



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

PEDRO HENRIQUE FERREIRA CAVALCANTI

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA-1 CIRCULANTE NO RIO GRANDE DO NORTE**

NATAL/RN

2019

PEDRO HENRIQUE FERREIRA CAVALCANTI

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA
HUMANA-1 CIRCULANTE NO RIO GRANDE DO NORTE**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Parasitária na área de Microbiologia/Virologia.

Orientador: Prof. Dr Josélio Maria Galvão de Araújo

Natal/RN

2019

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Central Zila Mamede

Cavalcanti, Pedro Henrique Ferreira.

Caracterização genética do vírus da Imunodeficiência Humana-1
circulante no Rio Grande do Norte / Pedro Henrique Ferreira
Cavalcanti. - 2019.

136 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do
Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Parasitária, Natal, RN, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo.

1. HIV-1 - Dissertação. 2. Mutação de resistência -
Dissertação. 3. Rio Grande do Norte - Dissertação. 4.
Caracterização genética - Dissertação. I. Araújo, Josélio Maria
Galvão de. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

A Dissertação “**Caracterização genética do Vírus da Imunodeficiência Humana-1 circulante no Rio Grande do Norte**”, elaborado por **Pedro Henrique Ferreira Cavalcanti** e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora, foi aceita pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e homologada pelos membros da Banca, como requisito à obtenção do título de **Mestre em Biologia Parasitária**, área de Microbiologia/Virologia.

Natal, 28 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Josélio Maria Galvão de Araújo – Orientador
Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFRN

Prof. Dr. José Veríssimo Fernandes – 1º Examinador
Departamento de Microbiologia e Parasitologia - UFRN

Prof. Dr. João Felipe Bezerra - 2º Examinador
Departamento Ciências da Saúde - Fanec

Prof. Dr. Gonzalo José Bello Bentancor – 3º Examinador
Instituto Oswaldo Cruz

***“O começo de todas as ciências é o espanto de as coisas
serem o que são”***

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, a Ele toda honra e toda a glória pelos séculos dos séculos, Senhor da minha vida e do meu destino, aquele que tem me sustentado de todas as formas durante todos os dias.

A minha família: minha esposa, Daniela Matias pelas palavras de sabedoria nos momentos mais oportunos, pelas palavras de ânimo quando muitas vezes pensei em desistir, sem você essa pesquisa não seria possível. A minha mãe, Mércia Alves por todo carinho, amor e dedicação sacrificial e suas eternas preocupações em saber se eu sairia vivo do mestrado, ao meu irmão Felipe Cavalcanti, minha fonte de alegria, obrigado pelas perguntas e curiosidades acerca do mestrado mesmo ainda sendo tão jovem. Ao meu pai, Luís Sérgio (*in memoriam*) cuja inteligência sempre foi motivo de admiração. A minha tia, Milca Alves por ser minha segunda mãe e pela confiança e força. A minha sogra, Dilza Matias pelas preocupações e pela confiança (em cada olhar) de que eu conseguiria terminar essa etapa, não poderia deixar de agradecer aos seus pais, Afrísio Marinho e Denísia Matias pois foram os primeiros a me apoiarem e mostrar a importância em prosseguir nas titulações acadêmicas ainda quando nem pensava no mestrado, vocês estavam certos o tempo todo. A toda família do meu pai, da minha mãe e da minha esposa meus agradecimentos.

Ao meu orientador, Dr. Josélio Araújo, por ser um exemplo de profissional e de pessoa. Passei a nutrir ao longo desse tempo admiração profunda, sou eternamente grato e convicto de que não poderia existir orientador melhor, sou eternamente grato pela paciência, confiança e por moldar meu desenvolvimento intelectual.

Aos amigos da virologia (LADIC): Joelma Dantas, Raissa Liane, Anne Aline. Em especial, à Hannaly Wana por ser uma amigona, obrigado por ser minha "guia" no laboratório, obrigado pelas saídas quando pensava que as situações não poderiam ficar piores, obrigado pelos ensinamentos nos experimentos e na bioinformática, sou eternamente grato pela sua paciência, pelo tempo dedicado e atenção.

Aos amigos com quem compartilhei, de alguma forma, a minha pesquisa: Marcelo Bila, Viviane Hiromi, Marcel Ferreira, Hellen Wingerter, André Luís (Chovas), Leonardo Medeiros (*in memoriam*), Dayan Paiva, Sarah Hulliane (Mig), Rodrigo

Bessa, Julyana Ramalho (Jujs), Eduardo Domingos, Priscila Andrade, Herivelto Nobre, Carol Helena, Fellipe Nobre.

Aos meus colegas e amigos do LACEN-RN: A Dra. Goretti Lins de Queiroz, diretora geral do LACEN-RN cuja ajuda foi imprescindível para conclusão desta pesquisa. Aos meus colegas do CD4/CD8: Samaíra Azevedo e Ana Célia Nogueira. Aos meus colegas da Imunologia/Virologia: Bernadete Dantas, Isabel Cristina, Bernadete Brandão, Marcel Ferreira, Morais Moreira. Aos meus colegas da Biologia Molecular (Carga Viral): Marecilda Mesquita, Themis Rocha, Edilza Pinheiro, João Felipe Bezerra, Janaína Sonale, Cinthya Roberta.

Aos meus colegas do mestrado (PPgBP): Ramayana Brito, Marília Faria, Giancarlo Paiva, Rogério Jr, Sara Ester e Brenda Cardoso.

A Gustavo Henrique pela ajuda na bioinformática.

Aos colegas do Laboratório de Genética: Fábio Costa pela ajuda em desvendar o mistério do meu arquivo da dissertação e a Ana Rafaela nos sequenciamentos.

Aos professores: Dr. José Veríssimo Fernandes, Dr. Valter Andrade, Dra. Janeusa Trindade, Dr. Paulo Guedes, Dra. Lilian Giotto, Dr. Thales Domingos, Dra. Vânia Andrade, Dra. Renata Antonácia, meu muito obrigado a cada um de vocês, obrigado pelos ensinamentos e paciência, não tenham dúvida que foram valiosos.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Desde os primeiros relatos da AIDS na década de 1980 até os dias atuais, o HIV foi responsável por aproximadamente 35 milhões de mortes, sendo considerada uma das piores pandemias já registrada na espécie humana. O HIV é um vírus RNA pertencente a família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* do gênero dos *Lentivirus*. Apesar de existirem duas espécies de HIV, somente o HIV-1 apresenta distribuição pandêmica. Filogeneticamente o vírus divide-se em diversos grupos, subtipos, subsubtipos, CRF's e URF's. Com o advento da terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) a infecção pelo HIV passa a ser considerada de caráter crônica, o indivíduo bem tratado apresenta melhora na qualidade de vida e possibilidade de não transmissibilidade. Todavia o aumento da resistência aos antirretrovirais, principalmente devido à má adesão ao tratamento, poderá prejudicar os avanços globais realizados até hoje no combate ao HIV. O objetivo deste estudo foi a realização da caracterização genética das linhagens circulante do HIV-1 no Estado do Rio Grande do Norte a partir de amostras referente ao período de janeiro à outubro de 2018. Um total de 170 amostras das 4 regiões de saúde do Rio Grande do Norte foram selecionados, atendendo os critérios estabelecidos de inclusão, e em 8 amostras foi possível a realização de todas as etapas metodológicas da pesquisa. A realização da filogenia por meio do sequenciamento da região da protease e transcriptase reversa do gene *Pol* apontou predomínio do HIV1-B circulante com um paciente apresentando o subtipo F1 e um apresentando subtipo C. A análise do sequenciamento genético dos vírus apontou a presença de diversas mutações de resistência, tanto transmitida como adquirida, além de mutações acessórias, apenas em 4 amostras não foram evidenciadas mutações de importância clínica, as mutações mais recorrentes foram modeladas e identificadas na transcriptase reversa em regiões de α -hélice, folha- β e região de alça. Em conclusão, esse estudo revelou um predomínio do HIV-1 subtipo B circulante e o perfil de mutações revelou que os antirretrovirais mais prejudicados foram os inibidores da transcriptase reversa. As informações são fundamentais para redirecionamento adequado de resgate terapêutico destes pacientes e rastreamento epidemiológico molecular de linhagens circulantes.

Palavras-chave: HIV-1, Mutação de resistência, Rio Grande do Norte, Caracterização genética.

ABSTRACT

Since the earliest reports of AIDS in the 1980s to the present, the HIV was responsible for approximately 35 million deaths, considered one of the worst pandemics ever recorded in the human. HIV is an RNA virus belonging to the family *Retroviridae*, subfamily *Orthoretrovirinae* of the genus *Lentivirus*. Although there are two species of HIV, only HIV-1 has a pandemic distribution. Phylogenetically the virus is divided into several groups, subtypes, sub-types, CRF's and URF's. With the advent of highly active antiretroviral therapy (HAART) HIV infection is considered chronic, the well treated individual is not developing AIDS, resulting in an improvement in the quality of life, increased survival and the possibility of non-transmissibility. However, increasing resistance to antiretroviral drugs, mainly due to poor adherence to treatment, could jeopardize the global progress made so far in combating HIV. The objective of this study was to perform the genetic characterization of circulating HIV-1 strains in the State of Rio Grande do Norte from samples from January to October 2018. A total of 170 samples from the four health regions of Rio Grande do Norte were selected, meeting the established inclusion criteria, and in 8 samples it was possible to perform all the methodological steps of the research. The phylogeny by means of sequencing of the protease and reverse transcriptase region of the Pol gene showed predominance of circulating HIV-1-B with one patient presenting subtype F1 and one presenting subtype C. The analysis of the genetic sequencing of the viruses indicated the presence of several mutations of resistance, both transmitted and acquired, as well as accessory mutations, only mutations of clinical importance were not detected in 4 samples, the most recurrent mutations were modeled and identified in reverse transcriptase in regions of α -helix, β -sheet and region of shoulder strap. In conclusion, this study revealed a predominance of circulating HIV-1 subtype B and the mutation profile revealed that the most impaired antiretrovirals were reverse transcriptase inhibitors. The information is fundamental for adequate redirection of therapeutic rescue of these patients and molecular epidemiological screening of circulating strains.

Keywords: HIV-1, Resistance mutation, Rio Grande do Norte, Genetic characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grupos filogenéticos do HIV-1 resultado das transmissões zoonóticas.....	27
Figura 2 Caça de macacos mangabeys na África. MOORE et al., 2004.....	31
Figura 3 - Estrutura genômica do HIV-1. Adaptado de ENGELMAN et al., 2012.	39
Figura 4 - Resumo estrutural esquemático do HIV. Adaptado de BECERRA et al., 2016.	39
Figura 5 - Ciclo replicativo do HIV. Adaptado de ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012.	40
Figura 6 - Modelo de transfecção de linfócitos T CD4+ mediada por células dendríticas. Adaptado de WILEN et al., 2012	48
Figura 7 - Meta 90-90-90. Brasil, 2016 (Fonte: MS/SVS/DIAHV).	59
Figura 8 - Barreira genética para desenvolvimento de resistência aos ARVs em vírus sem mutações prévias de resistência. Barreira genética crescente da esquerda para direita. DIAZ, 2016.	64
Figura 9 - Diagrama esquemático da barreira genética (BG) para resistência e potência de ARV selecionados. Os ITRNs são mostrados em preto, os ITRNNs em verde, os IPs em vermelho, os INI em azul e em círculo amarelo, o maraviroque (MRV) em lilás e a enfuvirtida (ENF) em laranja. Adaptado de TANG & SHAFER, 2012.	64
Figura 10 - Revelação dos fragmentos em gel de agarose 0,5%. As amostras destacadas em azul são referentes a aplicação do protocolo alternativo com uso da transcriptase reversa do próprio vírus e maior quantidade de substratos para reação de Nested-PCR enquanto que os destaques em branco referem-se ao protocolo com uso da Go Script Transcriptase Reverse em quantidade reduzida de substratos. PM = Peso Molecular.	88
Figura 11 - Resumo da condição terapêutico dos pacientes do estudo.....	101
Figura 12 – Resumo estatístico do sexo dos pacientes do estudo.	101

Figura 13 - Resumo da carga viral dos pacientes do estudo.	102
Figura 14 - Descrição do quantitativo de amostras em cada etapa do estudo.	102
Figura 15 - Árvore filogenética distribuída em ramos. Ramos vermelhos, lilás e azuis referentes aos clados C, F1 e B do HIV-1, respectivamente. Amostras deste estudo encontram-se destacadas.	109
Figura 16 - Árvore filogenética em topografia radial. Os retângulos vermelho, lilás e azul são referentes aos clados C, F1 e B do HIV-1, respectivamente. Amostras do RN são precedidas de marcação em losango.	110
Figura 17 - Modelagem de fragmento da transcriptase reversa contendo as mutações M184V, L210W e T215Y.	111
Figura 18 - Representação gráfica da transcriptase reversa contendo as mutações M41L, M184V, T215Y, L210W.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados estatísticos globais da pandemia HIV/AIDS nos anos 2000 a 2017	32
Tabela 2 - Classe farmacológica, exemplos de fármacos e seu mecanismo de ação.	56
Tabela 6 - Parâmetros de termociclagem para a reação de sequenciamento (Cycle Sequencing)	82
Tabela 7 - Descrição do perfil de carga viral e contagem de linfócitos T CD4 ⁺ das amostras envolvidas na validação para protocolo alternativo.	84
Tabela 8 - Descrição do quantitativo utilizado na 1 ^o etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo sem uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®	85
Tabela 9 - Descrição do quantitativo utilizado na 2 ^o etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo sem uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®	85
Tabela 10 - Parâmetros de termociclagem utilizados para cada uma das etapas da reação da Nested-PCR. Os parâmetros são os mesmos em ambos os protocolos.....	86
Tabela 11 - Descrição do quantitativo utilizado na 1 ^o etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo com uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®	86
Tabela 12 - Descrição do quantitativo utilizado na 2 ^o etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo com uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®	87
Tabela 13 Perfil clínico laboratorial dos 170 pacientes.....	91
Tabela 14 - Valores da carga viral e contagem de linfócitos T CD4 dos pacientes enviados para sequenciamento.	103
Tabela 15 - Valores percentuais da região sequenciada do gene da PR e TR, resultado da subtipagem viral e localidade dos pacientes.....	105

Tabela 16 - Mutações primárias e acessórias associados a resistência à inibidores de protease, inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo e inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleotídeo. 106

Tabela 17 - Descrição das mutações encontradas com maior frequência e o seu impacto na terapia antirretroviral. 107

LISTA DE ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B Mrna editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>
ARV	Antirretroviral
ATP	Adenosina Trifosfato
ATV	Atazanavir
AZT	Zidovudina
B _{BR}	Linhagem B brasileira
B _{CAR}	Linhagem B caribenha
B _{PANDEMIC}	Linhagem B pandêmica
BD	Becton Dickinson
BG	Barreira Genética
BPA-I	Boletim de Produção Ambulatorial. Dados individualizados
CA	Califórnia
CA	Capsídeo
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CC	Quimiocina com dois resíduos de cisteína adjacentes
CCR5	Receptor de quimiocina tipo 5
CD38	<i>Cluster of differentiation 38</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD57	<i>Cluster of differentiation 57</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>

CDK9	<i>Cyclin-dependent kinase 9</i>
CE	Controlador de elite
CI	Concentração inibitória
CID	Código Internacional de Doenças
CPI	Complexo pré-integração
CRF	<i>Circulating Recombinant Forms</i>
CV	Carga viral
CXC	Quimiocina
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
DC SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
ddl	Didanosina
DIAHV	Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/AIDS e das Hepatites Virais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNA _{DS}	Ácido desoxirribonucleico dupla fita
DNA _C	Ácido desoxirribonucleico complementar
DOR	Doravirina
DRV	Darunavir
DSIF	[5,6 – Dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol (DRB) sensitivity inducing factors]
DTG	Dolutegravir
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFV/EFZ	Efavirenz
ENF/T-20	Enfuvirtida
ENV	Envelope
ETR	Etravirina
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug and Administration</i>

FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FPV	Fosamprenavir
FTC	Emtricitabina
Gag	<i>Group-specific antigen</i>
Gp	Glicoproteína
HAART	Terapia antirretroviral altamente ativa
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA-DR	<i>Human leukocyte antigen</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HTLV III	Vírus linfotrópico da célula T humana tipo III
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IDAV	<i>Immunodeficiency-associated vírus</i>
IFN α	Intérferon tipo alfa
IN	Integrase
INI	Inibidor de integrase
IP	Inibidor de protease
IP/r	Inibidor de protease <i>boosted</i> Ritonavir
IP-10	Proteína-10 indutora de interferon
ITRN	Inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
Kb	Kilobase
LACEN-RN	Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Almino Fernandes – Rio Grande do Norte
LADIC	Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer

LAV	Vírus Associado à Linfadenopatia
LBMG	Laboratório de Biologia Molecular e Genômica
LC	Célula de Langerhans
LNH	Linfoma não Hodgkin
Log	Logaritmo
LPC	Linfoma Primário Cerebral
LPV	Lopinavir
LPV/r	Lopinavir <i>boosted</i> Ritonavir
LTCB	Laboratório de Biologia Celular do Tumor
LTCD4	Linfócito T CD4
LTCD8	Linfócito T CD8
LTR	Longas repetições de terminal
LTreg	Linfócito T regulatório
MA	Matriz
MAFFT	<i>Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences</i>
MCLRS	<i>Mannose-dependent C-type lectin receptors</i>
MDR	<i>Multiple Drug Resistance</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade II
MRV	Maraviroc
MS	Ministério da Saúde
NC	Nucleocapsídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Nef	<i>Negative Regulatory Factor</i>
NELF	<i>Negative elongation factor</i>
NFV	Nelfinavir
NVP	Nevirapina

OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde
ORF	Matriz de leitura aberta
p160	Poliproteína p160
Pb	Pares de base
PCB	Junta de Coordenação de Programa
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
Pol	Polimerase
PR	Protease
PrEP	Profilaxia Pré-Exposição
PVHA	Pessoas Vivendo com HIV/AIDS
PVHIV	Pessoas Vivendo com HIV
RA	Resistência Adquirida
RAL	Raltegravir
RAM	Reações Adversas ao Medicamento
RDC	República Democrática do Congo
RE	Retículo Endoplasmático
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAg	RNA genômico
RRE	<i>Rev responsive elemento</i>
RT	Resistência Transmitida
RTV	Ritonavir
SAIDS	Síndrome da Imunodeficiência de Símios
SIV _{CPZ}	Vírus da Imunodeficiência Símia de Chipanzés
SIV _{GOR}	Vírus da Imunodeficiência Símia de Gorilas

SIV _{SMM}	Vírus da Imunodeficiência Símia de Sooty <i>Mangabays Monkey</i>
SQV	Saquinavir
STLV III	Vírus linfotrópico de células T de Símios tipo III
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAM	Mutações selecionadas por análogos de timidina
TARV	Terapia Antirretroviral
Tat	<i>Transactivator protein</i>
TB	Tuberculose
TDF	Tenofovir
TGF- β 1	Fator de crescimento β 1
TPV	Tipranavir
TR	Transcriptase reversa
UDI	Usuários de Drogas Injetáveis
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
UNAIDS	<i>The Jointed United Nations Programme on HIV/AIDS</i>
URF	<i>Unique Recombinant Forms</i>
USA	<i>United States of America</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>
Vpx	<i>Viral protein X</i>
Δ 32CCR5	Deleção de 32 pares de base do CCR5

