v. 49, p. 780-6.

Salemi, M., K. Strimmer, W. W. Hall, M. Duffy, E. Delaporte, S. Mboup, M. Peeters, and A. M. Vandamme, 2001, Dating the common ancestor of SIVcpz and HIV-1 group M and the origin of HIV-1 subtypes using a new method to uncover clock-like molecular evolution: *FASEB J*, v. 15, p. 276-8.

- Sharp, P. M., E. Bailes, R. R. Chaudhuri, C. M. Rodenburg, M. O. Santiago, and B. H. Hahn, 2001, The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when?: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 356, p. 867-76.
- Sharp, P. M., and B. H. Hahn, 2011, Origins of HIV and the AIDS pandemic: *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 1, p. a006841.
- Smallman-Raynor, M., and A. Cliff, 1991, The spread of human immunodeficiency virus type 2 into Europe: a geographical analysis: *Int J Epidemiol*, v. 20, p. 480-9.
- Ssemwanga, D., A. Kapaata, F. Lyagoba, B. Magambo, M. Nanyonjo, B. N. Mayanja, C. M. Parry, and P. Kaleebu, 2012, Low drug resistance levels among drug-naive individuals with recent HIV type 1 infection in a rural clinical cohort in southwestern Uganda: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 28, p. 1784-7.
- Stockinger, B., C. Bourgeois, and G. Kassiotis, 2006, CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis: *Immunol Rev*, v. 211, p. 39-48.
- Sundquist, W. I., and H. G. Kräusslich, 2012, HIV-1 assembly, budding, and maturation: *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 2, p. a006924.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, 2011, MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods: *Mol Biol Evol*, v. 28, p. 2731-9.
- Tang, M. W., and R. W. Shafer, 2012, HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications: *Drugs*, v. 72, p. e1-25.
- Thiam, M., H. Diop-Ndiaye, A. D. Diouf, N. Vidal, O. Ndiaye, I. Ndiaye, N. F. Ngom-Gueye, S. Diallo, O. D. Diongue, M. Camara, A. Seck, S. Mboup, and C. Toure-Kane, 2013, HIV-1 genetic diversity and drug resistance among Senegalese patients in the public health system: *J Clin Microbiol*, v. 51, p. 578-84.
- Thomson, M. M., G. Casado, D. Posada, M. Sierra, and R. Nájera, 2005, Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of Central African origin in Cuba: *AIDS*, v. 19, p. 1155-63.
- Toure-Kane, C., C. Montavon, M. A. Faye, P. M. Gueye, P. S. Sow, I. Ndoeye, A. Gaye-Diallo, E. Delaporte, M. Peeters, and S. Mboup, 2000, Identification of

all HIV type 1 group M subtypes in Senegal, a country with low and stable seroprevalence: *AIDS Res Hum Retroviruses*, v. 16, p. 603-9.

Turner, B. G., and M. F. Summers, 1999, Structural biology of HIV: *J Mol Biol*, v. 285, p. 1-32.

Unaids, 2013, Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2012.

UNAIDS, 2013a, UNAIDS reports more than 7 million people now on HIV treatment across Africa—with nearly 1 million added in the last year—while new HIV infections and deaths from AIDS continue to fall.

UNAIDS, W. i. p. w. U. a., 2013b, GLOBAL UPDATE ON HIV TREATMENT 2013: RESULTS, IMPACT AND OPPORTUNITIES
HIV TREATMENTWHO report in partnership with UNICEF and UNAIDS.

Unaid.org, 2013, UPDATE: How Africa Turned AIDS Around, Unaid.org, p. 56.

Vallari, A., V. Holzmayer, B. Harris, J. Yamaguchi, C. Ngansop, F. Makamche, D. Mbanya, L. Kaptué, N. Ndembi, L. Gürtler, S. Devare, and C. A. Brennan, 2011, Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon: *J Virol*, v. 85, p. 1403-7.

van der Ende, M. E., A. C. Kroes, J. Buitenwerf, and C. L. van der Poel, 1990, [Aids caused by HIV-2 in The Netherlands]: *Ned Tijdschr Geneesk*, v. 134, p. 495-7.

van der Loeff, M. F., A. A. Awasana, R. Sarge-Njie, M. van der Sande, A. Jaye, S. Sabally, T. Corrah, S. J. McConkey, and H. C. Whittle, 2006, Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent epidemic trends of HIV-1 and HIV-2: *Int J Epidemiol*, v. 35, p. 1322-8.

van Veen, M. G., M. A. Kramer, E. L. Op de Coul, A. P. van Leeuwen, O. de Zwart, M. J. van de Laar, R. A. Coutinho, and M. Prins, 2009, Disassortative sexual mixing among migrant populations in The Netherlands: a potential for HIV/STI transmission?: *AIDS Care*, v. 21, p. 683-91.

Vercauteren, J., K. Theys, A. P. Carvalho, E. Valadas, L. M. Duque, E. Teófilo, T. Faria, D. Faria, J. Vera, M. J. Aguas, S. Peres, K. Mansinho, A. M. Vandamme, R. J. Camacho, and P. H.-R. S. Group, 2013, The demise of multidrug-resistant HIV-1: the national time trend in Portugal: *J Antimicrob Chemother*, v. 68, p. 911-4.

