

ANA PAULA SUSZEK CORREA MIRAPALHETE

CARACTERIZAÇÃO DO EXAME DE GENOTIPAGEM DO HIV-1 NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Trabalho de Conclusão de Curso julgado adequado como requisito parcial ao grau de médico e aprovado em sua forma final pelo Curso de Medicina, da Universidade do Sul de Santa Catarina.

Palhoça, 19 de novembro de 2018.

Prof. e Orientador, Gustavo de Araujo Pinto, Dr.

Universidade do Sul de Santa Catarina e Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a.AlineVitali Grando.

Universidade do Sul de Santa Catarina

Prof^a. Fabiana Oenning da Gama, MSc..

Universidade do Sul de Santa Catarina

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

**TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DO EXAME DE GENOTIPAGEM DO HIV-1 NO
ESTADO DE SC**

AUTORES

Gustavo de Araujo Pinto, Dr
Ana Paula Suszek Correa Mirapalmete
Giovanna Grünewald Vietta

Gustavo de Araujo Pinto, Dr – gustavo_ap@rocketmail.com - 48 32719212
Ana Paula Suszek Correa Mirapalmete – anapaula.mirapalmete@gmail.com – 48
998031174
Giovanna Grünewald Vietta – ggvietta@gmail.com - 48 999800473

UNISUL – Palhoça – Santa Catarina – Brasil

ArtigoOriginal

Caracterização do Exame de Genotipagem do HIV-1 no Estado de SC

Gustavo de A. Pinto^[1,2], Ana Paula S. C. Mirapalmete^[1], Giovanna G. Vietta^[1]

[1]. Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL). [2]Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Gerência de Vigilância das DST/Aids e Hepatites Virais. Florianópolis, SC, Brasil.

RESUMO

Introdução:A resistência do HIV aos fármacos antirretrovirais constitui um dos desafios no controle da pandemia. O exame de genotipagem viral apresenta-se como um recurso importante para identificar as mutações de resistência ao tratamento. O objetivo do presente estudo foi caracterizar os indivíduos portadores do HIV que realizam o exame de genotipagem no Estado de Santa Catarina e a diversidade viral encontrada.

Método: Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), foram obtidos os resultados de exames de genotipagem a partir do banco de dados do Sistema de Informação para Rede de Genotipagem (SISGENO) e identificamos as principais mutações dos indivíduos provenientes de todo o estado de SC no período de 2016 e 2017. Os dados foram tabulados utilizando o software Windows Excel, e posteriormente analisados por meio do programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Version 18.8 [computer program].

Resultados: Os indivíduos em primeira falha terapêutica totalizaram 71,8%. O vírus do Subtipo C foi identificado em 69% das amostras. Foram encontradas mutações para as quatro classes de medicamentos. Em relação aos NRTIs destaca-se a mutação M184V, já entre os NNRTI a K103N, e na classe dos Inibidores de Protease a I93L com maior frequência e L33F e T74P com maior impacto.

Conclusão: O presente trabalho é relevante, pois descreve as características epidemiológicas e virológicas dos pacientes infectados pelo vírus HIV em Santa Catarina que realizaram o exame de genotipagem. Sua importância torna-se ainda maior pelo perfil negativo da epidemia neste estado.

Palavras-chave: HIV. Genotipagem. Mutações do Vírus HIV-1. Falha do Tratamento Antirretroviral.

INTRODUÇÃO

A partir da identificação do HIV-1, iniciaram-se estudos para o desenvolvimento de uma terapia eficaz, que seja capaz de cessar a replicação do vírus. Um dos desafios dessa pandemia é a resistência desenvolvida pelo vírus HIV-1 aos medicamentos que compõem a Terapia Antirretroviral (TARV)¹.

Somente em 1987 foi aprovado para uso clínico o primeiro antirretroviral (ARV), a Zidovudina (AZT). Baseados nesse acontecimento foram desenvolvidos outros medicamentos com enfoque na enzima transcriptase reversa, que resultou em 25 outros ARV de seis classes diferentes¹.