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1 Aspectos Históricos	23
1.2 Origem do HIV e aspectos filogenéticos	26
1.3 Epidemiologia	31
1.4 Taxonomia e organização estrutural do HIV-1.....	37
1.5 Ciclo replicativo do HIV	40
1.6 Patogênese.....	47
1.7 Manifestações clínicas.....	52
1.8 Terapia antirretroviral.....	54
1.9 Marcadores genéticos de resistência aos ARVs.....	60
1.9.1 Testes de Resistência e Fatores Biológicos para Resistência aos Antirretrovirais	60
1.9.2 Potência e Barreira Genética dos Antirretrovirais	63
1.9.3 Marcadores genéticos e Mecanismos de Resistência do HIV-1 entre as classes de Antirretrovirais.....	66
1.9.3.1 Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo a Nucleosídeo/Nucleotídeo (ITRN)	66
1.9.3.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos (ITRNN).....	67
1.9.3.3 Inibidores da Protease (IP)	68
1.9.3.4 Inibidores da Integrase (IN strand transfer inhibitors - INI).....	68
1.9.3.5 Inibidor de Fusão.....	69
1.9.3.6 Antagonista do correceptor CCR5.....	70
2 JUSTIFICATIVA	71
3 OBJETIVOS	73
3.4 Objetivo geral:.....	73
3.5 Objetivos específicos:.....	73
4 MATERIAIS E MÉTODOS	74
4.1 Amostras	74
4.2 Carga viral e contagem de linfócitos T CD4 ⁺	75
4.3 Sequenciamento de gene da Protease/Transcriptase Reversa do HIV-1.....	76

4.3.1 Extração do RNA total	76
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested-PCR)	77
4.3.3 Eletroforese em gel de Agarose	79
4.3.4 Purificação do produto de PCR para sequenciamento por Extração de Gel de Agarose.....	79
4.3.5 Purificação do produto da Nested-PCR purificado	80
4.3.6 Quantificação do DNA	81
4.3.7 Reação de Sequenciamento.....	81
4.3.8 Purificação e Precipitação de DNA para remoção de Dye Terminators.....	82
4.3.9 Análise de Sequências	83
4.4 Implantação de Protocolo alternativo para amplificação do gene Pol no HIV-1 em Nested-PCR	84
5 RESULTADOS	89
5.1 Perfil clínico laboratorial das amostras	89
5.2 Caracterização Genética.....	104
5.3 Mutações e Perfil de Resistência aos ARV's.....	106
5.4 Análise Filogenética.....	108
5.5 Modelagem de Proteína.....	111
6 DISCUSSÃO	112
7 CONCLUSÃO	118
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Históricos

A Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA), mundialmente conhecida como AIDS (*Acquired Immunodeficienty Syndrome*) foi a sigla criada em 1982 pelo CDC, Atlanta, EUA (*Centers for Disease Control and Prevention*) (CDC, 1982) para expressar uma doença cuja característica marcante era uma profunda disfunção imunológica fatal. No ano seguinte descobriu-se que o agente etiológico responsável era um vírus, mais especificamente um retrovírus. Em 1986 esse vírus passou a ser conhecido pela sua sigla, HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), cuja infecção crônica ocasionaria a AIDS.

A AIDS por consequência do HIV é considerada uma das pandemias mais devastadoras registradas na espécie humana (SHARP & HAHN, 2011), sendo causa da morte, desde início da epidemia em 1981 até o ano de 2017, de aproximadamente 35 milhões de pessoas em todo o mundo [28.8 milhões – 41.5 milhões], em seu auge, ameaçou a estabilidade e a segurança global (UNAIDS, 2018a)

Os primeiros relatos da doença ocorreram na década de 1980, mais precisamente em 1981 em Los Angeles e São Francisco, nos Estados Unidos (EUA), quando o CDC, Atlanta (EUA) recebeu relatos de caso de grupos de jovens homossexuais masculinos apresentando sintomas de infecção fúngica por *Pneumocystis jirovecii* (antigamente conhecido como *Pneumocystis carini*), fungo oportunista que acomete indivíduos imunocomprometidos (MASUR et al., 1981), além disso esses indivíduos apresentavam um raro acometimento neoplásico maligno de endotélio linfático conhecido como sarcoma de Kaposi (HYMES et al., 1981) além de linfadenopatia generalizada e persistente. Outros grupos como usuários de drogas intravenosas, pacientes hemofílicos, prisioneiros, parceiras sexuais femininas de homens infectados, haitianos e indivíduos da região central da África começaram a apresentar o mesmo quadro de imunodeficiência (CLUMECK et al., 1983; VIEIRA et al., 1983).

Os anos de 1983 e 1984 foram importantes na história da AIDS pois neste período sucederam-se uma série de pesquisas científicas cujos resultados foram o isolamento e descobrimento do vírus responsável pela Síndrome da Imunodeficiência

Adquirida. Até então não se conhecia o patógeno, todavia já era conhecido a sua transmissibilidade sexual, sanguínea e vertical e apresentava como grupo mais vulneráveis os homossexuais masculinos, sendo a AIDS erroneamente estereotipada como “Doença Gay”, nessa época a taxa de mortalidade da AIDS chegava a alarmantes 39% (CDC, 1982; SHARP & HAHN, 2011).

O vírus foi isolado na França e nos EUA. O descobrimento do HIV é oficialmente creditado ao médico e virologista francês Luc Montagnier e a virologista francesa Françoise Barré-Sinoussi do Instituto Pasteur (França) tendo como co-descobridor o médico americano Robert Gallo e sua equipe no Laboratório de Biologia Celular do Tumor (LTCEB) do Instituto Nacional do Câncer, EUA. Ambos os laboratórios sabiam que estavam diante de um vírus da família dos retrovírus, em tal contexto o isolado foi nomeado como HTLV III (Vírus Linfotrópico para Células T de Humanos III) por Gallo (GALLO et al., 1984) e LAV (Vírus Associado à Linfadenopatia) por Montagnier onde conseguiu-se, em 1983, observar a atividade da enzima transcriptase reversa (BARRÉ-SINOUSSE et al., 1983). Outros nomes para o vírus também foram sugeridos por outros pesquisadores como: IDAV (*Immunodeficiency-associated vírus*) e ARV (*AIDS-associated vírus*), contudo os nomes HTLVIII/LAV eram os mais conhecidos e utilizados em publicações científicas da época (COFFIN et al., 1986), porém tanto o HTLVIII/ como o LAV tratavam-se na verdade de isolados do mesmo vírus que poucos anos depois (1986) seria definitivamente nomeado como Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) pelo ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia Viral) (CDC, 1982; COFFIN et al., 1986).

Nos anos seguintes uma série de controvérsias pelo reconhecimento da descoberta ocorreram envolvendo as equipes de ambos os países, até que em 2008 o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi concedido a Luc Montagnier e Françoise Barré-Sinoussi, do grupo francês (SCIENCE, 2008).

No final do ano de 1985 foi publicado um estudo onde foi evidenciado, em indivíduos no Senegal, um quadro de imunodeficiência semelhante àqueles reportados nos EUA e na África Central, até então não haviam relatos de AIDS na porção Oeste da África. O estudo conseguiu demonstrar que o vírus era similar, porém não era o mesmo que ocasionara os surtos nos EUA. Tal vírus estava mais relacionado ao STLV III (antigo nome para SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia) em

African Green Monkeys (macacos verdes africanos) do que ao HTLVIII/LAV (antigos nomes do HIV) (BARIN et al., 1985). Em 1986, esses achados também foram confirmados em um outro estudo onde conseguiu-se isolar, de indivíduos do oeste da África, um retrovírus que apresentava componentes antigênicos diferentes do HTLVIII/LAV e que estariam mais relacionados ao STLVIII em *African Green Monkeys*, tal estudo apresentou a proposta de chama-lo de LAVII (CLAVEL et al., 1986).

Em 1986, o ICTV passou a classificar os primeiros isolados como HIV-1, enquanto que os novos isolados virais provenientes da região oeste de África passaram a ser conhecidos como HIV-2, (BARIN et al., 1985; CLAVEL et al., 1986; COFFIN et al., 1986) sendo este classificado como outra espécie de HIV com aspectos antigênicos distintos e divergência gênica (como o gene Vpx encontrado apenas no HIV-2) quando comparado ao HIV-1. A caracterização antigênica após o isolamento possibilitou, em 1985, a disponibilidade de testes para detecção de anticorpos específicos, sendo esta medida de fundamental importância principalmente na triagem de sangue e hemoderivados (WENDEL et al., 1985).

O HIV-1 é o vírus de perfil pandêmico, mais prevalente e patogênico quando comparado ao HIV-2. O HIV-2 é endêmico na África Ocidental, embora tenham sido relatados em outros países como Brasil, Portugal e França (CAMPBELL-YESUFU; GANDHI, 2011). Apesar de poder causar doença semelhante àquela vista por consequência do HIV-1, o HIV-2 se apresenta com uma menor carga viral em seus hospedeiros, o que implica em uma transmissibilidade muito menor do que aquela vista no HIV-1, a progressão da doença, quando ocorre, é mais lenta do que a observada no vírus pandêmico. A baixa transmissibilidade do vírus é importante em explicar porque o HIV-2, diferentemente do HIV-1, não apresenta perfil pandêmico, sendo mais restrito ao Oeste da África, local onde ocorreram as transmissões zoonóticas a partir de seus hospedeiros naturais, popularmente conhecidos como *Sooty mangabey monkeys* (mangabey fuliginoso), símio encontrado em especial nas florestas de Senegal e Gana (MAARTENS et al., 2014; POPPER et al., 2000). Todavia, estudo recente tem reportado que, contrariamente ao que majoritariamente se pensa sobre HIV-2, indivíduos infectados com essa espécie também apresentam alta probabilidade de desenvolvimento de AIDS sem o tratamento antirretroviral (ESBJÖRNSSON et al., 2018).

1.2 Origem do HIV e aspectos filogenéticos

No ano de 1985 um estudo isolou, pela primeira vez, um retrovírus a partir de quatro primatas não humanos com linfoma e sinais de SAIDS (Síndrome da Imunodeficiência de Símios) à semelhança da AIDS, em seres humanos. O retrovírus descoberto apresentava elevada similaridade com o então recém-isolado HIV (HTLVIII/LAV) (DANIEL et al., 1985) e recebeu posteriormente o nome de Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV). O SIV juntamente com o HIV (HIV-1 e HIV-2) formam o grupo do gênero lentivírus dos primatas.

Os Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) formam um grande grupo de retrovírus que podem ser achados naturalmente em primatas, tanto domésticos como selvagens, tais como o macaco verde africano (*Chlorocebus sabeus*), macacos mangabeys fuliginosos (*Cercocebus atys*), mandris (*Mandrillus sphinx*), chimpanzés (*Pan troglodytes*) e gorilas (*Gorilla gorila*). (BEER et al., 1999). Uma análise filogeográfica na Ilha Bioko, Guiné Equatorial, foi capaz de isolar linhagens ancestrais do SIV concluindo que esses vírus infectam seus hospedeiros naturais por pelo menos há 30.000 anos. (WOROBAY et al., 2010). A grande maioria dos primatas hospedeiros naturais dos SIVs apesar de apresentarem elevada carga viral a sua progressão para a doença é rara ou inexistente, todavia, quando o SIV é capaz de infectar espécies que não são seus hospedeiros naturais como macacos de origem asiática (*Rhesus*) e estes são infectados pelo SIV do macaco verde africano (*Chlorocebus sabeus*) aqueles desenvolvem um quadro semelhante à AIDS humana (SAIDS), com estabelecimento de infecções oportunistas (BEER et al., 1999).

Estudos da relação parasito-hospedeiro em primatas não progressores (hospedeiros naturais) mostram que; (1) ocorre uma resposta imune inata e adaptativa durante a fase aguda assim como os hospedeiros progressores; (2) a principal diferença observada é durante a transição da fase aguda para a fase crônica onde os primatas não progressores apresentam diferentes padrões de ativação imunológica com mudanças fenotípicas em suas subpopulações linfocitárias CD4+, limitando a intensa ativação imune e conservando a imunidade de mucosa, estes fatores contribuem para uma lenta ou não progressão da infecção e uma redução da transmissão vertical do SIV nesses primatas (SODORA et al., 2009).

A proporção de hospedeiros naturais selvagens soropositivos para o SIV pode ser considerado elevado. Acredita-se que a proximidade desses animais (fluidos biológicos) com os seres humanos seja o evento responsável pela origem do HIV. A hipótese científica mais aceita para a origem é sustentada por estudos epidemiológicos e filogenéticos que apontam a origem do HIV em 12 eventos de transmissões zoonóticas não relacionadas (transmissão de primatas não humanos para humanos), cada evento representou o sucesso do vírus em ultrapassar a barreira entre espécies e em alguns dos vários “saltos” do SIV entre primatas não humanos para humanos ocorreu uma adaptação do vírus ao seu novo hospedeiro, características desse novo *fitness* do vírus recém-adaptado possibilitou que este fosse capaz de ser transmitido entre seres humanos, originando assim o HIV, esta hipótese foi testada por várias análises filogenéticas onde é sequenciado e comparado o genoma de diferentes linhagens de SIVs e HIVs (GAO et al., 1999; KEELE et al., 2006; LOCATELLI & PEETERS, 2012; SHARP et al., 2015).

Cada transmissão zoonótica bem-sucedida levou a formação de diferentes grupos do HIV hoje conhecidos, sendo estes grupos classificados de acordo com a similaridade de sua sequência nucleotídica. Das 12 transmissões, quatro delas são filogeneticamente associadas ao HIV-1 e deram origem aos seus grupos (figura 1), são eles; M (*Major*), O (*Outlier*), N (*Non-M, non-O*) e P (SOUZA, 2018).

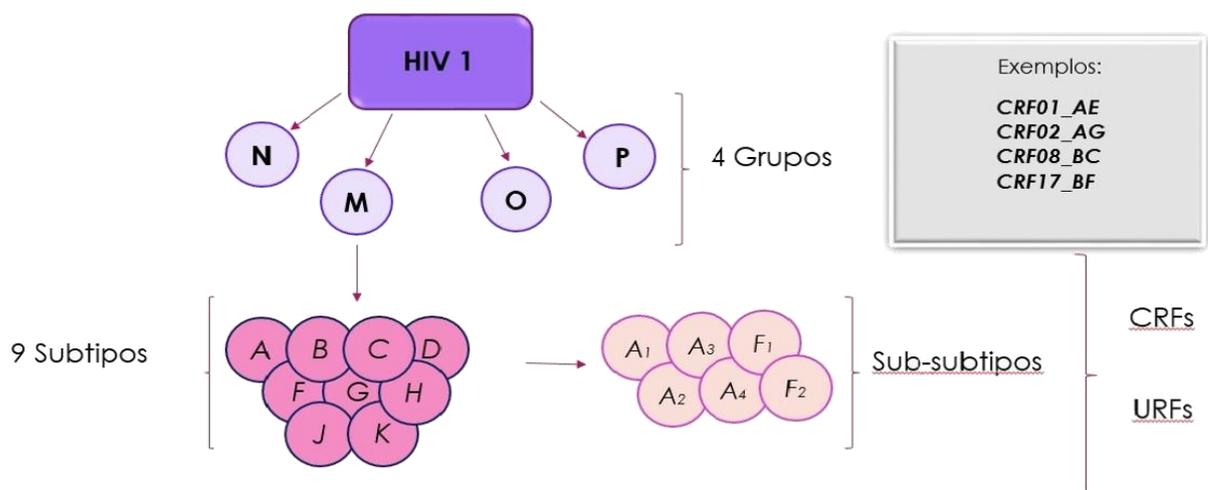


Figura 1 - Grupos filogenéticos do HIV-1 resultado das transmissões zoonóticas

Apenas o grupo M apresenta o perfil pandêmico sendo as demais (Não-M) restritas a costa oeste do continente africano e Camarões (África Equatorial/Oeste africano). As linhagens não-M apresentam menor índice de transmissão apesar de apresentarem um curso natural da infecção semelhante àquele visto no grupo M (MOUREZ et al., 2013). O HIV-1 M apresenta nove subtipos (A-D, F-H, J e K) podendo ramificar-se em sub-subtipos (A1-A4 e F1 a F2) além das formas recombinantes circulantes (CRF) e únicas (URF), sendo estes dois últimos o resultado da identificação de fragmentos genômicos de linhagens filogeneticamente distintas porém contidas em um único ácido nucléico recombinante, quando este mesmo genoma recombinante é encontrado em pelo menos três indivíduos ele é considerado 'circulante' e recebe o nome de CRF, quando não existem relatos epidemiológicos de circulação daquele HIV-1 recombinante dá-se o nome de URF por ser até então 'único'. Existem 97 CRFs conhecidas no mundo para o HIV-1 e um CRF para o HIV-2 (LOS ALAMOS, 2018).

As transmissões filogeneticamente associadas ao HIV-2 são oito, originando os grupos (A-H), porém apenas os grupos A e B representam linhagens que são transmitidas entre humanos. O HIV-2 apresenta uma menor transmissibilidade e circula predominantemente na costa ocidental da África. (SOUZA, 2018).

A origem zoonótica africana do HIV-2 em *sooty mangabeys monkey* foi a primeira elucidada. A proposta foi reportada pela primeira vez em 1989 depois de observada elevada similaridade genômica entre o HIV-2 e o SIV de uma comunidade de macacos verdes presente na costa oeste da África, se estendendo do Senegal à Costa do Marfim (SANTIAGO et al., 2005; HIRSCH et al., 1989). Com o sucesso do isolamento do SIV-ancestral direto (presente em macacos verdes da África popularmente conhecidos como *sooty mangabeys monkey* (*Chlorocebus aethiops*)) ficou demonstrado filogeneticamente a relação da origem entre SIV_{smm} (SIV *sooty mangabeys monkey*) e HIV-2. Estimativas evolutivas acreditam que os eventos de transmissão interespecífica dando origem aos grupos A e B do HIV-2 ocorreram por volta da década de 1940, e sua maior difusão em populações humanas ocorreram cerca de 20 – 30 anos após (LEMEY et al., 2003). A domesticação, caça para alimentação (*bush meat*) e/ou simplesmente a caça para matança desses animais, uma vez que eram considerados "pragas" para agricultura, possibilitou a ocorrência

de eventos que acabaram por gerar a transmissão zoonótica e posterior circulação do vírus em humanos, em pelo menos oito ocasiões (SHARP & HAHN, 2011).

A origem zoonótica do HIV-1 foi identificada posteriormente, na década de 90, quando demonstrado que o HIV-1 apresentava-se filogeneticamente mais próximo do SIV de grandes primatas como chimpanzés (SIV_{cpz}) e gorilas (SIV_{gor}), em especial os chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (KEELE et al., 2006; TAKEHISA et al., 2009; HUET et al., 1990) apresentando maior semelhança, portanto, com HIV-1 M (vírus pandêmico) e HIV-1 N. Os grupos O e P do HIV-1 estão relacionados a transmissões zoonóticas de gorilas para humanos. O HIV-O está relacionado ao SIV_{gor} de gorilas da região central do Camarões (*Western lowland gorilas*), enquanto que o HIV-1 P estaria mais próximo filogeneticamente do SIV_{gor} de gorilas encontrados na porção sudoeste do Camarões. (D'ARC et al., 2015).