- Verde, G. d. C., 2011, Programa de Governo: VIII Legislatura 2011 - 2016, Boletim Oficial nº 20, I Série, Suplemento, República de Cabo Verde.
- Verde, G. d. C., 2014, Página Oficial do Governo, <http://www.governo.cv/>.
- Verde, I. N. d. E. d. C., 2010, IVº RECENSEAMENTO GERAL DA POPULAÇÃO E DE HABITAÇÃO - CENSO 2010 RESUMO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS POR MEIO DE RESIDÊNCIA E CONCELHO, <http://www.ine.cv/censo/censo2010.aspx>, Instituto Nacional de Estatísticas de Cabo Verde, p. 40.
- Verde, M. d. S. d. C., 2004, Protocolo de Terapêutica Anti-Retroviral, *in* P. d. I. c. a. S. I. Direcção-Geral de Saúde, Tuberculose e Lepra, ed., http://www.minsaude.gov.cv/index.php/documentos/cat_view/34-documentacao/48-sida, p. 48.
- Verde, M. d. S. d. C., 2005-2011, Relatório Estatístico, http://www.minsaude.gov.cv/index.php/documentos/cat_view/34-documentacao/61-relatorio-estatistico?limitstart=0, Ministério da Saúde de Cabo Verde.
- Verde, M. d. S. d. C., 2012, Relatório Estatístico 2011, Cabo Verde, Ministério da Saúde de Cabo Verde, p. 118.
- Victorino, R. M., D. Guerreiro, M. H. Lourenço, S. Ferreira, and L. C. Teles, 1992, Prevalence of HIV-2 infection in a family planning clinic in Lisbon: *Int J STD AIDS*, v. 3, p. 281-4.
- Vidal, N., M. Peeters, C. Mulanga-Kabeya, N. Nzilambi, D. Robertson, W. Ilunga, H. Sema, K. Tshimanga, B. Bongo, and E. Delaporte, 2000, Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa: *J Virol*, v. 74, p. 10498-507.
- von Recum, H. A., and J. K. Pokorski, 2013, Peptide and protein-based inhibitors of HIV-1 co-receptors: *Exp Biol Med (Maywood)*, v. 238, p. 442-9.
- Wertheim, J. O., and M. Worobey, 2009, Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2: *PLoS Comput Biol*, v. 5, p. e1000377.
- Wiktor, S. Z., J. N. Nkengasong, E. R. Ekpini, G. T. Adjorlolo-Johnson, P. D. Ghys, K. Brattegaard, O. Tossou, T. J. Dondero, K. M. De Cock, and A. E. Greenberg,

1999, Lack of protection against HIV-1 infection among women with HIV-2 infection: *AIDS*, v. 13, p. 695-9.

Wilkins, A., B. Oelman, J. Pepin, K. Cham, T. Corrah, A. Hughes, K. Manneh, R. Njai, and M. Rolfe, 1991, Trends in HIV-1 and HIV-2 infection in The Gambia: *AIDS*, v. 5, p. 1529-30.

Wilkins, A., D. Ricard, J. Todd, H. Whittle, F. Dias, and A. Paulo Da Silva, 1993, The epidemiology of HIV infection in a rural area of Guinea-Bissau: *AIDS*, v. 7, p. 1119-22.

Williamson, L. M., M. Rosato, A. Teyhan, P. Santana, and S. Harding, 2009, AIDS mortality in African migrants living in Portugal: evidence of large social inequalities: *Sex Transm Infect*, v. 85, p. 427-31.

Wittkop, L., H. F. Günthard, F. de Wolf, D. Dunn, A. Cozzi-Lepri, A. de Luca, C. Kücherer, N. Obel, V. von Wyl, B. Masquelier, C. Stephan, C. Torti, A. Antinori, F. García, A. Judd, K. Porter, R. Thiébaud, H. Castro, A. I. van Sighem, C. Colin, J. Kjaer, J. D. Lundgren, R. Paredes, A. Pozniak, B. Clotet, A. Phillips, D. Pillay, G. Chêne, and E.-C. s. group, 2011, Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study: *Lancet Infect Dis*, v. 11, p. 363-71.

Wood, B. R., J. P. Klein, J. L. Lyons, D. A. Milner, R. E. Phillips, M. Schutten, R. D. Folkerth, P. Ciarlina, T. J. Henrich, and J. A. Johnson, 2012, HIV-2 encephalitis: case report and literature review: *AIDS Patient Care STDS*, v. 26, p. 383-7.

Yarchoan, R., R. W. Klecker, K. J. Weinhold, P. D. Markham, H. K. Lyerly, D. T. Durack, E. Gelmann, S. N. Lehrman, R. M. Blum, and D. W. Barry, 1986, Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex: *Lancet*, v. 1, p. 575-80.

Yusim, K., M. Peeters, O. G. Pybus, T. Bhattacharya, E. Delaporte, C. Mulanga, M. Muldoon, J. Theiler, and B. Korber, 2001, Using human immunodeficiency virus type 1 sequences to infer historical features of the acquired immune deficiency syndrome epidemic and human immunodeficiency virus evolution: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v. 356, p. 855-66.

Zhang, H., B. Yang, R. J. Pomerantz, C. Zhang, S. C. Arunachalam, and L. Gao, 2003, The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA: *Nature*, v. 424, p. 94-8.

APÊNDICE