Em 2017, as pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA) totalizam cerca de 36,7 milhões. As novas infecções pelo HIV na América Latina obtiveram uma queda que é correlacionada à efetividade dos programas de prevenção e tratamento². No Brasil, o número total de infecções é cerca de 882 mil, o que representa 49% do total da América Latina². A distribuição proporcional dos casos de AIDS no país indica que existe uma maior concentração nas regiões Sul e Sudeste, com respectivamente, 21,1% e 52,1% do total de pessoas infectadas no período de 2007 até junho de 2016, que corresponde a 136.945 casos³.

Entre as unidades da federação, Santa Catarina destaca-se por possuir a terceira maior taxa de detecção de AIDS por 100 mil habitantes. No estado estima-se que existam 26.745 pessoas vivendo com HIV/AIDS (PVHA)⁴.

O HIV-1 é dividido em genótipos, de acordo com suas distintas características genéticas⁵. No Brasil predominam, em ordem de frequência, os genótipos B, BF, recombinantes do F e C⁶. Na região Sul, em especial nos estados de SC e RS, o subtipo C é detectado com maior frequência^{7,8}.

O HIV-1 possui uma elevada taxa de mutação, o que pode ser correlacionado com o surgimento de variantes de resistência às drogas que compõe a TARV⁹. Tal fato que pode dificultar o desenvolvimento de métodos para tratamentos eficazes com a utilização de uma única classe de medicamentos⁶.

Algumas das mutações com maior impacto na resistência aos fármacos da classe Inibidores de Transcriptase Reversa Nucleosídeos (NRTIs) são M41L, K65R, K70R, L74V, Q145M/L, Q151M, M184V, L210W e T215Y. Aos Inibidores da Transcriptase Reversa Não-nucleosídeo (NNRTIs) são L100I, K103N, V106A, Y181C/I, Y188C/L, G190A, G190S, P225H, P236L e à Protease M46I/L, I54V, V82A/F/T, I84V¹.

A adesão à terapia antirretroviral é essencial para que haja sucesso terapêutico¹⁰. O tratamento utilizado atualmente permite supressão virológica sustentada, proporcionando qualidade de vida satisfatória para os pacientes. Contudo, mesmo em uso regular da TARV podem ocorrer falhas virológicas. Tal fato justifica-se pela alta capacidade de mutação do vírus, podendo resultar em resistência aos ARV¹¹.

Falha virológica é definida pela não obtenção da supressão viral, identificada por exame de carga viral superior a 50 cópias/ml. A confirmação deve ser realizada por um segundo exame que deve ser feito cerca de quatro semanas após o primeiro. A principal

causa de falha virológica é a falta de adesão à TARV¹². A conduta a ser adotada nesta situação é identificar os motivos para falta de adesão e realizar o exame de genotipagem do HIV^{13,14}.

O exame de genotipagem detecta as mutações associadas com a resistência aos ARV, ou seja, em casos de falha virológica identifica o perfil de resistência genotípica¹⁵. Portanto, o exame é necessário na condução da terapêutica após falha do tratamento, uma vez que direciona a escolha do ARV adequado. Caso o exame não identifique mutações pode-se inferir que o indivíduo não estava usando as medicações quando realizou a coleta de sangue para análise. A genotipagem possui como vantagem a economia de custos relacionados às trocas de ARV e fornece uma perspectiva mais realista do desempenho futuro do tratamento, especialmente nos casos de resistência muito extensa¹⁶. Também é indicada a realização do exame em algumas situações no início do tratamento, pois o vírus contraído pode ter tido origem em um indivíduo com HIV em tratamento onde já há resistência à TARV^{7,14,16,17}. No Brasil é indicada a realização de exame de genotipagem pré-tratamento em pacientes com diagnóstico de coinfeção tuberculose e HIV, gestantes, crianças e adolescentes, além de pessoas infectadas por parceiros em uso de TARV¹⁸.

No Brasil, em 2001, foi implantada a Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO) que realiza, de forma gratuita, o exame de genotipagem e o aconselhamento terapêutico pelo Sistema Único de Saúde (SUS)¹⁶.