Todos os quatro grupos do HIV-1, assim como SIV_{gor} estão relacionados particularmente com o SIV_{cpzPtt} (*Pan troglodytes troglodytes*) de chimpanzés cujo habitat são as florestas localizadas no sul do Camarões, o Gabão e a República Democrática do Congo (D'ARC et al., 2015; KEELE et al., 2006; TAKEHISA et al., 2009). O SIV_{cpz} também foi encontrado em outra subespécie de chimpanzés (*Pan troglodyte schweinfurthii*) encontrado na República Democrática do Congo e em países mais a leste da África, todavia o HIV-1 é filogeneticamente mais próximo do SIV_{cpzPtt} do que o SIV_{cpzPts}. O SIV_{cpzPtt} é considerado um ancestral comum do vírus tanto para humanos quanto para gorilas. (KEELE et al., 2006).

Abordagens estatísticas robustas apontam Kinshasa (antiga Leopoldville), localizada na República Democrática do Congo (RDC), como local de disseminação do grupo M do HIV-1 em torno do ano de 1920 [1909 – 1930]. O estudo aponta (SHARP & HAHN, 2008) transporte de chimpanzés via balsa pelo rio Sangha a partir do sul do Camarões em direção centro urbano de Kinshasa (cidade mais populosa na época), algo comum enquanto Kinshasa era colônia belga e explorava a borracha e marfim (1884 – 1916). O grupo M (subtipo B), anos depois, foi diversas vezes introduzidos nos EUA na década de 80 com intermediação de indivíduos haitianos que já haviam entrado em contato com o HIV-1 na década de 60, esses profissionais haitianos infectados com o HIV-1 na RDC acabaram levando, sem saber, o vírus para a América. O HIV-1 M infecta mais de 40 milhões de pessoas em todo o mundo, o

HIV-1 N foi encontrado em torno de 20 pessoas no Camarões e o HIV-1 P apenas em dois indivíduos de procedência camaronesa, o HIV-1 O infecta em torno de 100.000 pessoas no Camarões, Gabão, Nigéria e em países vizinhos a estes (D'ARC et al., 2015; FARIA et al., 2014; SHARP & HAHN, 2011).

A origem do HIV-1 pode resumidamente ser sustentada por algumas evidências, tais como: (1) os dois vírus (HIV-1/SIV de grandes primatas) compartilham estruturas genômica (similaridade genômica); (2) vírus de chimpanzés e variantes do HIV-1 se agrupam próximos nas árvores filogenéticas; (3) prevalência dos SIVs nos seus hospedeiros naturais; (4) existem evidências indiretas de que a infecção de chimpanzés pelo SIV não é um evento incomum; (5) chimpanzés e representantes de todos os grupos de HIV-1 compartilham a mesma região geográfica (o oeste da África Equatorial); e (6) a carne de chimpanzés é utilizada como alimento na região, o que evidencia a oportunidade do SIV ter infectado a espécie humana. Portanto, a hipótese da infecção de humanos a partir de eventos zoonóticos envolvendo outros primatas é amplamente aceita na comunidade científica. (PINTO & STRUCHINER, 2006).

Existem várias teorias que tentam explicar como se deram os eventos iniciais de transmissão zoonótica dos SIVs originando o HIV como; *Tainted Polio Vaccine* (Teoria da Vacina Contaminada), *Cut Hunter* (Caçador), *Contaminated Needles* (Agulhas Contaminadas) e *Heart of Darkness* (Coração da Escuridão). A teoria mais aceita é a teoria do *Cut Hunter* (Caçador). Resumidamente esta abordagem aponta como origem a caça da carne de chimpanzés e outros primatas infectados com SIV. A transmissão aconteceria no momento da alimentação de carnes malcozidas e/ou durante manuseio desses alimentos infectados cujos fluídos (sangue, secreção) entraram em contato com fluídos biológicos de seres humanos, seja por solução de continuidade (cortes e outros ferimentos) ou exposição direta em mucosas (MOORE, 2004; PINTO et al., 2007). Na figura 2 temos exemplos de caças a macacos mangabeys na África.



Figura 2 Caça de macacos mangabeys na África. MOORE et al., 2004

1.3 Epidemiologia

A UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS) apresentou em seu mais recente levantamento epidemiológico as estatísticas globais sobre HIV referente ao ano de 2017, neste relatório estima-se que aproximadamente existam 36.9 milhões de pessoas [31.1 milhões – 43.9 milhões] em todo o mundo vivendo com HIV (PVHIV). Aproximadamente 21.7 milhões de pessoas [19.1 milhões – 22.6 milhões] apresentam acesso à TARV e no ano de 2017 houve cerca de 1.8 milhões [1.4 milhão – 2.4 milhões] de novas infecções pelo HIV. Do início da pandemia até o ano de 2017 aproximadamente 77.3 milhões [59.9 milhões – 100 milhões] de pessoas foram infectadas pelo HIV. Até os dias atuais o vírus tirou a vida de aproximadamente 35.4 milhões de pessoas [25 milhões – 49.9 milhões]. A tabela 1 apresenta o resumo dos dados epidemiológicos globais da infecção pelo HIV entre os anos 2000 a 2017 (UNAIDS, 2018b).

Tabela 1 Dados estatísticos globais da pandemia HIV/AIDS nos anos 2000 a 2017

	2000	2005	2010	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Pessoas vivendo com HIV	27,4 milhões [23,1 milhões– 32,6 milhões]	30,1 milhões [25,4 milhões– 35,8 milhões]	32,4 milhões [27,4 milhões– 38,5 milhões]	33,7 milhões [28,4 milhões– 40,0 milhões]	34,3 milhões [29,0 milhões– 40,8 milhões]	35,0 milhões [29,5 milhões– 41,6 milhões]	35,6 milhões [30,1 milhões– 42,4 milhões]	36,3 milhões [30,6 milhões– 43,1 milhões]	36,9 milhões [31,1 milhões– 43,9 milhões]
Novas infecções por HIV (total)	2,8 milhões [2,2 milhão– 3,7 milhões]	2,5 milhões [1,9 milhão– 3,2 milhões]	2,2 milhões [1,7 milhão– 2,9 milhões]	2,1 milhões [1,6 milhão– 2,7 milhões]	2,0 milhões [1,6 milhão– 2,7 milhões]	2,0 milhões [1,5 milhão– 2,6 milhões]	1,9 milhão [1,5 milhão– 2,5 milhões]	1,9 milhão [1,4 milhão– 2,4 milhões]	1,8 milhão [1,4 milhão– 2,4 milhões]
Novas infecções por HIV (com idade 15+)	2,4 milhões [1,9 milhão– 3,2 milhões]	2,1 milhões [1,6 milhão– 2,7 milhões]	1,9 milhão [1,5 milhão– 2,5 milhões]	1,8 milhão [1,4 milhão– 2,4 milhões]	1,8 milhão [1,4 milhão– 2,4 milhões]	1,8 milhão [1,4 milhão– 2,3 milhões]	1,7 milhão [1,3 milhão– 2,3 milhões]	1,7 milhão [1,3 milhão– 2,2 milhões]	1,6 milhão [1,3 milhão– 2,1 milhões]
Novas infecções por HIV (com idade 0–14)	420 000 [260 000– 620 000]	380 000 [240 000– 560 000]	270 000 [170 000– 400 000]	230 000 [150 000– 340 000]	220 000 [140 000– 320 000]	200 000 [120 000– 290 000]	190 000 [120 000– 280 000]	180 000 [110 000– 270 000]	180 000 [110 000– 260 000]
Mortes relacionadas à AIDS	1,5 milhão [1,1 milhão– 2,2 milhões]	1,9 milhão [1,4 milhão– 2,7 milhões]	1,4 milhão [1,0 milhão– 2,0 milhões]	1,2 milhão [880 000– 1,7 milhão]	1,2 milhão [820 000– 1,6 milhão]	1,1 milhão [770 000– 1,5 milhão]	1,0 milhão [730 000– 1,5 milhão]	990 000 [700 000– 1,4 milhão]	940 000 [670 000– 1,3 milhão]
Pessoas com acesso à terapia antirretroviral	611 000 [538 000– 636 000]	2,1 milhões [1,8 milhão– 2,1 milhões]	8,0 milhões [7,1 milhões– 8,3 milhões]	11,4 milhões [10,1 milhões– 11,9 milhões]	13,2 milhões [11,6 milhões– 13,8 milhões]	15,1 milhões [13,3 milhões– 15,7 milhões]	17,2 milhões [15,2 milhões– 17,9 milhões]	19,4 milhões [17,1 milhões– 20,2 milhões]	21,7 milhões [19,1 milhões– 22,6 milhões]
Recursos disponíveis para HIV (países de baixa - e média - renda)	US\$ 4,8 bilhões*	US\$ 9,4 bilhões*	US\$ 15,9 bilhões*	US\$ 18,8 bilhões*	US\$ 19,5 bilhões**	US\$ 19,2 bilhões**	US\$ 19,0 bilhões**	US\$ 19,1 bilhões**	US\$ 21,3 bilhões**

O continente africano concentra os maiores números de casos de HIV no mundo, corroborando com a hipótese científica mais aceita de origem do HIV uma vez que neste continente são encontrados todos os grupos filogenéticos do vírus, ou seja, o continente apresenta os maiores dados epidemiológicos, tanto quantitativamente como qualitativamente (diversidade genética). O continente africano apresenta aproximadamente 26 milhões de pessoas vivendo com HIV o que representa 70% das infecções no mundo. Seguido pela região da Ásia e região do Pacífico com aproximadamente 5.2 milhões de PVHIV representando aproximadamente 15% de prevalência no mundo. Em terceiro está a América do Norte e Europa (ocidental e central) com 2.2 milhões [1.9 milhão – 2.4 milhões] de PVHIV. A América Latina concentra aproximadamente 1.8 milhões [1.5 milhão – 2.3 milhões] de casos de infecção pelo HIV. O leste Europeu e Ásia central concentra 1.4 milhões de casos de infecção pelo HIV e a região do Caribe concentra em torno de 310.000 [260.000 – 420.000] casos de infecção (BECERRA et al., 2016; UNAIDS, 2018c).

O Brasil apresenta aproximadamente 830 mil PVHIV, a epidemia no Brasil é considerada “concentrada”, pois o número de casos, novos ou antigos, em qualquer população chave é maior que 5% (UNAIDS, 2017a). O Brasil concentra o maior número de infectados da América Latina, responsável por quase 50% das infecções do continente (UNAIDS, 2017b). As regiões Sudeste e Sul concentram os maiores

números de casos com 52.3% e 20.1%, respectivamente. As regiões Nordeste, Norte e Centro-Oeste correspondem a 15.4%, 6.1% e 6.0% do total de casos, respectivamente. A região Centro-Oeste apresentou pouca variação na taxa de detecção do HIV, chegando a 16.7 casos/100 mil hab. As regiões Sudeste e Sul apresentam tendência de queda nos últimos dez anos com diminuição de 35.8% e 19.3%, respectivamente. As regiões Norte e Nordeste apresentam uma tendência linear de crescimento da taxa de detecção nos últimos dez anos correspondendo a alarmantes 35.7% e 66.4%, respectivamente (BRASIL, 2017a).

No Brasil chama atenção o aumento de número de casos entre jovens, principalmente o homem jovem. Nos últimos dez anos, tem sido verificado um aumento da taxa de detecção entre 15 a 19 anos, 20 a 24 anos, 25 e 29 anos. Outro grupo de faixa etária com incremento da taxa de detecção são os indivíduos de 60 anos ou mais. Destaca-se o aumento em jovens de 15 a 19 anos e de 20 a 24 anos, cuja taxa triplicou entre o primeiro grupo e, mais que duplicou no grupo de 20 a 24 anos. A transmissão heterossexual é a principal forma de transmissão do HIV no Brasil, porém, há uma tendência de aumento na proporção de casos entre homossexuais e bissexuais nos últimos dez anos, que passou de 35.6% em 2006 para 47.3% em 2016, um aumento de 32.9%. Em contrapartida é notado uma diminuição da transmissão entre usuários de drogas injetáveis (UDI), representando 3.2% dos casos entre homens e 1.9% dos casos entre mulheres no ano de 2016 (BRASIL, 2017a).

Em dezembro de 2013 novas metas para conter o avanço da pandemia HIV/AIDS foram requisitadas por uma Junta de Coordenação de Programa (PCB) sendo aceito e colocado em prática pela UNAIDS. O resultado da nova meta de intensificação da TARV, colocado em prática após 2015 foi uma ambiciosa meta, porém alcançável, sendo esta baseada em uma nova construção narrativa sobre contenção do HIV/AIDS no mundo, a “meta 90-90-90”. Esta meta consiste em um desafio para os governos, dentre todas as PVHIV em cada país 90% devem ser diagnosticadas, 90% das pessoas diagnosticadas devem estar sob cobertura da TARV e 90% das pessoas em TARV apresentando CV suprimida. Quando esta meta for alcançada, pelo menos 73% de todas as pessoas vivendo com HIV no mundo terão supressão viral. Modelos matemáticos sugerem que uma vez esta meta tríplice seja alcançada até 2020 a epidemia de AIDS chegará ao seu fim até 2030, gerando

benefícios para a saúde e economia. A única maneira de alcançar essa meta é por meio de estratégias alicerçadas em princípios de direitos humanos, respeito mútuo e inclusão (UNAIDS, 2018c).

Quanto a epidemiologia molecular, o clado C do HIV-1 do grupo M é a variante viral mais prevalente em todo o mundo concentrando-se principalmente no continente africano (HEMELAAR et al., 2011) sendo responsável por aproximadamente metade das infecções em todo o globo, entretanto o clado B é o mais bem distribuído no mundo, e nas Américas é o mais prevalente. No Brasil encontra-se maior prevalência do subtipo B, seguido pelos subtipos F, C e pequena proporção do subtipo D, além de recombinantes B/F e F/C (EYER-SILVA et al., 2008; HEMELAAR et al., 2006, 2011; MORGADO et al., 2002; REQUEJO, 2006).

No Brasil existe um predomínio do subtipo B (70-90%), seguido do subtipo F (5-20%), e menos frequentemente o subtipo C (1-10%), além dos recombinantes B/C e B/F (BRASIL, 2016; PINTO & STRUCHINER, 2006; SABINO, 1998; SILVEIRA, 2007). O subtipo B do HIV-1 tem sido descrito como o mais prevalente no Brasil e pertence ao clado pandêmico que migrou da RDC para o Haiti no fim da década de 1960 e deste para os EUA, América Latina, inclusive o Brasil. Seguido do subtipo B, temos no Brasil descrito as variantes F1 e CRF B/F1 nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste.

Mais especificamente na região nordeste do Brasil estudos encontram maior prevalência do HIV-1 B, seguidos do subtipo F1, C e casos esporádicos como subtipo D, estruturas recombinantes predominantes encontradas no nordeste foram classificadas como BF1, BC, BCF1 e CRF02_AG-like (PINTO, 2004; BRASIL, 2016; DELATORRE et al., 2017; GADELHA et al., 2003).

O clado F1 do HIV-1 encontrado na região nordeste, é encontrado além do Brasil, na Angola e Romênia. Filogeneticamente esse subtipo segrega em três grandes clados a partir de eventos fundadores do subtipo F1 da República Democrática do Congo (RDC) (1950 – 1960) e Bélgica, introduzido inicialmente na Angola. O percurso do subtipo F1 e os eventos que sucederam sua chegada até as Américas e Europa ainda não estão totalmente esclarecidos, embora trabalhe-se a hipótese de que o subtipo F1 brasileiro tenha sido originado da Angola. Sua presença no Brasil é mais facilmente encontrada em fragmentos recombinantes do que o

genótipo puro (BELLO et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2009). O subtipo F1 foi introduzido no Brasil depois da introdução do subtipo B provavelmente na segunda metade da década de 1970, sua expansão começou a diminuir ainda por volta da década de 1980, após aproximadamente dez anos de crescimento mais acelerado, compartilha ampla rota de transmissão heterossexual, homossexual e entre usuários de drogas injetáveis (UDI's) (BELLO et al., 2006, 2007).

Na região Sul do Brasil observa-se uma maior prevalência do subtipo C (SILVEIRA et al., 2012). Apesar de um quadro de estabilidade na diversidade molecular do HIV-1 no Brasil, algumas mudanças têm sido observadas, como o aumento gradativo do avanço do subtipo C (subtipo mais prevalente do mundo responsável pela infecção de aproximadamente 50% das PVHIV) avançando da região Sul do Brasil em direção aos estados mais ao norte, por questões migratórias e por uma aparente menor patogenicidade levando a um longo período sem desenvolvimento de doença quando comparado a outros subtipos de HIV-1 (revisado por PINTO & STRUCHINER, 2006).

O subtipo B, predominante no Brasil, divide-se principalmente no subtipo B pandêmico (B_{PANDEMIC}) e o subtipo B caribenho (B_{CAR}). O subtipo B_{CAR} é menos prevalente e corresponde a menos de 10% do subtipo B circulante no Brasil com exceção de Roraima (41%) (DIVINO et al., 2016). A hipótese mais aceita e defendida para origem do subtipo B encontrado no Brasil correlacionam e identificam a cepa viral fundante como oriunda da África Central introduzida em haitianos por volta da década de 1960. Entre 1960 e 1970 várias introduções do vírus passaram a ocorrer nos Estados Unidos e países do Caribe a partir do Haiti (BELLO et al., 2007; DIVINO et al., 2016). Dos Estados Unidos o vírus foi disseminado para os demais países do mundo (incluindo o Brasil), estabelecendo o clado B pandêmico (B_{PANDEMIC}). A outra variante do subtipo B permaneceu predominantemente restrita as regiões caribenhas estabelecendo o clado não pandêmico ou caribenho (B_{CAR}). O subtipo B é capaz de suportar certo grau de variabilidade genética em árvores filogenéticas, curiosamente, quando analisado o gene do envelope percebeu-se que no Brasil pode-se falar, filogeneticamente, de uma variante B brasileira (B_{BR}) cujo motivo na região *V3 loop* do envelope é identificado como GWGR altamente disseminado no país (DIAZ et al., 2008; MORGADO et al., 1994).

O subtipo B encontrado predominantemente no Brasil foi introduzido na população brasileira, provavelmente na região sudeste brasileira em algum momento antes de 1980 (BELLO et al., 2007). O subtipo B do HIV-1 encontra-se mais prevalente em populações chaves, como aquelas de homens que fazem sexo com homens (HSH) e apresenta uma rota de transmissão predominantemente homossexual quando comparado a outros clados do HIV-1 (CHALMET et al., 2010).

No Brasil, casos isolados de clados do HIV normalmente encontrados na epidemia africana têm sido descritos, como por exemplo, os subtipos A e D e os recombinantes CRF02_AG e CRF45_cpx (ALENCAR et al., 2013; CARIDE et al., 2000; EYER-SILVA & MORGADO, 2007; PESSÔA et al., 2015).

1.4 Taxonomia e organização estrutural do HIV-1

O *Vírus da Imunodeficiência Humana-1* (HIV-1) é um retrovírus, classificado, segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV), como pertencente à família *Retroviridae*, fazendo parte da subfamília *Orthoretrovirinae*, do gênero dos *Lentivirus*. O HIV-1 e HIV-2 representam exemplos de espécies virais dentro desse gênero (ICTV, 2017).

Os *Lentivirus* recebem esse nome pois os vírus associados levam a um curso lento de infecção, proporcionando um período relativamente elevado entre o momento da infecção e o aparecimento das manifestações clínicas. Os *Lentivirus* também são conhecidos como agentes causais de imunodeficiências adquiridas em diferentes animais, além de apresentarem associação com doenças neurológicas (MURRAY, 2014).

O HIV-1 é um vírus envelopado clássico, cuja composição é de natureza fosfolipídica (oriundo da membrana plasmática da célula hospedeira durante brotamento). Em seu envelope encontram-se inseridas glicoproteínas importantes para adsorção viral a célula hospedeira alvo, como a gp120 e gp41. A gp120 apresenta grande capacidade de extensão para mutações, contém cinco regiões hipervariáveis intercalada por regiões conservadas, a facilidade de diversidade genética nestas glicoproteínas dificulta a elaboração de vacinas (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012; LI et al., 2015). Abaixo do envelope encontramos a matriz viral de composição proteica (p17 ou MA) e envolto por essa matriz encontra-se uma outra estrutura proteica denominada capsídeo (p24 ou CA), esta estrutura tem a função de proteger o conteúdo genético do vírus.

O HIV-1 é um vírus RNA, ou seja, seu material genético consiste de ácido ribonucleico (RNA). O HIV-1 alberga no interior de seu capsídeo duas cópias da fita simples de RNA com polaridade positiva. Retrovírus como o HIV pertencem ao grupo VI da classificação genômica de Baltimore sendo referenciados como vírus RNA de cadeia simples com intermediário de DNA. Além do ácido nucléico viral, no interior do capsídeo encontram-se outras enzimas fundamentais para o sucesso da replicação, maturação e infectividade viral como protease (PR), transcriptase reversa (TR) e integrase (IN). Encontram-se também presentes no vírion enzimas acessórias como as proteínas vif, vpr, nef e vpu que serão melhor descritas no tópico de replicação

viral, além de componentes celulares derivados do hospedeiro. O vírion é externamente esférico e apresenta um diâmetro que varia entre 100 e 120 nm (SUNDQUIST & KRÄUSSLICH, 2012).

O genoma do HIV apresenta aproximadamente 9,7 kilobases (kb) e nove matrizes de leitura aberta (ORF), que originam 15 proteínas, a leitura de cada fita de RNA é feita em três fases abertas principais em sobreposição, constituindo um RNA policistrônico (HERSCHHORN & HIZI, 2010; LI et al., 2015). O vírus, portanto, apresenta em seu genoma três genes estruturais (*Gag*, *Pol* e *Env*), dois genes regulatórios (*tat* e *rev*), e quatro acessórios (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* ou *vpx*) flanqueadas por regiões de longas repetições de terminal (LTR) que se localizam em cada extremidade do genoma conforme ilustrada na figura 1. A ORF *gag* é codificada em uma poliproteína *gag* sendo clivada pela protease viral dando origem proteínas estruturais funcionais tais como a proteína da matriz (p17), do capsídeo (p24), nucleocapsídeo (p7) e a proteína p6. A ORF *env* codificará o polipeptídeo gp160 cuja clivagem proteolítica originará estruturas presentes no envelope viral tais como a gp120 e gp41. A ORF *pol* gera um polipeptídeo *gag-pol* contendo a PR, TR e IN, fundamentais na replicação, maturação e infectividade dos vírions. As ORF's dos genes acessórios e regulatórios originarão proteínas fundamentais na patogênese da infecção pelo HIV-1 interagindo com várias proteínas humanas durante o ciclo replicativo viral (LI et al., 2015; WATTS et al., 2009). O resumo das informações estruturais do HIV pode ser visto na figura 3 e 4.

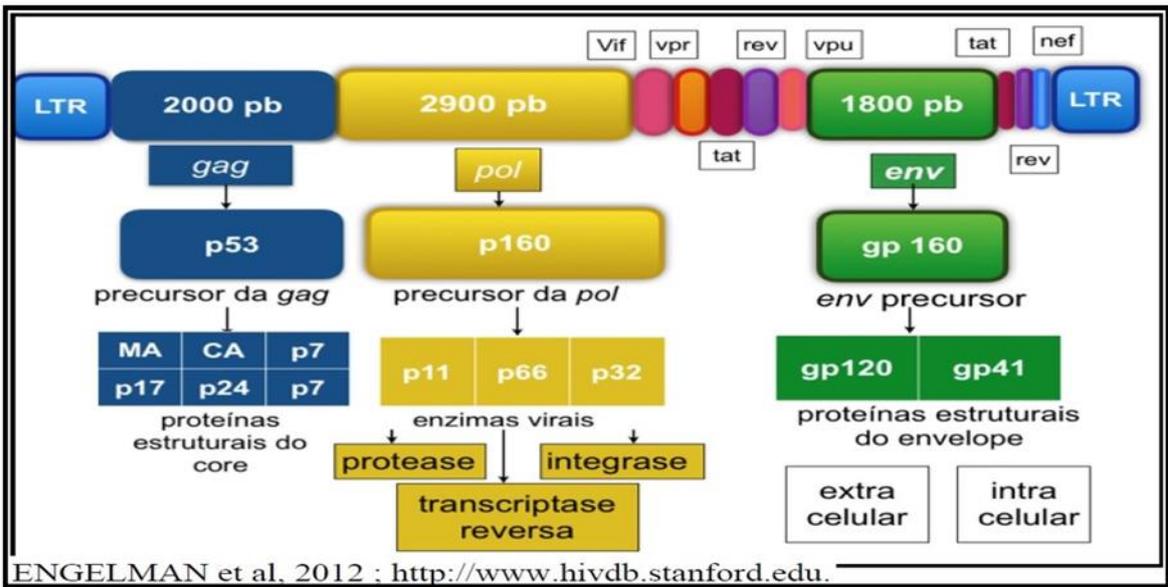


Figura 3 - Estrutura genômica do HIV-1. Adaptado de ENGELMAN et al., 2012.

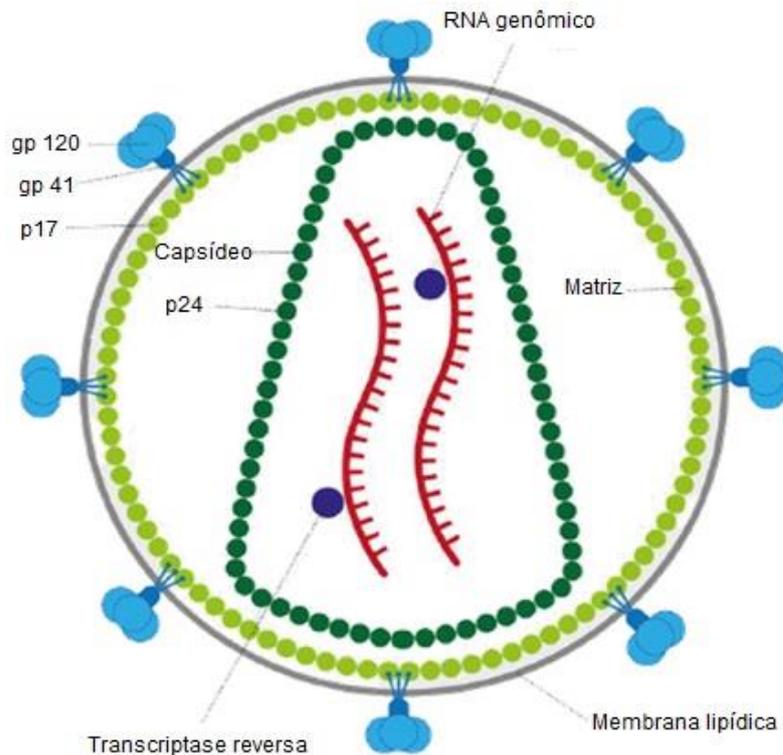


Figura 4 - Resumo estrutural esquemático do HIV. Adaptado de BECERRA et al., 2016.

1.5 Ciclo replicativo do HIV

A manutenção de cópias virais é fundamental na garantia do sucesso da infecção e perpetuação do material genético viral, para isso os vírus utilizam o maquinário celular do hospedeiro e através do êxito desta manipulação conseguem a perpetuação do seu código genético, a esse processo de realização de novas cópias virais dá-se o nome de ciclo replicativo cujo esquema encontra-se representado na figura 5.

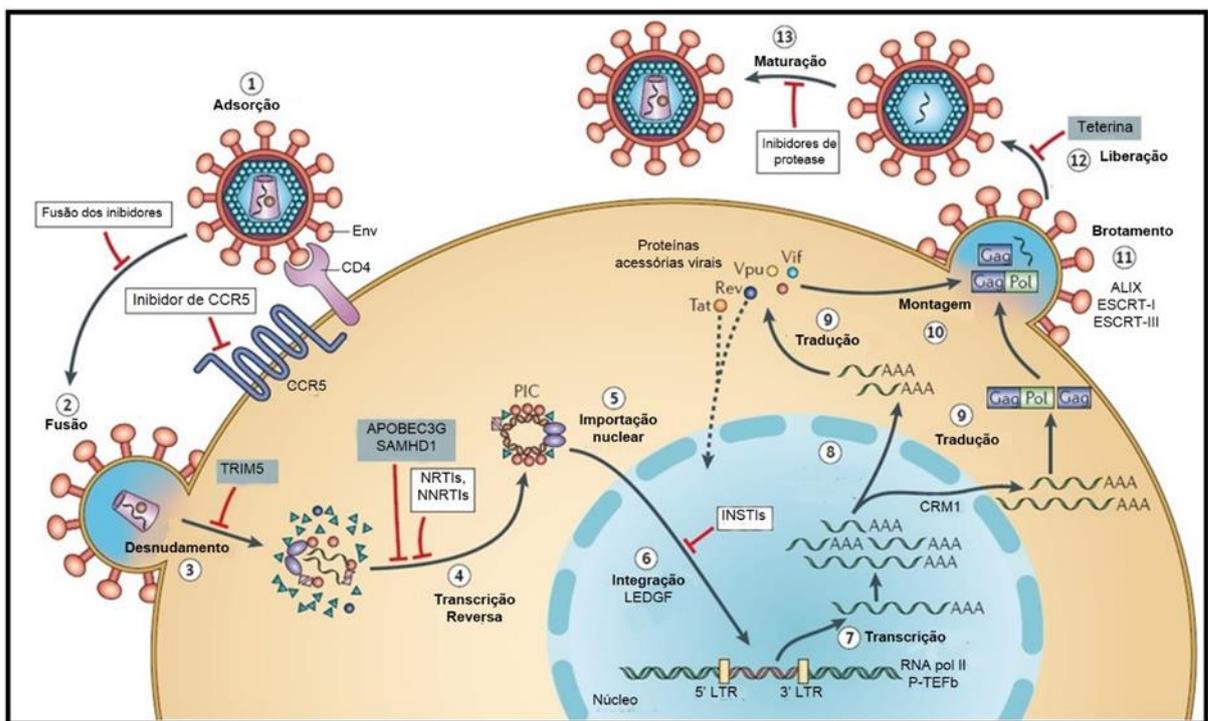


Figura 5 - Ciclo replicativo do HIV. Adaptado de ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012.

O ciclo replicativo do HIV brevemente inicia-se com a etapa da adsorção onde o vírus através de suas glicoproteínas ancoradas no envelope (espículas) interage com moléculas específicas da célula hospedeira em uma espécie de interação chave-fechadura, embora ligações químicas de natureza não fundamentais (interação com grupos de açúcar, domínios do tipo lectina, heparan sulfato, galactoceramida, integrina $\alpha 4\beta 7$ e moléculas de adesão não integrinas como DC *sign*) ocorram durante essa etapa, e apesar de não serem necessárias, a natureza dessas ligações auxiliam na eficiência da entrada do vírus (TARDIF & TREMBLAY, 2003), outras proteínas da célula do hospedeiro incorporadas no envelope também auxiliam a adesão viral, como

a ICAM-1 (molécula de adesão). O receptor primário fundamental na célula do hospedeiro capaz de interagir com a gp120 viral é a molécula CD4 (*Cluster of differentiation 4*) e subsequentemente um co-receptor das famílias CC ou CXC de receptores de quimiocinas, sendo CCR5 e CXCR4 os mais importantes (DEJUCQ, 2000; SANTOS, 2010).

Quanto ao uso de receptores de quimiocina como co-receptores o HIV pode apresentar diferentes fenótipos. Sabe-se que o vírus transmitido apresenta o perfil chamado HIV-1 R5 (R5), chamado de macrófagos trópicos ou M-trópicos, devido ao tropismo pelo CCR5 (expresso nas células de superfície mucosa). Todavia durante o desenvolvimento da patogênese o vírus sofre mutação no segmento genômico do envelope e passa a apresentar um fenótipo mais tardio correspondente ao HIV-1 X4 (X4), chamado de T-trópicos, com tropismo para o CXCR4. Algumas cepas virais podem apresentar o fenótipo HIV-1 R5X4 (R5X4) por apresentar tropismo para ambos os receptores de quimiocina. O mecanismo da troca do fenótipo viral ainda não é completamente compreendido, todavia é de conhecimento científico que o HIV-1 R5 é o vírus transmissor e apresenta uma maior resistência a ação imunológica inata via interferons do tipo I (*IFN- α resistance*). Indivíduos que apresentam deleção homozigótica do CCR5 (CCR5- Δ 32) são praticamente protegidos da infecção pelo HIV (BELL & NOURSADEGHI, 2017; DEEKS et al., 2015; MARMOR et al., 2006).

O CD4 é uma glicoproteína de membrana da superfamília das imunoglobulinas e é expressa na superfície de algumas células como linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas e micróglia (GRAF, 2011; MAARTENS et al., 2014), estas células representam o perfil de tropismo celular do HIV, além destas células sabe-se que o HIV-1 é capaz de infectar células como os astrócitos (macroglia) e células do epitélio renal, a expressão subsequente de seus genes nessas células apresentam papel importante na patogênese de desordens neurocognitivas associado ao HIV e nefropatias, esse tipo de infecção pelo HIV é conhecida como independente de CD4 (*CD4-independent HIV infection*) (MAARTENS et al., 2014).

A interação entre a gp120 com o CD4 promove uma mudança conformacional na gp120, que causa sua ligação secundária aos co-receptores de quimiocinas, essa ligação aos co-receptores promove uma mudança conformacional na gp41 que passa a expor as regiões hidrofóbicas que compõem o peptídeo de fusão levando a formação

de uma estrutura feixe de seis α -hélices (6HB) cuja função é promover a aproximação e consequente fusão de membranas para posterior liberação do capsídeo viral no interior do citoplasma por intermédio de microtúbulos da célula hospedeira, uma vez no citoplasma o capsídeo passa a se desestruturar lentamente expondo seu conteúdo no interior da célula encerrando a primeira etapa do ciclo replicativo (GACH et al., 2011; MELIKYAN, 2008).

A etapa seguinte ocorre no citoplasma e é caracterizada como transcrição reversa através da transcriptase reversa (polimerase de ácido desoxirribonucleico (DNA) RNA-dependente - TR). A TR é uma enzima já presente e funcional no vírion e necessária para iniciar seu ciclo replicativo. A TR apresenta três atividades bioquímicas distintas e sequenciais; atividade polimerase formando um DNA complementar (DNAC), atividade de degradação de RNA quando se encontra de forma híbrida com o DNAC conhecida como atividade RNase H e por fim atividade de síntese da fita positiva de DNA utilizando o DNAC (GILBOA et al., 1979; MENÉNDEZ-ARIAS & BERKHOUT, 2008; WARD, 1995).

A TR é um heterodímero formada por duas subunidades protéicas; a maior é a subunidade de 66kDa (p66) composta por 560 aminoácidos, é responsável pela atividade de transcrição reversa, RNase H e DNA polimerase, o domínio da polimerase assemelha-se a uma mão direita possibilitando a subdivisão do domínio da polimerase em subdomínios, palma (aa 86-117; 156-237), dedos (aa 1-85; 118-155), polegar (aa 238-318) e conector (aa 319-426) ; uma outra subunidade seria composta da proteína p51 (51kDa) que contém os primeiros 440 aminoácidos da p66 e apresenta atividade de polimerase. O subdomínio da palma da subunidade p66 contém o sítio ativo da enzima e junto com os subdomínios dedos e polegar forma a fenda catalítica na qual se ligam o molde mais o iniciador (RNAg:RNA^{t_{Lis}}). O sítio ativo da TR é composto pelos resíduos dos aminoácidos (aa) tirosina 183, metionina 184 e ácido aspártico 185 e 186 (BARRÉ-SINOUSSE, 1996; JACOBO-MOLINA et al., 1993).

Apesar do HIV-1 ser um vírus RNA de senso positivo ele não é infectivo ao chegar no citoplasma, ou seja, o RNA viral não é imediatamente traduzido por isso necessita ser transcrito em DNA pela TR. A transcriptase reversa inicia sua função ao polimerizar uma fita simples de DNA a partir do RNA viral, o resultado é uma estrutura híbrida DNA-RNA. Para iniciar essa atividade a enzima forma um complexo com um

tRNA_{3Lys} (que se encontra inicialmente ligada à extremidade 5' do RNA genômico) que consiste em um RNA transportador que servirá de iniciador (*primer*) da reação da polimerase, a região de início da polimerase é conhecida como sítio de ligação do *primer* (PBS) (ISEL et al., 1996). Uma vez formado o material genético híbrido viral a TR inicia sua atividade de RNase H, degradando todo o RNA viral com exceção de regiões ricas em purina (*ppt*) que servirá de PBS para atividade polimerase da segunda fita de DNA, formando assim, a partir de uma fita simples de RNA, um DNA dupla fita (DNA_{DS}). Esse DNA_{DS} será integrado em um próximo passo no genoma humano (HU & HUGHES, 2012).

A integrase (IN) é uma enzima importante no ciclo replicativo e têm como principal função integrar o DNA_{DS} recém-formado e circular ao genoma humano. Uma vez integrada no genoma do hospedeiro o DNA_{DS} recebe o nome de provírus ou estrutura proviral. A IN contém 3 domínios: o domínio aminoterminal (1-50 aa), onde se encontram dois resíduos de histidina e dois de cisteína que promovem a ligação com o zinco, importante para sua atividade. Além do domínio aminoterminal a IN apresenta um domínio “cerne” (aa 50-512) que consiste de sítios catalíticos para a endonuclease e a polinucleotidil transferase, além da tríade ácido aspártico 64, ácido aspártico 116 e glutamina 52, onde se ligará íons manganês ou magnésio, chamada de “motriz DDE” e por fim a IN apresenta um domínio carboxiterminal (aa 213-288) contendo aminoácidos básicos e liga-se ao DNA (ADESOKAN et al., 2004; THOMAS & BRADY, 1997; YOUNG, 2001).