A epidemia causada pelo vírus HIV-1 está se expandindo, principalmente no Brasil, o qual possui 49% das novas infecções da América Latina². É sabido que a TARV não promove cura, e devido à alta taxa de mutação do vírus HIV-1 pode ocorrer resistência ao tratamento¹¹. Em consequência disso surgiu uma necessidade de

conhecimento sobre as possíveis causas de resistência viral aos medicamentos ARV, e partindo do conhecimento de que isso ocorre devido às mutações do vírus surgiu o exame de genotipagem com a finalidade de reconhecimento¹. SC é um estado com cenário negativo da epidemia de HIV/AIDS, conforme os dados descritos nos parágrafos anteriores⁴. Por isso, é necessário o conhecimento do perfil de pacientes que falham ao tratamento, assim como a identificação das principais mutações. Além disso, esse estudo é inédito na região Sul do país e possui grande importância a fim de contribuir com possíveis novos tratamentos para indivíduos com falha virológica.

Diante do exposto, esse estudo objetivou: Caracterizar os indivíduos portadores do HIV que realizam o exame de genotipagem no Estado de Santa Catarina e a diversidade viral encontrada.

MÉTODOS

Esse foi um estudo observacional transversal descritivo, que obteve dados coletados a partir do Sistema de Informação para Rede de Genotipagem (SISGENO) que existe desde 2000 e em 2008 foi criada a versão para web. O SISGENO contém resultados de exames de genotipagem com informações genotípicas do vírus infectante de cada paciente e indica as mutações de resistência que proporcionaram a falha virológica. O SISGENO é alimentado por exames que foram realizados a partir dos vírions que têm seu RNA amplificado por reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciado em equipamentos automatizados. A sequência de aminoácidos obtida é comparada com uma sequência do vírus HIV selvagem para identificar onde ocorreram as mutações¹⁵.

A população estudada foi constituída por pessoas com diagnóstico de infecção pelo HIV, maiores de 18 anos, que realizaram exame de genotipagem do HIV no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017, totalizando 1.422 exames.

Para o cálculo da amostra foi levado em consideração a realização de 650 exames de genotipagem no ano de 2016 e 772 em 2017, uma prevalência esperada de 65,8%, 18,3% e 13,5% dos genótipos C, B/C e B, respectivamente^{7,8}. Considera-se como suficiente uma amostra de 400 indivíduos (200 do ano de 2016 e 200 do ano de 2017).

A seleção da amostra foi realizada de forma consecutiva.

As informações disponíveis que foram coletadas são clínicas e demográficas e o acesso foi realizado por meio do site <https://sisgeno.aids.gov.br/> (acesso restrito aos pesquisadores autorizados). Só foram coletados esses dados após a autorização do guardião legal do SISGENO.

Foi considerada a variável dependente Mutações do HIV. Já as independentes foram sexo (feminino/masculino), idade (em anos), gestante (sim/não), origem dos exames em relação às regiões do estado (Oeste/Serrana/Norte Catarinense/Vale Do Itajaí/Grande Florianópolis/Sul Catarinense), Genotipagem Pré-Tratamento (sim/não), Mutações presentes em pacientes com Genotipagem Pré-Tratamento, Primeira Falha Viroológica (sim/não), Subtipo Viral (B/BF/recombinantes do F/C/outras).

O instrumento de coleta de dados foi elaborado pelos autores e contempla informações demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes em estudo.

Os dados foram tabulados utilizando o software Windows Excel, e posteriormente analisados por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*. Version 18.0 [Computer program]. Chicago: SPSS Inc; 2009. Os dados

qualitativos são apresentados na forma de frequências (simples e relativa) e os dados quantitativos em medidas de tendência central (média ou mediana) e suas respectivas medidas de variabilidade/dispersão (Amplitude [máximo e mínimo] e desvio padrão).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Sul de Santa Catarina, número de aprovação 2.570.714.