O DNA_{DS} interage com proteínas virais e celulares formando um complexo pré-integração (CPI), uma das proteínas que compõe o CPI é a integrase, fundamental para integração genômica. O CPI transloca-se em direção ao núcleo da célula hospedeira, interage com as porinas nucleares e conseqüentemente transloca esse DNA_{DS} para o interior do núcleo onde será subseqüentemente inserido no genoma humano (POPOV et al., 1998). Uma vez inserido o provírus funcionará como qualquer outro gene celular, sendo assim esta estrutura viral servirá de molde para síntese de RNA viral através da RNA polimerase II celular, a regulação da síntese do RNA viral é feita por regiões que flanqueiam o genoma viral conhecida como LTR (Repetições terminais longas, do inglês *long terminal repeats*), essas estruturas são produzidas durante o processo de transcrição reversa, o LTR da extremidade 5' do provírus serve como um promotor da transcrição do genoma viral, enquanto que o LTR da

extremidade 3' auxilia a poliadenilação do RNA viral transcrito. Para que o vírus tenha sucesso em se replicar é necessário a integração genômica e isso pode ser feito em praticamente qualquer região do genoma humano, todavia estudos propõem padrões de possíveis locais preferenciais de integração para desenvolvimento de terapia gênica. Nota-se que regiões ricas em G/C (Guanina e Citosina), assim como locais de alta densidade gênica e sítios de maior atividade de DNase representam os locais de integração de preferência do vírus (BERRY et al., 2006; WANG et al., 2007).

A próxima etapa do ciclo é a transcrição do genoma proviral, já integrado ao genoma do hospedeiro, para síntese de mais vírions. A transcrição viral é dividida em duas etapas, a fase inicial ou precoce e a fase tardia. Durante a fase inicial temos as primeiras sínteses transcricionais. As regiões genômicas contendo os LTR apresentam sequencias promotoras que sinalizam para o início da transcrição do DNA viral, como TATA box e regiões ricas em GC, além de sequencias potencializadoras (*enhancers*) e sinais negativos de transcrição. O vírus utiliza-se da enzima RNA polimerase II do hospedeiro para transcrição do DNA proviral e diversos outros fatores celulares como coativadores. O próprio HIV contém um ativador transcricional importante conhecida como proteína tat (*transactivator protein*) que juntamente com o complexo celular P-TEFb (composto pela ciclina T1 e sua cinase associada CDK9) atua aumentando a taxa de extensão da RNA polimerase II por hiperfosforilação da região carboxiterminal. A interrupção da transcrição é resultado do recrutamento de fatores celulares negativos de alongamento como DSIF [5,6-dicloro-1-β-D-ribofuranosilbenzimidazol (*DRB sensitivity inducing factors*)] e NELF (*negative elongation factor*) (revisado por KILARESKI et al., 2009).

Durante a fase transcricional a RNA polimerase II irá transcrever o genoma proviral em RNAm viral e no caso do HIV é modificado para receber, ainda no núcleo, o *cap* de 7-monometil-guanosina na extremidade 5' e uma cauda poliadenilada (poli-A) na extremidade 3', tais modificações são fundamentais pois permitem que o RNAm viral seja reconhecido, como um RNAm da célula eucariótica, pela maquinaria ribossômica do hospedeiro. O RNAm viral completo será traduzido levando a síntese das poliproteínas estruturais Gag e várias enzimas virais, além de RNAg (genômico) para constituir o RNA de novas partículas virais. Todavia na fase inicial o RNAm viral completo será totalmente processado em um fenômeno conhecido como *splicing*, isto é realizado por enzimas celulares levando a formação de diversos transcritos

diferentes que servirão de molde para síntese de proteínas regulatórias da transcrição viral tat, rev e uma proteína acessória nef, essas proteínas são expressas somente no início da fase transcricional enquanto as demais proteínas acessórias são sintetizadas na fase tardia assim como as proteínas estruturais (KILARESKI et al., 2009).

A proteína tat depois de traduzida volta para o núcleo aumentando a taxa transcricional da RNA polimerase II a partir do LTR (KILARESKI et al., 2009). A proteína rev (*regulator of expression of viral proteins*) apresenta capacidade de translocar-se entre os compartimentos citosólico e nuclear transportando àqueles RNAm virais que contém a região conhecida como RRE (*rev responsive element*) para posterior exportação citosólica. Os RNAm que contém RRE são os RNAm completos (sem sofrer *splicing*) e RNAm parcialmente processados (que sofreram menos de 4 eventos de corte de íntrons e junção de éxons), esses últimos transcritos quando traduzidos produzirão as demais proteínas acessórias vif, vpr, vpu (ou vpx no HIV-2), assim como a poliglicoproteína 160 (Env) que após clivagem enzimática originará a gp120 e gp41. É devido a ação da proteína viral rev que é possível garantir uma exportação citosólico rápido o suficiente para evitar o *splicing* e isso levará a expressão das proteínas estruturais (clivagem de poliproteínas precursoras) e acessórias (vif, vpr, vpu ou vpx) (proteínas de fase tardia), marcando o início da fase tardia da transcrição viral (FERNANDES et al., 2012; KNIPE et al., 2001; SHERPA et al., 2015).

A fase tardia é a etapa do ciclo de replicação do HIV que compreende a síntese das proteínas acessórias e estruturais assim como também as etapas finais do ciclo replicativo de automontagem envolvendo as proteínas estruturais, envolve o brotamento das partículas virais, além do processamento e maturação (por ação da protease viral) destas partículas que passam a se tornar vírions. A montagem assim como o brotamento e início da maturação viral ocorrem na proximidade da membrana plasmática, todavia a maturação viral tem seu término somente após saída da célula hospedeira (SUNDQUIST & KRÄUSSLICH, 2012).

A montagem inicia-se após a transcrição de RNAm característicos da fase tardia que aparece no final da fase inicial e se constituem de RNAm completos ou minimamente processados. Este RNAm viral completo servirá de molde para síntese das poliproteínas precursoras posteriormente clivadas (poliproteína Gag (p55) e Gag-

Pol (p160), poliglicoproteína gp160) e proteínas acessórias virais, além de RNAg (genômico) para constituir o RNA de novas partículas virais. A montagem tem seu início na clivagem das poliproteínas pela protease viral que é liberada em um processo de autocatálise da Gag-Pol (TANG et al., 2008).

A clivagem de Gag e Gag-Pol é realizada pela protease viral durante o amadurecimento. A poliproteína Gag (p55) quando clivada liberará as proteínas da matriz (MA), capsídeo (CA), peptídeos espaçadores (SP1 e SP2), nucleocapsídeo (NC) e peptídeo p6 (importante para rompimento do HIV da célula hospedeira). A poliproteína Gag-Pol (p160) quando clivada dará origem as mesmas proteínas vistas na poliproteína p55 acrescido das enzimas integrase (IN), transcriptase reversa (TR) e protease (PR) (FANALES-BELASIO et al., 2010). A poliglicoproteína gp160 é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER) onde será glicosilada e inserida no lúmen do retículo endoplasmático (RE) e transportada para o complexo de Golgi local onde ocorrerá a clivagem por uma enzima celular furina-*like* gerando a gp120 e a gp41 que são transportadas para a membrana celular do hospedeiro onde se encontram as demais partículas virais (HALLENBERGER et al., 1992). Na fase tardia ainda temos RNAm parcialmente processados que originam proteínas acessórias e regulatórias que afetam a replicação do HIV de diferentes formas, garantindo a 'segurança' de seu ciclo. O RNAm completo que dá origem a Gag e Gag-Pol também é o próprio genoma viral, no caso do HIV duas fitas do RNAm de 9kb se unem na extremidade 5', constituindo um dímero de RNAg viral, o RNAm que dá origem a gp160 é um RNA subgenômico parcialmente processado (*mono splicing*) (KNIPE et al., 2001). É importante lembrar que todo processo de maturação, apesar de iniciar antes do brotamento, deverá ser concluído imediatamente após a saída da partícula viral da célula hospedeira (KNIPE et al., 2001; SUNDQUIST & KRÄUSSLICH, 2012).

O acúmulo de partículas virais sendo montadas na região em proximidade com a membrana plasmática provoca uma deformação na mesma que marcará o início do processo de brotamento viral consequente da interação de partículas virais como a vpu e componentes celulares da maquinaria secretória. A vpu forma canais iônicos na membrana do hospedeiro mediando a saída do HIV (DAMME et al., 2008). Ao sair, o vírus leva consigo uma porção da membrana plasmática da célula hospedeira contendo as glicoproteínas de seu novo envelope (gp120 e gp41) (LAZZAROTTO et al., 2010).

O resultado do amadurecimento é a formação do vírion, partícula viral completa. O principal constituinte do HIV é o Gag que corresponde a aproximadamente a 50% da massa viral, o envelope corresponde a aproximadamente a 30% de sua massa, outras proteínas virais e celulares correspondem a aproximadamente a 20% e 2.5% correspondendo ao RNA genômico e outros RNAs como por exemplo o RNAt que apresenta função de *primer* para ação da TR na etapa de transcrição reversa. O vírion apresenta 2 cópias de RNA genômico senso positivo (diploide), RNAt como *primer*, proteínas do envelope, poliproteína Gag, integrase, protease e transcriptase reversa (SUNDQUIST & KRÄUSSLICH, 2012).

1.6 Patogênese

O alvo primário do HIV são os linfócitos T CD4⁺ (LT CD4⁺) e a infecção dessas células e sua profunda depleção é o efeito mais marcante da infecção. O CD4 é expresso na superfície de linfócitos T, monócitos, macrófagos e células dendríticas. Além do CD4 é fundamental a presença de um co-receptor para o vírus, que são receptores de quimiocina para adsorção e penetração e conseqüentemente estabelecimento da infecção, são eles; CCR5, CXCR4. O CCR5 é expresso em níveis elevados nos linfócitos T de memória mas não em linfócitos T virgens, enquanto que o CXCR4 é expresso em ambos. O CCR5 também encontra-se presente em macrófagos e células dendríticas. O alvo preferido do HIV são os linfócitos T ativados (BELL & NOURSADEGHI, 2017; DEEKS et al., 2015; ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012).

O HIV-1 transmitido e presente no início da infecção é conhecido como fenótipo HIV-1 R5 ou HIV M-trópico, uma vez que o CCR5 está presente em células mieloides, células T periféricas e subgrupos de células T *helper*, por sua vez o HIV-1 com afinidade pelo co-receptor CXCR4 é denominado como HIV-1 X4 ou HIV T-trópico e representa um fenótipo mais tardio aparecendo em fases mais avançadas da doença (embora ocasionalmente possa estar envolvido em fases iniciais), o CXCR4 se encontra presente primariamente em células T (TERRASSE et al., 2017).

A porta de entrada para início da infecção é a superfície mucosa, a maioria das infecções acontecem nesta via e a principal forma de transmissão de mucosas ocorre via sexual. Estudos em patogênese são feitos principalmente em primatas não humanos infectados pelo SIV e em indivíduos humanos conhecidos como controladores de elite (CE). Estudos mostram que o SIV é capaz de atravessar a barreira de mucosa e estabelecer infecção dentro de 60 minutos, isso pode ocorrer mesmo com a mucosa íntegra via células dendríticas conhecidas como células de Langerhans (LCs), ainda que estas (LCs) não expressem $CD4^+$ ou CCR5 todavia elas apresentam fatores de adesão viral como CD1a e um grande número de receptores lectina tipo C dependentes de manose (*mannose-dependent C-type lectin receptors - MLCRs*). Uma vez “capturado” o destino são os LT $CD4^+$ localizados principalmente, levando em consideração o sítio anatômico vaginal, nas camadas mais basais do tecido escamoso. A esse processo de infecção via célula dendrítica dar-se o nome de transinfecção de linfócitos T (Figura 6) (WILEN et al., 2012; XU et al., 2013).

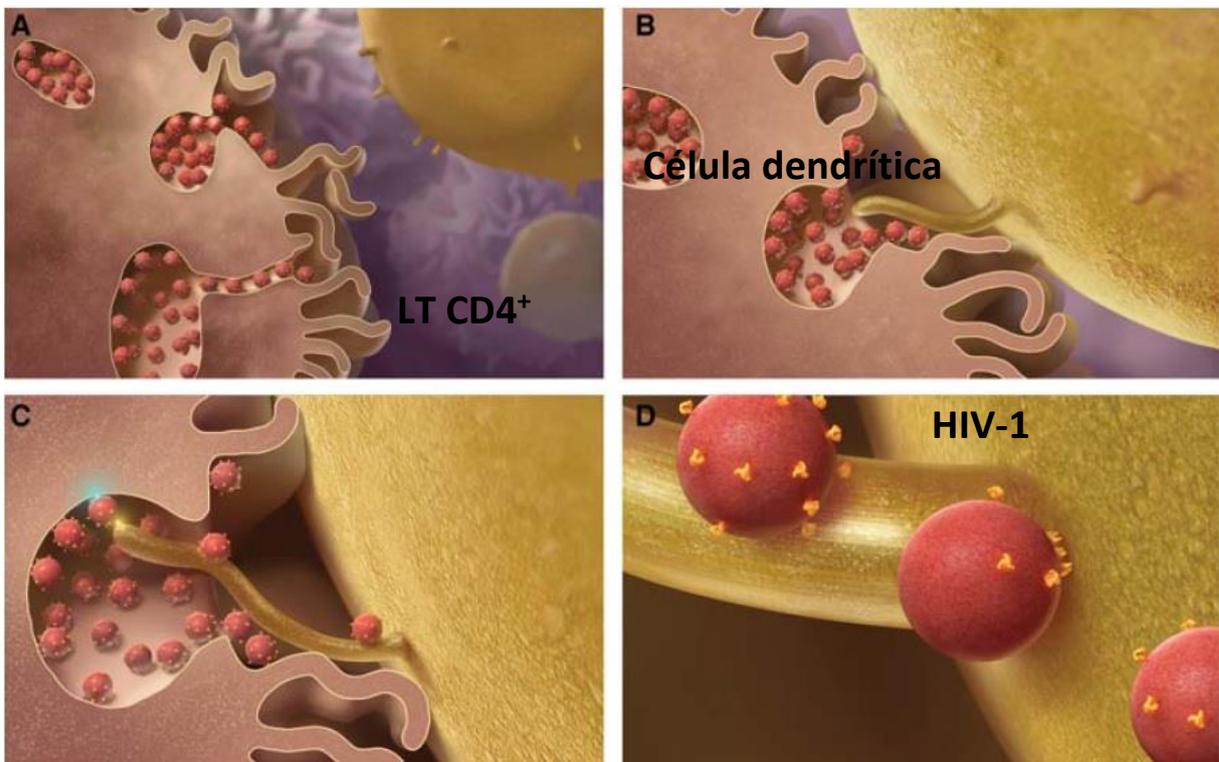


Figura 6 Modelo de transinfecção de linfócitos T $CD4^+$ mediada por células dendríticas. Adaptado de WILEN et al., 2012

Após infecção dos LT CD4⁺, o vírus passa a ser replicado em grande quantidade nos linfonodos caindo na corrente sanguínea e então disseminando para os demais órgãos do corpo e tecidos linfoides em poucos dias após infecção, sendo estes os principais sítios acometidos e responsáveis pela manutenção da replicação viral e disseminação do vírus no hospedeiro. Os linfonodos são considerados “santuários de replicação” devido a grande oferta de células alvo para o HIV (transmissão *cell-cell*) e por ser um compartimento biológico de maior dificuldade para difusão dos antirretrovirais (BELL & NOURSADEGHI, 2017; DEEKS et al., 2015).

Além disso, todos os pacientes, tratados ou não, apresentam, mais cedo (ainda em estágios iniciais de infecção) ou mais tarde, danos histológicos nestas estruturas por fibrose. Ao longo do tempo da patogênese viral, os danos histológicos acumulados inutilizam os linfonodos para realização do seu exercício fisiológico de combate a infecções por consequência de uma gradativa perda de linfócitos T CD4⁺ virgens (*LT CD4⁺ naive*). O mecanismo de dano por deposição de colágeno ocorre por resposta das células T regulatórias (LTreg) a intensa e persistente ativação nos linfonodos tendo a presença do HIV como causa, o aumento de produção de procolágeno ocorre via fator de crescimento β (*transforming growth factor- β / TGF- β 1*) em fibroblastos dos tecidos linfoides levando ao acúmulo de componentes fibrilares que por sua vez inviabilizará o acesso dos LT CD4⁺ a fatores de sobrevivência como IL-7 produzido na rede de células reticulares fibroblásticas levando assim a ativação de mecanismos de apoptose com depleção das células T. Tal dano inicia-se aos poucos desde o estágio inicial da infecção onde histologicamente observa-se uma hiperplasia folicular que involui gradativamente. Dessa forma o dano histológico por fibrose, resultado da ativação imunológica contínua, juntamente com o próprio dano citopático viral assim como mecanismos indiretos como indução da apoptose que acompanha a ativação imune crônica persistente associado as infecções por HIV-1 e SIV representam alguns dos meios pelos quais ocorre uma depleção gradativa da atividade imunológica e perda da funcionalidade das células imunológicas que poderá levar a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (ESTES et al., 2007; ZENG et al., 2011).

Após contato com o HIV e o estabelecimento da infecção o hospedeiro entra em uma fase de incubação que compreende o período até duas semanas do contato inicial. Durante esta fase o vírus inicia a sua replicação e começa a se expandir do sítio inicial de infecção para vários tecidos e órgãos que poderão servir de sítios

replicativo. Nesta fase não é possível detecção da viremia assim como não é possível avaliar qualquer resposta imunológica contra o HIV, sinais e sintomas. Entre a segunda e a quarta semanas o hospedeiro entra na fase aguda da infecção, onde a maior parte dos indivíduos apresentará alguma forma de manifestação clínica e todos, com exceção dos controladores de elite, apresentarão elevada viremia (BECERRA et al., 2016; COFFIN & SWANSTROM, 2013).

Durante a fase aguda atinge-se um pico do RNA viral no sangue do hospedeiro da ordem de 10^7 cópias por mililitro de sangue, que coincide com os sinais e sintomas anteriormente descritos. Existe uma forte e estabelecida correlação de que o risco de transmissão na fase aguda é elevado e preocupante (COHEN, 2007), e uma vez que as manifestações clínicas do HIV são inespecíficas sempre existirá o risco da negligência. Estudos em casais heterossexuais apontam que o risco de infecção mais que triplica quando a carga viral atinge patamares entre $2.6 - 3.5 \log_{10}$ cópias a $3.6 - 4.0 \log_{10}$ cópias do RNA viral, o risco praticamente dobra novamente entre $3.6 - 4.0 \log_{10}$ e concentrações maiores que $4.6 \log_{10}$ cópias de RNA viral (QUINN et al., 2000). A severidade dos sintomas está relacionada ao pico da viremia na fase aguda, que poderia ser usado como um parâmetro preditivo de evolução para AIDS. Um dos marcadores utilizados é o de morte programada 1 (*Programmed death 1 / PD-1*), níveis elevados deste marcador sinalizam uma subpopulação de LT CD8⁺ disfuncionais para o HIV com capacidade reduzida de produção de citocinas e de proliferação (DAY et al., 2006; TRAUTMANN et al., 2006).

A fase crônica ou fase de latência clínica é um período longo que pode se estender entre 1 à 20 anos ou mais e inicia após um decaimento em até 100 vezes da carga viral da fase aguda por ação do sistema imune via linfócitos T CD8 citotóxicos específicos para o HIV (CTLs), porém assim como a resposta inata a resposta imunológica adaptativa (humoral e celular) não conseguirá impedir o avanço da infecção nos indivíduos não tratados. O decaimento produz um platô conhecido como '*viral set point*'. Indivíduos progressores rápidos da doença apresentam um elevado pico de viremia na fase aguda e um alto *viral set point* na fase crônica, sendo esta condição determinado tanto por características do hospedeiro como do vírus. Estudos mostram, a partir da abordagem filogenética comparativa, que mais da metade das variações no *viral set point* são atribuídas ao genótipo viral e, portanto, pode ser herdada na cadeia de transmissão (ALIZON et al., 2010; FRASER et al., 2014). Alguns

poucos indivíduos conseguem manter um baixo *viral set point* mesmo na ausência de fármacos antirretrovirais, podendo chegar a ser indetectável por metodologias moleculares. A esses dá-se o nome de controladores virêmicos, que juntamente com os controladores de elite (carga viral indetectável) formam o grupo de controladores do HIV e são de grande interesse para comunidade científica. Durante esta fase os indivíduos encontram-se assintomáticos. Com o passar do tempo de infecção, o decaimento progressivo dos LT CD4⁺ e com o aumento da disfuncionalidade do sistema imunológico, a carga viral irá lentamente aumentar e isso poderá se agravar desencadeando uma profunda imunodeficiência de elevado índice de mortalidade (DEEKS et al., 2015).

A característica marcante da infecção pelo HIV é a depleção dos LT CD4⁺ e isso ocorre por diversos mecanismos sendo isto ainda motivo de muita investigação. Alguns mecanismos são; efeitos citopáticos do próprio vírus, todavia esse efeito sozinho é incapaz de justificar a depleção global destas células, em especial na infecção crônica, produtos transcritos reversos incompletos e proteínas inflamatórias do próprio HIV são liberados no sangue provocando uma intensa resposta inflamatória com mortes de células não infectadas (DOITSH & GREENE, 2016), além disso o HIV afeta a capacidade de renovação dos LT CD4⁺ por intermédio de danos no arcabouço histológico dos linfonodos (ZENG et al., 2011), em células tronco, por estimulação excessiva do sistema imunológico provocado pelo vírus que acelera o processo de depleção destas células. Quando a diminuição dos LT CD4⁺ atinge um patamar entre 350 – 200 ou <200 células por mililitro cúbico de sangue, o indivíduo entra na fase AIDS e sua homeostasia passa a ser constantemente perturbada por diversos patógenos oportunistas, além de reativar infecções latentes adquiridas durante a vida.

1.7 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da infecção por HIV, assim como em muitas outras infecções virais são, via de regra, inespecíficas e por isso podem ser negligenciadas e os pacientes não corretamente diagnosticados. Durante a fase aguda da infecção (duas – quatro semanas após infecção) as manifestações clínicas são descritas como *flulike* ou *mononucleoselike* (como um quadro gripal ou quadro semelhante àquele visto na mononucleose infecciosa, respectivamente), são autolimitadas (tendendo a desaparecerem após duas – três semanas de início do quadro sintomático) e ocorrem devido a massiva liberação de citocinas (*cytokine storm*). Essa liberação maciça não é regra e irá variar de indivíduo para outro à depender da intensidade da resposta imunológica, porém a maioria dos infectados (50-90%) apresentarão algum grau das manifestações clínicas que incluem febre, mialgia, artralgias, linfadenopatia, faringite, diarreia com perda de peso e *rash* cutâneo maculopapular, sudorese noturna, ulcerações orais, anais e/ou genitais (COFFIN & SWANSTROM, 2013; LIOVAT et al., 2012; PAIARDINI & MÜLLER-TRUTWIN, 2013; PINCUS et al., 2003).

Das manifestações clínicas citadas a mais frequente é a febre, podendo estar presente em até 90% dos casos, com uma média de 38.9°C (PINCUS et al., 2003).

A severidade das manifestações clínicas na fase aguda está correlacionada a rápida progressão da doença, com decréscimo de subpopulações linfocitárias T CD4⁺, elevação de ativação de linfócitos T CD8⁺ e elevação da carga viral. A carga viral juntamente com a contagem de linfócitos T CD4⁺ são os marcadores laboratoriais mais utilizados para acompanhamento da progressão da doença. Alguns estudos mostram que outros biomarcadores podem ser utilizados para evidenciar uma rápida progressão cuja relação seria compatível com a severidade das manifestações clínicas. Os pacientes que apresentam maior severidade das manifestações clínicas apresentam perfil inflamatório diferente e apresentam progressão rápida, um desses biomarcadores seria os níveis da proteína-10 induzida por interferon (IP-10) na fase aguda das manifestações clínicas. Esses pacientes progressores também apresentarão a elevação de outros marcadores de progressão como PD-1 (marcador de exaustão imunológica), CD57 (marcador de senescência imunológica), e seus linfócitos T CD8⁺ com frequência expressam marcadores de ativação como CD38 e

HLA-DR que se relacionam com a carga viral nesses pacientes (LIOVAT et al., 2012; PAIARDINI & MÜLLER-TRUTWIN, 2013).

Após a fase aguda o indivíduo infectado entra na fase de 'latência' (1-20 anos após infecção) ou fase assintomática, todavia apesar da sugestão que o nome nos leva a pensar o vírus continua a se replicar nos linfonodos, é um período longo de anos até culminar na fase de AIDS. Durante esta fase não ocorrem manifestações clínicas e o paciente não diagnosticado na fase inicial da infecção desconhece seu *status* de infecção e apresenta-se assintomático (COFFIN & SWANSTROM, 2013).

Após anos de infecção os indivíduos não tratados encaminharão para a fase de AIDS onde ocorrem extensas manifestações clínicas oriundas de infecções oportunistas ocasionadas pelo colapso imunológico provocado por anos de infecção ativa do HIV. A diarreia é uma característica marcante desta fase de transição assintomática-AIDS. O quadro inflamatório nessa fase cursa com manifestações neurológicas com perda de neurônios por apoptose, mostrando uma relação estreita entre AIDS e demência (*AIDS dementia complex - ADC*), estas manifestações clínicas neurológicas consistem na perda de memória, confusão mental, depressão, alteração da fala, visão e equilíbrio. Além das manifestações neurológicas, ocorrem outras manifestações clínicas oriundas de anos de inflamação de diferentes órgãos, gerando manifestações clínicas não infecciosas como é o caso da nefropatia e miocardiopatia. As manifestações clínicas clássicas da AIDS incluem também infecções oportunistas oriunda de fungos, protozoários, bactérias ou outros vírus, e neoplasias. As infecções oportunistas mais comuns na AIDS são; pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (outrota *P. carinii*), tuberculose atípica ou disseminada, toxoplasmose, candidíase oroesofágica, criptococose, citomegalovirose, histoplasmose e infecção por *Mycobacterium avium*. As neoplasias mais comuns são sarcoma de Kaposi, linfoma não Hodgkin (LNH), câncer de colo uterino, linfoma primário cerebral (LPC), neoplasia anal e câncer cervical invasivo. Na ausência da terapia antirretroviral a taxa de mortalidade da AIDS está acima de 95% (SAKSENA et al., 2010).

1.8 Terapia antirretroviral

O isolamento do HIV em 1983 foi o ponto inicial para a busca de fármacos que proporcionassem a cura ou controle da infecção. Apesar da escassez de conhecimento sobre a patogênese e a história da infecção pelo HIV durante a década de 80, o primeiro fármaco antirretroviral foi viabilizado ainda nessa década após um rápido processo, de responsabilidade da *Food and Drug Administration* (FDA/EUA), para disponibilizar seu uso. A Zidovudina ou azidotimidina (AZT) foi anunciada em 20 de março de 1987 e considerado um marco inicial da era dos antirretrovirais (ARVs). Antes dos ARVs o tratamento se limitava apenas as doenças oportunistas que acometiam os indivíduos com AIDS, uma vez que não havia tratamento específico para a infecção pelo HIV (ARTS & HAZUDA, 2012; PAU & GEORGE, 2014; STYRT et al., 1996).

Com uma maior elucidação do ciclo replicativo do HIV nos LT CD4⁺ foi possível o desenvolvimento de novos ARVs que possibilitavam limitar o ciclo replicativo viral no hospedeiro em uma determinada etapa. Com o surgimento de novos fármacos e novas combinações surge a terapia antirretroviral combinada (TARVc), substituindo a monoterapia (AZT) e terapia dupla inicial com a didanosina (AZT + ddI). Em 1996, com advento de mais ARVs e o surgimento da classe dos inibidores de protease caracteriza um grande avanço na terapêutica do HIV, um novo esquema conhecido como terapia antirretroviral altamente ativa (HAART - *Highly Active Antirretroviral Therapy*) (ARTS & HAZUDA, 2012). A partir da HAART, a infecção pelo HIV passa a ser considerada de caráter crônico e controlada. O esquema terapêutico foi considerado o primeiro a promover supressão da viremia a níveis indetectáveis, melhora na contagem de células CD4⁺ e um impacto positivo da sobrevida dos pacientes (JÚNIOR & ITSUKO, 2018; PAU & GEORGE, 2014). Ainda neste mesmo ano o Brasil através da Lei 9.313, de 13 de novembro de 1996, passa a disponibilizar de forma gratuita e universal a TARV (BRASIL, 1996). Nessa mesma época, o país já apresentava aproximadamente 23.661 casos de AIDS (BRASIL, 2017).

Os objetivos da TARV são: a) reduzir a carga viral a níveis indetectáveis; b) restaurar ou manter (evitar decaimento) a função imunológica mediada pelos LT CD4⁺; c) prolongar a sobrevida e oferecer qualidade de vida as pessoas vivendo com

HIV/AIDS (PVHA); d) redução da transmissibilidade do HIV. A TARV é vitalícia e nenhum esquema terapêutico, até os dias de hoje, é capaz de erradicar definitivamente o HIV do hospedeiro e o abandono ou má adesão da terapia levará rapidamente ao efeito rebote viral com potencial seleção de mutação de resistência com consequente decaimento dos LT CD4⁺ que poderá levar o indivíduo infectado ao estágio AIDS caso não ocorra o resgate terapêutico (DHHS, 2019).

Farmacologicamente a TARV pode ser dividida em seis classes: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNT) (impedimento da transcrição reversa do RNA genômico viral); inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) (impedimento da transcrição reversa do RNA genômico viral por inibição alostérica da TR); antagonista do correceptor CCR5 (adsorção e entrada); inibidor de fusão (fusão de membranas); inibidores da integrase (INI) (impede a inserção do cDNA ao genoma humano); inibidores da protease (IP) (impedimento da maturação viral) (BECERRA et al., 2016; NACHEGA et al., 2014). No Brasil, atualmente, existem 22 medicamentos ARVs, em 38 apresentações farmacêuticas (BRASIL, 2018a).

Estudos estão sendo desenvolvidos para mais uma possível nova classe de ARV, os inibidores da RNase H da TR, dentre as quatro atividades enzimáticas do HIV-1 (protease, TR polimerase, TR RNase H e integrase) somente a RNase H não possui ARVs específicos para atuação nesse sítio enzimático. Em estudos de avaliação esses inibidores mostraram-se específicos contra a TR do HIV-1, não atuando na RNase H2 humana nem na RNase do vetor utilizado nas pesquisas (*Escherichia coli* RNase HI) (BOYER et al., 2018). O surgimento de novas classes farmacológicas aumenta o repertório de opções para resgates terapêuticos em pacientes com vírus multiresistentes.

Um novo fármaco, aprovado em 2018 pela FDA nos EUA, será utilizado para tratamento da infecção pelo HIV-1 em pacientes multirresistentes a outros ARVs (FDA, 2018). O novo antirretroviral, Ibalizumab, pertence a classe dos inibidores de entrada, todavia se propõe não somente a interagir com o CCR5 (Maraviroc) mas também com a molécula CD4 por intermédio de anticorpos monoclonais (MAbs). O MAb é capaz de promover uma alteração conformacional no CD4 e impedir a entrada do vírus na célula hospedeira. Segundo estudo, a interação com o CD4 humano não

interfere no funcionamento normal da célula T nem em sua interação com o MHC de classe II. O novo inibidor de entrada apresenta-se como isento de toxicidade (IACOB & IACOB, 2017). A tabela 2 lista alguns exemplos de fármacos para cada classe.

Tabela 2 - Classe farmacológica, exemplos de fármacos e seu mecanismo de ação.

Classe farmacológica	ARV	Mecanismo de ação
<i>Inibidores da TR análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNt)</i>	<i>Abacavir (ABC); Didanosina (ddl); Lamivudina (3TC); Tenofovir (TDF); Zidovudina (AZT)</i>	<i>Os ARVs desta classe inibem a transcrição reversa por ação competitiva com os nucleosídeos naturais, promovendo o término precoce da síntese do DNA pró-viral.</i>
<i>Inibidores da TR não análogos de nucleosídeos (ITRNN)</i>	<i>Efavirenz (EFZ); Nevirapina (NVP); Etravirina (ETR)</i>	<i>Os ARVs desta classe inibem a síntese de DNA pró-viral por atuação direta na região hidrofóbica da TR, promovendo inibição alostérica de sua função</i>
<i>Inibidores da protease (IP)</i>	<i>Atazanavir (ATV); Darunavir (DRV); Fosamprenavir (FPV); Lopinavir (LPV); Nelfinavir (NFV); Ritonavir (RTV); Saquinavir (SQV); Tipranavir (TPV)</i>	<i>Os ARVs desta classe agem interagindo diretamente com o sítio catalítico da protease do HIV-1, impedindo a clivagem da poliproteína viral, interferindo na maturidade viral e infectividade</i>

<p><i>Inibidores da integrase (INI)</i></p>	<p><i>Dolutegravir (DTG); Raltegravir (RAL)</i></p>	<p><i>Os ARVs desta classe bloqueiam a enzima integrase catalisando formação de pontes covalentes entre o DNA do hospedeiro e o DNA viral, impedindo a integração do DNA viral ao cromossomo do hospedeiro.</i></p>
<p><i>Antagonista do correceptor CCR5; Antagonistas CD4 e gp120</i></p>	<p><i>Maraviroc (MRV) Ibalizumab</i></p>	<p><i>O Maraviroc liga-se seletivamente ao CCR5 bloqueando a interação da gp120 do HIV no CCR5 da membrana da célula hospedeira, impedindo a entrada do vírus. Utilizado somente após teste de tropismo viral.</i></p> <p><i>O Ibalizumab liga-se seletivamente ao CD4 da célula hospedeira promovendo alterações conformacionais.</i></p>
<p><i>Inibidor de fusão</i></p>	<p><i>Enfuvirtida (T20 ou ENF)</i></p>	<p><i>Este ARV mimetiza a fração HR1 (heptad-repeat) da gp41, ligando-se e ocupando espaço na fração HR2 que se fixa no envelope viral, bloqueando o</i></p>

		<i>mecanismo de 'zipagem' ou fusão de membranas.</i>
--	--	--

ALBUQUERQUE, 2016; PAU & GEORGE, 2014

O início do tratamento deverá ser feito da forma mais precoce possível segundo as diretrizes atuais da OMS, independentemente de parâmetros laboratoriais. O Brasil, desde dezembro de 2013, através de seu Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) recomenda o início precoce para todas as PVHA independentemente do seu estágio clínico e/ou imunológico ou idade, sendo as únicas recomendações observadas àquelas que dizem respeito ao esclarecimento e transparência onde o paciente deverá ser informando quanto aos benefícios e possíveis riscos da TARV. Além disso o indivíduo infectado deverá ser fortemente motivado e preparado para este tratamento devendo a sua autonomia ser sempre respeitada, não podendo, portanto, ocorrer qualquer tipo de coerção para início da TARV (BRASIL, 2018a). Os estudos START (DANEL et al., 2015), TEMPRANO (GEFFEN et al., 2015), CHER (VIOLARI et al., 2008) têm apresentado fortes evidências em demonstrar maiores benefícios na redução da morbimortalidade para pacientes cujo início do tratamento é realizado precocemente como a diminuição do risco de transmissão, redução de locais que serviriam como reservatórios latentes do HIV além da minimização do dano imunológico ocasionado pelo vírus.

No Brasil o Ministério da Saúde preconiza como terapia inicial para adultos a inclusão de combinações de três ARVs (dois ITRN/ITRNt com um ARV de outra classe (IRNN, IP ou INI)), sendo o esquema preferencial a lamivudina (3TC) e tenofovir (TDF) associado com o dolutegravir (DTG). Pacientes apresentando coinfeção TB-HIV e mulheres com possibilidade de engravidar ou gestantes assim como qualquer outra contraindicação devem ser avaliadas individualmente para mudança da escolha do fármaco no esquema preferencial (BRASIL, 2018a).

No caso das crianças e adolescentes o PCDT infantil preconiza também a utilização de três ARVs, sendo dois ITRN/ITRNt, mais um terceiro ARV, a depender da faixa etária ou qualquer possível outra contraindicação, de classe farmacológica diferente, IP, INI ou ITRNN. A genotipagem pré-tratamento é obrigatória para todas as crianças e adolescentes que iniciarão a TARV, além destes também são inclusas as

gestantes infectadas, pessoas que tenham se infectado com parceiro (atual ou pregresso) em uso de TARV (casais sorodiferentes) e indivíduos apresentando coinfeção TB-HIV (BRASIL, 2018b). Assim como nos adultos, as crianças devem iniciar o tratamento imediato assim que possível. As crianças apresentam evolução mais rápida quando não tratadas. Preferencialmente o tratamento deve iniciar com a maior contagem de LT CD4⁺ possível para maximizar os benefícios conforme apresentado por vários estudos onde fora evidenciado aumento da recuperação imunológica quando comparados à grupos de tratamento precoce versus àquelas crianças de início tardio com baixa contagem de LT CD4⁺ (PATEL et al., 2009; PUTHANAKIT & SIBERRY, 2013; SHIAU et al., 2013).

Segundo dados do relatório de monitoramento clínico do HIV de 2017, no ano de 2016 haviam aproximadamente 830 mil pessoas vivendo com HIV (PVHIV) no Brasil. O Brasil aderiu ao programa proposto pela UNAIDS (Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS), referente a meta 90-90-90 para 2020. Esta meta quando alcançada, a nível global, criará as condições necessárias para o fim da epidemia de AIDS até 2030. Quanto a esta meta, o Brasil encontra-se em 84-72-91, ou seja, estima-se que 84% das PVHIV no Brasil conhecem seu status e foram diagnosticadas, 72% estariam sob cobertura da TARV com 91% apresentando CV suprimida (indetectável). Na figura 7 é possível observar os avanços do país (BRASIL, 2017b; UNAIDS, 2018c).