RESULTADOS

Um total de 1.422 exames de genotipagem foram realizados no período estudado, dos quais foram estudados 400 exames. A média de idade foi de 39,6 anos, e a distribuição por sexo foi 49,8% dos exames em mulheres e 50,2% em homens.

Os pacientes que estavam na primeira falha ao tratamento constituíram 71,8% dos participantes. Já 11,5% do total coletado realizou o exame de Tropismo CCR5. Desses, apenas 6,5% eram portadores de vírus com tropismo CCR5.

Provenientes predominantemente das regiões Grande Florianópolis (32,8%) e Vale do Itajaí (30,3%), seguidos das regiões Sul catarinense (14,2%), Norte catarinense (13,8%), Serrana (7%) e Oeste (2%). Uma prevalência de 36 (9%) de gestantes foi encontrada na população estudada.

Adicionalmente, o subtipo viral que apresentou maior frequência foi o C (69%) seguidos do B (24%) e, posteriormente, recombinantes do F, BF e outros totalizando esses (6,8%).

Os pacientes que realizaram genotipagem pré-tratamento obtiveram média de idade de 27,1 anos, totalizando 28 indivíduos (7%), todos gestantes.

Tabela 1 – Mutações do vírus HIV-1 mais frequentes em indivíduos que realizaram genotipagem pré-tratamento no Estado de SC

MUTAÇÕES	N	%
M41L	5	17,8
K103N	3	10,7
D67N	1	3,6
V106M	1	3,6
T215Y	1	3,6
K219E	1	3,6

Em relação às mutações de Inibidores de Protease, 97,3% da população estudada apresentou alguma mutação principal, secundária ou polimorfismo.

Tabela 2 - Mutações de Resistência às drogas Inibidores de Protease mais frequentes na população estudada no Estado de SC.

MUTAÇÕES	N	%
I93L	315	78,8
M36I	261	65,3
L89M	217	54,3
L63A/P	163	40,8
I13V	87	21,8
L33F	21	5,3
T74P	9	2,25
I84V	8	2,0
I54L	7	1,8
V11I	5	1,3
V32I	5	1,3
I47I/V	3	0,8
I54M	3	0,8
50V	2	0,5
L76V	1	0,3

Grande parte dos indivíduos, 385 pacientes (96,25%) apresentou mutações de impacto aos Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos.

Tabela 3– Mutações de resistência aos NRTImais relevantes e com frequência \geq 10%

MUTAÇÕES	N	%
M184V	190	47,5
A62A/V	91	22,8
D67N	53	13,3
P225H	48	12,0
K65R	44	11,0
K70R	40	10,0
M41L	34	8,5
T215F	25	6,3
K219Q	23	5,8
L210W	18	4,5

Tabela 4 – Mutações deNNTIR mais relevantes dessa classe e com frequência \geq 10%

MUTAÇÕES	N	%
K103N	139	34,8
G190A	28	7,0

Sobre os Inibidores da Integrase, dos quais 19 pacientes (4,75%) realizaram o exame, três indivíduos (15,78%) apresentaram resultado positivo para alguma mutação de resistência a essa classe de ARV. Foram encontradas as seguintes mutações de resistência com frequência de 0,5% (L74L/N/M e T97A) e 0,3% (E92Q; G140A; Y143R; Q148R; N155H; E157Q).

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principais resultados o fato de a maioria dos pacientes terem realizado o exame na primeira falha terapêutica, e a presença de mutações de resistência a todas as classes de antirretrovirais estudadas. As mutações que obtiveram maior destaque às classes NRTIs, NNRTIs e IP foram respectivamente M184V, K103N e I93L¹⁵. Outro resultado relevante foi a evidente predominância de vírus do subtipo C (69%). Fato que pode ser explicado tanto pela recente implementação do exame de genotipagem em território nacional, bem como ao uso

anterior em grande parte dos pacientes dos primeiros esquemas antirretrovirais o que, por conseguinte pode propiciar maior número de mutações¹⁵.