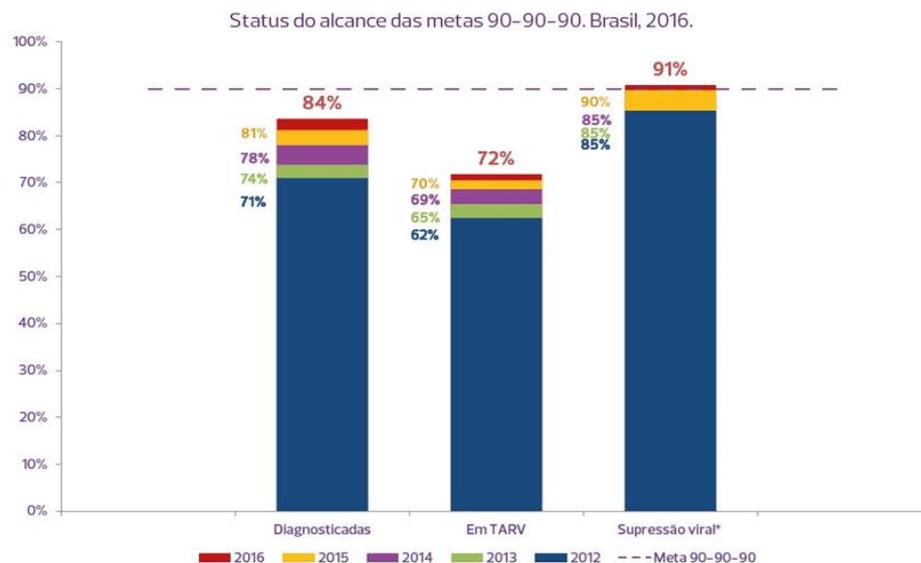


Figura 7 - Meta 90-90-90. Brasil, 2016 (Fonte: MS/SVS/DIAHV).

1.9 Marcadores genéticos de resistência aos ARVs

Com o avanço da terapia farmacológica dos ARVs a supressão virológica tornou-se possível mesmo em pacientes apresentando histórico de falha terapêutica a vários esquemas de ARVs. Todavia, a aquisição e a transmissão de resistência do HIV às drogas têm sido, insistentemente, dois grandes obstáculos para o sucesso da terapia e a tão almejada supressão virológica (TANG; SHAFER, 2012). Os indivíduos que se infectam com cepas virais resistentes (Resistência Transmitida – RT) apresentam menos opções de tratamento e maiores riscos de mortalidade e morbidade. O rastreamento molecular epidemiológico de linhagens resistentes aos ARVs é de suma importância para um tratamento mais específico no qual proporcione supressão virológica, menor risco de transmissão e qualidade de vida para as PVHA, para isso é preciso conhecer os marcadores genéticos de resistência (PALELLA et al., 2009).

1.9.1 *Testes de Resistência e Fatores Biológicos para Resistência aos Antirretrovirais*

Os testes realizados para avaliação da resistência são os procedimentos de genotipagem e fenotipagem sendo o primeiro mais utilizado na prática. Os testes de resistência fenotípica evidenciam o “comportamento” do vírus em meio a cultura na presença do fármaco ARV onde é verificado a concentração inibitória (CI) para inibição do HIV *in vitro* verificando assim a susceptibilidade frente ao fármaco, enquanto que testes de resistência genotípica evidenciam a determinação de mutações diretamente no gene do HIV podendo prever as mudanças no fenótipo viral em relação a resistência aos ARVs (DIAZ, 2011). Os testes de fenotipagem viral são mais caros, mais demorados e tecnicamente complexos apesar da fácil interpretação e possibilidade de resultados quantitativos. Por sua vez os testes de genotipagem apresentam menor custo e tempo de execução, porém apresentam menor sensibilidade em variantes minoritárias do HIV (<20%) (RAMOS, 2016).

O Ministério da Saúde implementou no Brasil a Rede Nacional de Vigilância de Resistência aos Antirretrovirais que monitora os resultados obtidos dos exames de

genotipagem disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) em sua Rede Nacional de Genotipagem (Renageno). A genotipagem pode ser realizado antes e/ou durante a TARV. A genotipagem pré-tratamento é indicada para pessoas que tenham sido infectadas por parceiro (atual ou pregresso) em uso de TARV (casais sorodiferentes); gestantes infectadas pelo HIV; crianças infectadas pelo HIV; indivíduos com coinfeção TB-HIV. A genotipagem pós-tratamento somente é realizada após constatação de falha da supressão virológica a qual consiste em CV detectável (>500 cópias/mL) após seis meses do início ou modificação da TARV e nos indivíduos com CV detectável (>500 cópias/mL) em TARV que mantinham CV indetectável (BRASIL, 2018a).

O principal fator na variabilidade do HIV-1 é a capacidade do surgimento de subpopulações do vírus, relacionadas entre si, no mesmo indivíduo infectado, a isto dar-se o termo *quasispecies*. Modelos matemáticos têm mostrado que indivíduos não tratados são capazes de oferecer condições para replicação de 10^{10} vírions por dia, resultando em incontáveis variantes virais. *In vitro* o HIV-1 apresenta uma capacidade replicativa máxima de aproximadamente 180 gerações por ano, tal complexidade ainda é acrescida pela possibilidade do surgimento de vírus recombinantes, seja do mesmo subtipo ou subtipos diferentes. A diversidade genética do HIV-1 amplia a cada dia principalmente nos indivíduos fora da cobertura da TARV (WHITNEY et al., 2011).

Os motivos que levam a grande heterogeneidade da população viral se dão pelo fato do HIV-1 ser um vírus RNA com elevada taxa de mutação, aproximadamente 10^{-4} nucleotídeos por ciclo de replicação. As mutações podem ocorrer em três fases da replicação retroviral: (1) quando o RNAm é transcrito a partir do provírus pela polimerase II do RNA dependente de DNA do hospedeiro, (2) quando o genoma do RNA viral é transcrito de forma reversa pela transcriptase reversa (TR), ou (3) quando o provírus é copiado pela polimerase do DNA do hospedeiro juntamente com os demais genes da própria célula (expansão clonal em processo de mitose). A polimerase do hospedeiro não justificaria a grande diversidade genética viral uma vez que tal enzima apresenta maior fidelidade (com uma baixa taxa de 10^{-9} e 10^{-12} mutação/pb/por ciclo o que torna sua contribuição não tão importante) quando comparada a TR cuja habilidade de *proofreading* (atividade *exonuclease 3'-5'*) encontra-se ausente, além de outras características desta enzima que contribuem para o aparecimento de mutações mesmo quando comparada a outras TRs de outros

retrovírus, por isso, vários estudos apontam a baixa fidelidade da TR como principal fator do aparecimento de mutações ocorridas durante o ciclo do HIV-1 (ABRAM et al., 2010; WHITNEY et al., 2011).

As mutações de resistência podem ser classificadas como principais (ou primárias) ou acessórias. As mutações principais são aquelas que sozinhas são capazes de diminuir a suscetibilidade do vírus frente a um determinado ARV. As mutações acessórias são aquelas que sozinhas não são capazes, *per se*, de diminuir tal suscetibilidade frente a um ARV, porém, alteram o *fitness* viral, melhorando-o, e na presença da mutação principal irá promover um efeito aditivo na diminuição da suscetibilidade viral (ARTS & HAZUDA, 2012; CHANG & TORBETT, 2011; WENSING et al., 2014).

Entende-se por *fitness* viral a capacidade do HIV no meio ambiente e envolve vários aspectos como a capacidade de ser transmitido, capacidade de infectar novas células e capacidade replicativa. A princípio uma mutação primária tende a diminuir esse *fitness* viral, todavia com a possibilidade de mutações acessórias serem selecionadas com o tempo faz com que, gradativamente, a CV do vírus resistente seja novamente restabelecida e alcançando elevados patamares. Em condições naturais o vírus selvagem terá sempre melhor *fitness* quando comparado ao vírus mutante, isso pode ser facilmente observado quando ocorre a interrupção do tratamento em um paciente com falha terapêutica e vírus resistente, os vírus sensíveis reaparecem num período relativamente curto (8 a 12 semanas), porém como o *fitness* é um conceito relacionado ao meio ambiente, o vírus mutante será sempre aquele com melhor *fitness* na presença do ARV resistente, enquanto que os sensíveis serão eliminados (DIAZ, 2011).

A nomenclatura das mutações é feita identificando a troca do aminoácido, usando-se a letra correspondente, e utilizando número que identificam a posição do códon. A referência para determinações das mutações é o genoma de linhagens selvagens do vírus. Por exemplo, na mutação M184V (mutação primária selecionada pelo 3TC), ocorre, no códon 184, uma troca do aminoácido metionina-‘atg’ (M) do consenso sendo substituído pelo aminoácido valina-‘gtg’ (V). A mutação ocorre pela incorporação de apenas um nucleotídeo diferente nessa posição pela transcriptase reversa viral, uma guanina ao invés de adenina gerando um aminoácido diferente. Em

outras palavras, na posição do códon 184 esperava-se encontrar a metionina (referência), porém houve uma troca por uma valina (mutante) (SHAFER et al., 2007).

As chances de ocorrerem mutações que levem a resistência a ARVs prevalecerem na ausência de pressões seletivas são raras e por isso não prevalecerão em pacientes não tratados. Pacientes virgens de terapia apresentando mutações de resistência são exemplos de casos de resistência transmitida (RT), e não resistência adquirida (RA). Via de regra não ocorre o fenômeno de *cross-resistance* (resistência cruzada) entre classes de ARVs, em contrapartida o surgimento de uma mutação de resistência pode apresentar relacionamento cruzado com ARVs de mesma classe (TANG & SHAFER, 2012).

1.9.2 Potência e Barreira Genética dos Antirretrovirais

O sucesso terapêutico da TARV dependerá da potência e do potencial de durabilidade do ARV. Entende-se potência *in vivo* a capacidade de redução da CV em um curto espaço de tempo que determinado fármaco promove em monoterapia, todavia o conceito de potência possa ser analisado também na associação. Por sua vez, o potencial de durabilidade é a capacidade de manutenção da supressão virológica. A durabilidade da manutenção da supressão virológica está diretamente relacionado a barreira genética de cada medicamento. Entende-se como barreira genética a facilidade com que o vírus desenvolve resistência frente àquele medicamento o qual esteja sendo utilizado. Quanto mais rápido a resistência emerge quando se usa um determinado fármaco, menor será sua barreira genética, ou seja, significa que o vírus precisaria de poucas mutações ou mesmo de apenas uma mutação (ITRs) para diminuir a eficácia daquele ARV (DIAZ, 2011, 2016). As figuras 8 e 9 a seguir mostram as informações de potência e barreira genética nas diferentes classes de ARVs.

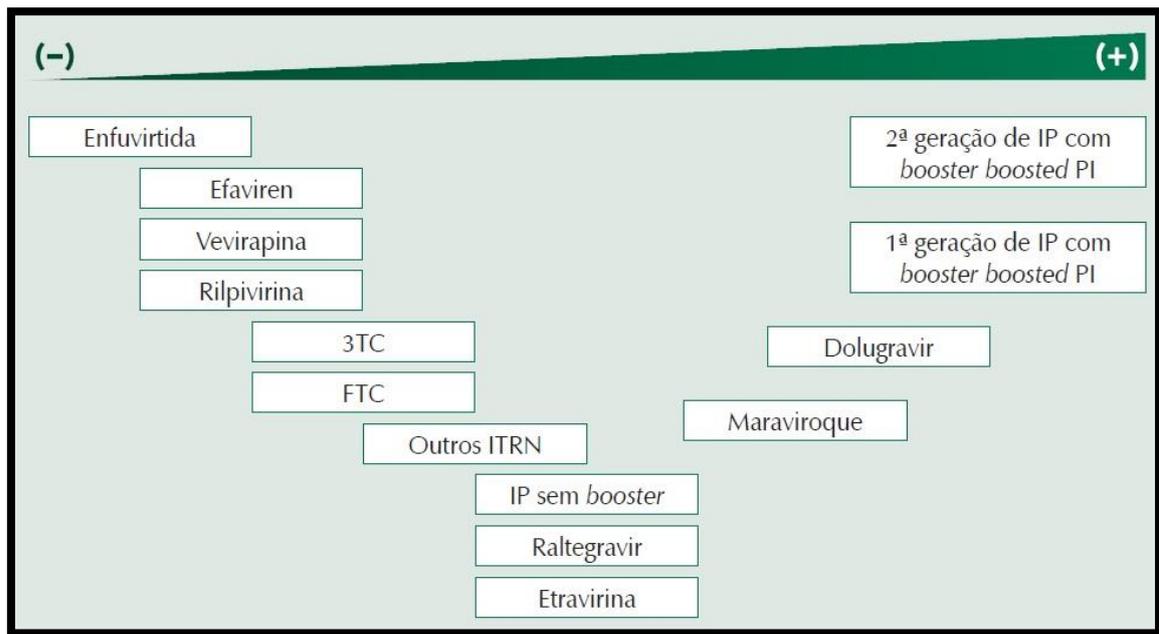


Figura 8 - Barreira genética para desenvolvimento de resistência aos ARVs em vírus sem mutações prévias de resistência. Barreira genética crescente da esquerda para direita. DIAZ, 2016.

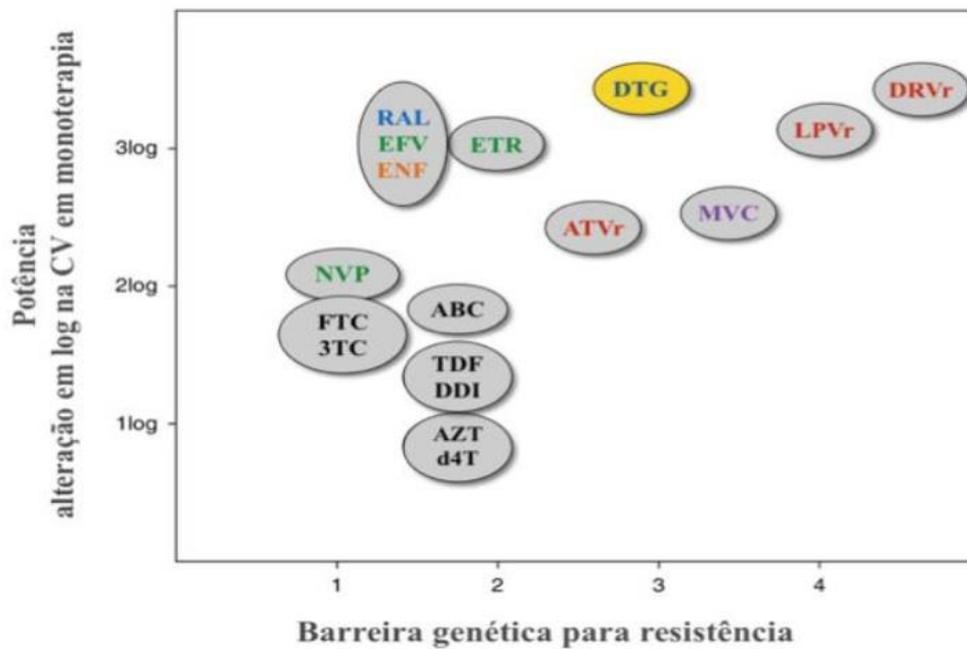


Figura 9 - Diagrama esquemático da barreira genética (BG) para resistência e potência de ARV selecionados. Os ITRNs são mostrados em preto, os ITRNNs em verde, os IPs em vermelho, os INI em azul e em círculo amarelo, o maraviroque (MRV) em lilás e a enfuvirtida (ENF) em laranja. Adaptado de TANG & SHAFER, 2012.

O conhecimento da barreira genética de um ARV nos faz entender do porquê um esquema contendo, por exemplo, três inibidores da TR análogos aos nucleosídeos padeceriam rapidamente, não só pela fragilidade em sua barreira genética, mas também pela limitada potência para inibir a replicação do HIV-1 e promover supressão virológica. Os IPs, por sua vez, apresentam maiores potências *in vivo* e maiores barreiras genéticas (impõe maiores dificuldades para o vírus) quando comparado aos ITRNs, todavia os IPs apresentam uma maior toxicidade pois as doses necessárias para promoção de concentrações intracelulares ótimas são elevadas (ERON et al., 2006; MURPHY et al., 2001).

Com o uso de IP não peptídicos (IPNP) como por exemplo lopinavir/ritonavir (LPV/r) foi possível uma melhor manutenção da concentração plasmática ótima do ARV impactando positivamente a adesão ao tratamento, proporcionando um aprimoramento (*booster*) da barreira genética. O ritonavir promove inibição do citocromo hepático CYP3A4 responsável pela biotransformação dos IPs convencionais, além disso reduz a hidrólise intracelular do IP servindo como um *booster* adicional na farmacocinética desses medicamentos, conseqüentemente as doses desse ARV serão mais cômodas para o paciente melhorando assim sua adesão. O HIV-1 precisaria apresentar pelo menos oito mutações principais (contra três mutações com uma sendo principal ou mais de quatro mutações na ausência de mutação principal nos IPs sem *booster*) para comprometer severamente um esquema de LPV/r. As mutações na protease aparentemente não são selecionadas em um paciente infectado por HIV do subtipo B sem que haja mutações preexistentes nessa enzima. Neste exemplo fica claro outro efeito observado na barreira genética, no incremento do *booster* nos IPs ocorre um aumento do efeito quantitativo (oito mutações) para resistência, enquanto que nos IPs sem incremento do ritonavir há um aumento do efeito qualitativo com diminuição do efeito quantitativo (mutações primárias) (DIAZ, 2016). O estudo 720 realizado pela farmacêutica Abbott comparou o desempenho e segurança entre estavudina (d4T), lamivudina (3TC) e LPV/r em pacientes virgens de tratamento e concluiu que o LPV/r sozinho apresentou os mesmos resultados na redução da CV ocasionada pela associação do d4T e 3TC (ERON et al., 2006; MURPHY et al., 2001).

A barreira genética, *in vivo*, pode ser didaticamente dividido em três grupos: (1) um grupo leva em consideração o número de mutações que o vírus deve apresentar para ser capaz de diminuir o efeito antirretroviral, apresenta relação fundamental com os IPs por exemplo; (2) um segundo grupo diz respeito a rapidez com que determinada mutação é selecionada, apresenta relação com os ITRs (exemplo, M184V pelo 3TC); (3) um terceiro grupo leva em consideração o perfil de mutações necessárias para a resistência de um esquema antirretroviral (DIAZ, 2016). Esquemas terapêuticos, portanto, devem ser pensados levando em conta a potência, barreira genética dos ARVs, além de possíveis reações adversas pelo uso do medicamento (RAM). Fármacos ARVs com elevada barreira genética em alguns casos podem ajudar fármacos com menores barreiras, quando associados (DIAZ, 2016).

1.9.3 Marcadores genéticos e Mecanismos de Resistência do HIV-1 entre as classes de Antirretrovirais

O HIV-1 apresenta marcadores genéticos de resistência para todas as classes conhecidas e utilizadas na terapêutica, embora a frequência do aparecimento destas mutações varie entre as diferentes classes de ARVs. Sabe-se, através de técnicas de PCR ultrasensíveis, que mesmo sob terapia, é possível a existência de replicação residual do HIV em pacientes com baixíssimos valores de CV, e isso pode permitir a emergência de variantes resistentes, todavia a significância clínica dessa replicação ainda não é clara. Esta replicação pode ocorrer em compartimentos onde a concentração do ARV fica abaixo dos valores ideais ou em regiões onde múltiplas infecções célula a célula induzem a perda da sensibilidade ao inibidor, mesmo sem o requerimento de mutações de resistência (SAHU, 2014).