A proporção entre o sexo dos participantes foi 1:1. Tal resultado diverge da distribuição de infecção pelo HIV por sexo no Brasil. No Boletim Epidemiológico de 2017 esta proporção era de 1 mulher para cada 2,5 homens. Pode-se especular que tal resultado relacione-se com a maior vinculação feminina ao sistema de saúde, fato esse que leva a uma identificação mais precoce da falha virológica e consequente solicitação mais frequente do exame de genotipagem^{3,16,19}.

De acordo com boletim epidemiológico de 2017 a idade predominante de indivíduos brasileiros com diagnóstico de HIV está entre 20 a 34 anos. Em contrapartida, a idade encontrada no presente estudo foi de 39,6 anos. Este resultado pode ser justificado por serem pessoas com infecção há mais tempo, consequentemente expostas a diversos esquemas terapêuticos que hoje sabemos que são subótimos. Portanto tais indivíduos possuem maior chance de falha e virológica e necessidade de realizar o exame de genotipagem³.

No presente estudo notou-se maior realização da genotipagem na Grande Florianópolis e no Vale do Itajaí. O resultado pode ser devido ao elevado número de infecções nas respectivas regiões e também ao treinamento e capacitação dos médicos que prestam assistência de qualidade nesses dois grandes centros e, por conseguinte, encaminham estes pacientes para realizar o exame de genotipagem logo que identificam a falha virológica.

No presente trabalho identificou-se o predomínio do vírus do subtipo C. Este resultado está em conformidade com outros estudos da região Sul e demonstra

divergência com pesquisas realizadas nas regiões Norte e Nordeste do país que indicam o Subtipo B como o de maior frequência^{6-8,11,17,20-22}.

Todas as classes de ARV apresentaram mutações no presente trabalho. A mais frequente da classe NRTIs foi a M184V. Tal fato é explicado pela baixa barreira genética da lamivudina que facilita a emergência desta mutação^{23,24}. Já aos NNRTIs a que teve maior destaque foi a K103N. Esta mutação é frequente nos pacientes que evoluem com falha terapêutica usando Efavirenz. Este fármaco fazia parte do esquema preferencial de tratamento do HIV no Brasil até 2017, justificando, portanto, a sua elevada frequência²⁵. Em relação aos Inibidores de Protease destacou-se a I93L, que é um polimorfismo, significando que emerge com grande facilidade, mas sem um impacto clínico significativo²⁶. Já as mutações 33F e 74P foram aquelas encontradas e que possuem maior relevância, uma vez que podem impactar na potência da principal droga da classe, o Darunavir²⁷.

Esse estudo é importante por descrever o perfil epidemiológico e virológico dos pacientes infectados pelo vírus HIV-1 no Estado de Santa Catarina e no Sul do Brasil, visto que é o primeiro estudo no âmbito estadual.

SUPORTE FINANCEIRO

Nenhum.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os pesquisadores envolvidos no estudo declaram não haver conflitos de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Garbelli A, Riva V, Crespan E, Maga G. How to win the HIV-1 drug resistance hurdle race: running faster or jumping higher? *Biochemichal J.* 2017; 474: 1559-77.
2. Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS – UNAIDS –, 2017 [Global AIDS update]. [acesso em 2017 Ago 10]. Disponível em: http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/Global_AIDS_update_2017_en.pdf
3. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2017. Brasília: Ministério da Saúde, 2017; 48 (1): 1-52.
4. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2015; IV: (1): 1-100.
5. Monteiro-Cunha JP, Araújo AF, Santos E, Galvão-Castro B, Alcântara LC. Lackof High-Level Resistance Mutations in HIV Type1 BF Recombinant Strains Circulating in Northeast Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2011; 27: 1-10.
6. Gräf^a T, et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: Anassociation of HIV-1 subtypes with exposure categories. *J of Clinical Virology.* 2011; 51: 186-91.
7. Librelotto CS, Gräf^a T, Simon D, Almeida SEM, Lunge VR. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical.* 2015; 48: 249-57.

8. Chen R, Quinones-Mateu ME, Mansky LM. HIV-1 mutagenesis during antirretroviral therapy: implications for successful drug treatment. *Front BioSci.* 2005; 10: 743-50.
9. Collins SE, Grant PM, Shafer RW. Modifying antiretroviral therapy in virologically suppressed HIV-1 infected patients. *Therapy in Practice.* 2015; [acesso em 2017 Ago 12] Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-015-0515-6>
10. Amaral AGM, Oliveira IB, Carneiro DC, Alcantara LCJ, Monteiro-Cunha JP. An overview of the molecular and epidemiological features of HIV-1 infection in two major cities of Bahia state, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017; 112 (6): 411-18.
11. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos – Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – CONITEC. Relatório PCDT HIV 2017. Brasília: Ministério da Saúde, 2017; Páginas 1-160.
12. Assefa Y, Gilks CF. Second-line antirretroviral therapy: so much to be done. Yibeltal Assefa, *Lancet HIV.* 2017; S2352-3018(17) 30112-1.
13. Yearly S, Kaiser L, Race R, Bru JP, Clavel F, Perrin L. Transmission antirretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet.* 1999; 354:729-33.
14. Ministério da Saúde (Brasil). Departamento de Vigilância, Prevenção e controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais 2001, atualização 2017. Projeto de implantação Renageno no Brasil. Brasília: Ministério da Saúde, 2017; 1-10.
15. Diaz RS. Guia Prático de Genotipagem no Brasil 2016. *Soc. Bras. de Infectologia* (1) 1-20.

16. Oliveira Filho AW, Brites C. Geolocalization of HIV-1 subtypes and resistance mutations of patients failing antiretroviral therapy in Salvador – Brasil. *The Brazilian J of Infectious Diseases*. 2017; 21 (3): 234-239.
17. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde – Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais. Nota Informativa Nº 007/2017 - DDAHV/SVS/MS. Brasília: Ministério da Saúde, 2017; 1-6.
18. Gomes R, Nascimento EF, Araújo FC. Why do men use health services less than women? Explanations by men with low versus higher education. *Cad Saúde Pública, Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 23 (3): 565-574.
19. Da Costa CM, Costa de Oliveira CM, Chehuan de Melo YF, Delatorre E, Bello G, Couto-Fernandez JC. High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016;32(9):918–22.
20. Araujo AF, Brites C, Monteiro-Cunha J, Santos LA, Galvao–Castro B, Alcantara LCJ. Lower Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Brazilian Subtype B Found in Northeastern Brazil with Slower Progression to AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010;26(11):1249–54
21. Delatorre E, Couto-Fernandez JC, Bello G. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: High Prevalence of Non-B Subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017;33(7):639–47.
22. Gagliardini R, et al. Impact of the M184V Resistance Mutation on Virological Efficacy and Durability of Lamivudine-Based Dual Antiretroviral Regimens as Maintenance Therapy in Individuals With Suppressed HIV-1 RNA: A Cohort Study. *Inf Dis Soc f America. Open Forum Infect Dis* 2018 Jun; 5 (6) 113.

23. Miller V, Stark T, Loeliger AE, Lange JM. The impact of the M184V substitution in HIV-1 reverse transcriptase on treatment response. *HIV Med* 2002; 3:135–45
24. Koval CE, Dykes C, Wang J, Demeter LM. Relative replication fitness of efavirenz-resistant mutants of HIV-1: Correlation with frequency during clinical therapy and evidence of compensation for the reduced fitness of K103N + L100I by the nucleoside resistance mutation L74V. *Science Direct*. 2006. (353) 184-192.
25. Martinez-Cajas JL, Pai NP, Klein MB, Wainberg MA. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). *J of the Int AIDS Society* 2009, 12:11.
26. Vidal JE, Freitas AC, Song AT, Campos SV, Dalben M, Hernandez AV. Prevalence and factors associated with darunavir resistance mutations in multi-experienced HIV-1-infected patients failing other protease inhibitors in a referral teaching center in Brazil. *Braz J InfectDis*. 2011. 15 (3): 245-8.