1.9.3.1 Inibidores da Transcriptase Reversa Análoga a Nucleosídeo/Nucleotídeo (ITRN)

Os mecanismos pelos quais o HIV-1 consegue se evadir dos ITRNs são através de mutações que o permitem realizar dois mecanismos; (1) diferenciar os substratos naturais dos substratos provenientes dos ITRNs; (2) aumentar a afinidade das

pirofosfatases com a enzima mutante. Mutações discriminatórias referem-se ao primeiro mecanismo onde a TR utiliza-se dos substratos naturais em detrimento do ITRN, a enzima consegue identificar por exemplo a citosina ao invés do 3TC através de impedimento estérico ou redução química na ligação do análogo, são exemplos de mutações discriminatórias M184V/I, K65R, K70EG, L74VI, Y115F, Q151M (complexo) (BOYER et al., 2012; TANG & SHAFER, 2012; STANFORD, 2018).

O segundo mecanismo diz respeito a excisões feitas pela TR mutante, neste caso a enzima não é capaz de discriminar, todavia é capaz de remover depois de incorporá-lo através da atividade da pirofosfatase, que utilizando-se de ATP do hospedeiro é capaz de remover o fósforo do ITRN incorporado (por não apresentar o grupo hidroxila os ITRNs funcionam como terminadores de cadeia para o nucleotídeo subsequente – *chain terminators*), desprendendo-o. As mutações de excisão são aquelas portanto, que aumentam a afinidade de pirofosfatases na TR mutante e tais mutações são selecionadas pelos análogos da timidina (TAM) como M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y e K219QE, T69ins (BOYER et al., 2012; STANFORD, 2018; TANG & SHAFER, 2012).

1.9.3.2 Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogo de Nucleosídeos (ITRNN)

Os ITRNNs atuam inibindo alostericamente a TR do HIV-1 próximo do sítio hidrofóbico ativo da transcriptase da enzima a nível de Tir181, Tir188 e a região de adesão do *primer* (resíduo 227-235). Essas ligações químicas impedem a ação da enzima. Algumas mutações (nos locais de interação) podem impedir a interação entre o ITRNNs por alteração da conformação estrutural da enzima (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012).

As mutações mais frequentes são: L100I, K101EHPRN, K103NSHTRQE, V106AM, I132ML Y181CIV, Y188LCH, G190ASEQ, F227LC, Y232H, M230LI, P236L, K238T, Y318F, V179ETL. Uma mutação mais recente tem sido observada em metade dos pacientes que desenvolveram falha da supressão virológica na vigência do uso de rilpivirina, a E138K/A/R. Essa mutação curiosamente tem levado a uma falha “*cross-talk*” entre ITRNs e ITRNNs. São exemplos de mutações acessórias: V90I,

A98G, V108I, V179DFI, H221Y, P225H, L234I e N348I, K101Q, V106I, E138QG, K238N (ALBUQUERQUE, 2016; ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012; STANFORD, 2018b; TANG & SHAFER, 2012).

1.9.3.3 Inibidores da Protease (IP)

Comparado aos ARVs anteriormente citados (ITRN/ITRNN), os IPs apresentam maiores barreiras genéticas sendo necessária a presença de múltiplas mutações no vírus. Os IP/r apresentam barreira genética aprimorada (DIAZ, 2016). A função da PR é realizar a clivagem dos precursores *gag* e *gag/pol* durante a maturação do vírion. Os IPs foram desenhados para interagir, de forma competitiva, com o sítio ativo da PR. Uma vez que os IPs se ligam ao sítio ativo da enzima não haverá atividade proteolíticas nas poliproteínas virais e o resultado serão partículas defectivas (imaturas) (BHATTI et al., 2016; COELHO, 2017). As mutações de resistência aos IPs conferem aos vírus a possibilidade de mudança conformacional molecular da PR inviabilizando sua interação com os IPs ou enfraquecendo a cinética da ligação química inibitória, diminuindo assim sua relevância (IPs) em promover a supressão viral (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012).

As principais mutações primárias encontradas cuja consequência é a diminuição da suscetibilidade aos IPs são: D30N, V32I, M46ILV, G48VMASQTQ, I50VL, I54VTALMS, L76V, V82ATFSLMC, I84VAC, N88SDTG, L90M, L10R/Y, V11L, K20M/V, L23I, L24M, L33I, L33F, M36I, I47VA, Q58E, G73VD, N83S, I85V, L89T. As principais mutações acessórias são: L10F, L10I/V, V11I, K20T, K20R, K20I, L24F, K43T, A71VTIL, G73STCA, T74P, T74S, N83D, L89V (STANFORD, 2018c; TANG & SHAFER, 2012).

1.9.3.4 Inibidores da Integrase (IN strand transfer inhibitors - INI)

A integrase é uma enzima que faz parte do complexo de integração (CI), sendo responsável pela ligação do DNA_{DS} do HIV-1 em conformação circular (*3' processing reaction*) e serve como catalisador da reação cuja finalidade é a integração do DNA_{DS}

do HIV-1 no DNA do hospedeiro. Para realizar sua função é necessário que a integrase interaja com dois cofatores de íons metálicos de magnésio (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012; PAULA, 2018; TANG & SHAFER, 2012).

Os INI são ARVs que interagem apenas na enzima viral (integrase) que se encontra ligada ao DNA do vírus. Esses ARVs e agem ligando-se próximo ao sítio ativo da enzima interrompendo o posicionamento correto do DNA viral em relação ao sítio ativo, bem como a interação com os dois íons essenciais de magnésio impedindo a transferência de nucleotídeos entre o CI e o cromossomo evitando assim a formação do provírus (TANG & SHAFER, 2012).

Algumas mutações podem interferir com a ligação entre o INI e a integrase bem como os íons magnésio. São exemplo de mutações que conferem resistência viral aos INI: N155HST, Q148HKRN, Y143CRHKSGA, T66AIK, L74F, E92QGV, F121Y, G140SAC, P145S, Q146P, S147G, G149A, V151LA, S153YF, S230R, R263K. São exemplo de mutações acessórias: H51Y, T97A, G118R, E138KAT, V151I (STANFORD, 2018d; TANG & SHAFER, 2012).

1.9.3.5 Inibidor de Fusão

A enfuvirtida (T-20) é um pequeno peptídeo (derivado da gp41 C-terminal) injetável via subcutânea capaz de interagir com a gp41, mais precisamente em uma região conhecida como HR1 (entre os aminoácidos 36 – 45), inibindo a fusão de membranas (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2012). A T-20 é considerado um ARV de baixa barreira genética onde duas semanas de viremia são suficientes para proporcionar resistência a esse medicamento em praticamente todos os casos (DIAZ, 2016). Estas mutações são capazes de gerar impedimento da ligação entre o T-20 e a gp41. São exemplos de mutações ao T20: G36DEV, V38EA, Q40H, N42T e N43D (TANG & SHAFER, 2012).

1.9.3.6 Antagonista do correceptor CCR5

O maraviroc é um exemplo de ARV que age a nível da gp120, impedindo sua ligação com o correceptor CCR5 presente no hospedeiro que juntamente com o CD4 representam as moléculas necessárias para adsorção do vírus na célula. No Brasil, o uso deste ARV é restrito aos pacientes que realizaram testes de genotropismo (alça V3 da gp120) recente (seis meses) evidenciando presença exclusiva da variante R5 uma vez que esse antagonista só apresentará ação contra o HIV-1(R5), fenótipo presente em mais de 80% dos pacientes recém infectados. O HIV-1(X4) é encontrado em aproximadamente 50% dos pacientes em estágios mais crônicos da infecção, geralmente em baixas proporções em relação ao HIV-1(R5). Essa classe de ARV tem sido utilizado como parte da terapêutica de resgate juntamente com outros ARVs de outras classes (BRASIL, 2018a; TANG & SHAFER, 2012).

A principal falha terapêutica associado ao maraviroc é a presença da variante HIV-1(X4). O tropismo viral pode ser detectado fenotipicamente ou genotipicamente. Como os testes genotípicos apresentam uma menor sensibilidade sempre existirá o risco do HIV-1(X4) não ser detectado quando ele se apresenta como uma variante minoritária. Estes testes utilizam-se de algoritmos de predição no sequenciamento da alça V3 do envelope para prever a presença da variante resistente. Os testes de fenotipagem utilizando linhas de célula expressando CCR5 ou CXCR4 garantem uma maior sensibilidade na detecção das variantes X4 ainda que elas representem menos de 1% da população viral, além disso mutações de resistência podem estar fora da alça V3 do envelope (WHITCOMB et al., 2007).

2 JUSTIFICATIVA

No ano de 2018 faz 37 anos do início da pandemia HIV/AIDS, de 1981 para os dias atuais muito se têm avançado, o conhecimento da virologia básica do HIV assim como detalhes de seu ciclo replicativo e patogênese, fruto dos esforços da comunidade científica em todo o mundo, tem proporcionado qualidade de vida as PVHA e o fruto desse empenho é observado no impacto da terapia antirretroviral e métodos de diagnóstico mais sensíveis. Ao mesmo tempo a construção e aplicação de estratégias políticas que facilitem, para a população, o acesso a terapia e fácil diagnóstico são igualmente fundamentais para impedir o avanço da infecção pelo HIV no mundo.

Todavia, vivemos um momento antagônico do contexto da pandemia HIV/AIDS. Por um lado, o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS) tem celebrado conquistas importantes no avanço de seu plano em acabar a epidemia até 2030 através do monitoramento do avanço da meta 90-90-90, da redução das mortes relacionadas a AIDS (caindo pela metade desde 2005) e da diminuição do número de novas infecções (UNAIDS, 2018b).

Por outro lado, um relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) intitulado *"HIV Drug Resistance Report"* de 2017, tem divulgado dados preocupantes do avanço da resistência viral. Os dados mostram que a continuação dessa tendência colocará em risco o não cumprimento das metas de combate à AIDS. O estudo ainda chama atenção para alguns países cujo retrocesso do aumento de novas infecções já é uma realidade, infelizmente o Brasil encontra-se incluso. O relatório mostra que em seis dos 11 países inspecionados na África, Ásia e América Latina, mais de 10% das pessoas que iniciaram a TARV apresentaram uma cepa resistente a alguns medicamentos de primeira linha, uma vez que esse limite de 10% é atingido, a OMS recomenda que esses países revisem urgentemente seus programas de tratamento de HIV. O Brasil atualmente apresenta uma prevalência de 6,8% de resistência ao efavirenz e nevirapina, mas chega a 9,8% quando levadas em conta todas as classes de droga atualmente usadas contra o vírus (WHO, 2017).

Ainda de acordo com a OMS, a principal causa do aumento da resistência aos ARV's é a falta de adesão ao tratamento prescrito levando à interrupção deste.

Levando em consideração a meta 90-90-90 atual no Brasil (84-75-92), a falta de adesão é o principal desafio para o cenário brasileiro e que impulsiona o aumento da resistência viral. As principais estratégias na tentativa de reversão dessa situação do aumento de resistência é um planejamento político para intensificação de campanhas informativas destacando a importância da adesão ao tratamento, distribuição, pelo SUS, da PrEP, intensificação do aumento da oferta de testes rápidos, assim como intensificação da vigilância de mutações de resistência, afim de direcionar o tratamento mais adequado, evitando assim os ARV's ineficientes. O tratamento eficiente leva a diminuição da carga viral a níveis indetectáveis e a diminuição do risco de transmissão do vírus.

Neste sentido o presente estudo visa contribuir investigando mutações clinicamente relevantes e perfil de resistência aos ARV's. A TARV ineficiente proporciona degradação da qualidade de vida de PVHA, acúmulo de mutações virais, além de maior risco de transmissão, contribuindo para aumento dos índices de prevalência de mutação. Além disso este estudo procura empreender uma epidemiologia molecular através de análises filogenéticas identificando os clados dos vírus circulantes no Rio Grande do Norte.

3 OBJETIVOS

3.4 Objetivo geral:

Caracterizar filogeneticamente as linhagens do HIV-1 circulante no Estado do Rio Grande do Norte.

3.5 Objetivos específicos:

- Realizar a análise filogenética do HIV-1 circulante no Rio Grande do Norte;
- Investigar mutações clinicamente relevantes do HIV-1 circulante no estado;
- Evidenciar e analisar mutações em modelagem proteica;
- Validação de protocolo alternativo para *Nested-PCR*

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Foram analisados neste estudo, um total de 170 amostras sendo estas coletadas entre janeiro 2018 a outubro de 2018 e compreende todas as regiões de saúde do Rio Grande do Norte conforme tabela 3. As amostras foram obtidas no Laboratório Central Dr. Almino Fernandes (LACEN-RN), laboratório de saúde pública de referência do estado.

O estudo é caracterizado como misto: retrospectivo, prospectivo e transversal. As amostras foram obtidas por demanda espontânea uma vez que os pacientes necessitam periodicamente realizar exames de rotina, sejam eles Carga Viral (CV) e/ou a contagem das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (CD4).

Entre os pacientes encaminhados para carga viral e contagem de linfócitos T CD4⁺ foram selecionados aqueles cuja carga viral foi considerado detectável no último exame cujo tratamento com ARV já havia sido iniciada. Foram selecionados também os pacientes virgens de terapia, recém-diagnosticados. Foram excluídos aqueles que não apresentaram carga viral detectável no último exame, aqueles cujos laudos para requisição dos exames não estavam corretamente preenchidos pelo profissional prescritor, como também aqueles que após realização da carga viral apresentaram carga viral indetectável uma vez que praticamente eliminam as chances de amplificação do material genético viral para análise de resistência. Foi percebido, empiricamente, que amostras cuja carga viral se apresentaram com menos de 100.000 cópias de RNA viral não apresentaram resultados satisfatórios para amplificação do material genético em nossa metodologia e por isso tais amostras não foram utilizadas.

As amostras de sangue total foram selecionadas após avaliação de aplicação de critérios de inclusão e exclusão as amostras selecionadas foram armazenadas a -70°C. Todos os procedimentos realizados neste estudo passaram pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CAAE: 91776418.5.0000.5537.

Tabela 3 - Quantitativo de pacientes por regiões de saúde do RN

Região de saúde	n	%
Leste Potiguar	72	43
Agreste Potiguar	19	11
Centro Potiguar	24	14
Oeste Potiguar	55	32
Total	170	100

4.2 Carga viral e contagem de linfócitos T CD4⁺

A contagem de linfócitos T CD4⁺ e a quantificação da carga viral foram realizados no LACEN-RN. O método de contagem de linfócitos T CD4 foi a citometria de fluxo de 4 cores (TruCount; FACSCalibur™; BD Biosciences Immunocytometry Systems, EUA) seguindo o protocolo da Becton, Dickinson *and Company* (BD). Para determinação dos níveis da carga viral foi utilizado PCR em tempo real (Abbott Molecular Inc., EUA), seguindo o protocolo recomendado pela Abbott.

Para contagem de LT CD4⁺ foi adicionado 20 µL do reagente BD Multitest™ em tubos BD TruCount™ juntamente com 50 µL de sangue total homogeneizado. O tubo é homogeneizado em vórtex e incubado por 15 minutos em ambiente sem luz em temperatura ambiente (20°C - 25°C). Após o tempo de incubação foram acrescentados 450 µL de solução de lise diluída 1:10 (BD FACS™ *lysing solution*) em água destilada, o tubo foi homogeneizado em vórtex e colocado novamente em ambiente escuro por 15 minutos em temperatura ambiente (20°C - 25°C), passado o tempo da segunda incubação a amostra encontra-se pronta para análise em citometria de fluxo.

Para realização da carga viral foi realizado o preparo das amostras no equipamento m24sp da Abbott com reagentes que destroem o vírion, capturam os ácidos nucleicos através de micropartículas magnéticas e lavam as partículas para remoção de componentes não ligados da amostra. Os ácidos nucleicos ligados são eluídos e transferidos para uma placa com 96 cavidades profundas (*96-Well Optical*

Reaction Plate) lacrada com adesivo (*Abbott Optical Adhesive Cover*). Ainda antes da amplificação é necessário o preparo da mistura MasterMix por intermédio da combinação dos reagentes de amplificação Abbott *RealTime* HIV, sendo assim as amostras juntamente com o Mastermix são enviadas para a amplificação no equipamento Abbott m2000rt. O ciclo de amplificação, no qual o sinal fluorescente é detectado pelo analisador Abbott m2000rt é proporcional ao log da concentração de HIV RNA presente na amostra original.

4.3 Sequenciamento de gene da Protease/Transcriptase Reversa do HIV-1

Para caracterização molecular do HIV foram sequenciados os segmentos gênicos correspondente a 297 nucleotídeos ou 99 aminoácidos do gene da protease (PR) e os primeiros 335 códons do gene da transcriptase reversa (TR). Os *primers* foram fornecidos pela Fiocruz/RJ. O sequenciador utilizado foi o Applied Biosystems ABI 3500 – Hitachi (Applied Biosystems, Foster City, CA) disponível no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), localizado no Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

4.3.1 Extração do RNA total

A extração do RNA viral foi realizada a partir do sangue total. A extração foi obtido através do uso do kit comercial QIAMP Viral Mini Kit (QIAGEN, Inc.,Valencia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante, para posterior realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *Nested* (*Nested-PCR*).

A extração do RNA total compreende quatro etapas: lise celular, ligação do RNA a uma coluna de sílica, lavagem e eluição do RNA. Em resumo, durante a etapa inicial 140µL das amostras foram incubadas com o tampão de lise AVL e 5,6µL de RNA transportador (*carrier*), durante dez minutos, a fim de proporcionar o rompimento celular para a liberação dos ácidos nucleicos. É adicionado etanol absoluto P.A e, posteriormente, as amostras foram aplicadas em uma coluna contendo uma membrana de sílica, na qual irá favorecer a ligação seletiva ao RNA pré-extraído. A terceira etapa consiste em centrifugações e lavagens com tampões AW1 e AW2, cuja finalidade é remover impurezas residuais. Finalmente, a última etapa consiste na

eluição, ou seja, na liberação do próprio RNA viral da membrana de sílica, por meio da adição de 60µL do tampão AVE, com posterior centrifugação. Após extração os RNAs virais poderão ser estocados em *freezer* -70°C para posterior utilização com validade de até um ano.

4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase Nested (Nested-PCR)

O RNA viral purificado foi utilizado para realização da *Nested-PCR*. Mesmo tratando-se de um retrovírus foi utilizado um protocolo contendo a enzima *Go Script reverse transcriptase* da Promega Co.® para formação do DNAc. Cinco microlitros (5µL) do DNAc foram utilizados para amplificação; 2µL dos *primers (outers)* G17S e MMRT6 (Tabela 4) na concentração de 400µM; 25µL do PCR Master Mix 2x (Promega Co., Madison, WI); e 10µL de água livre de nucleases. O preparo dos substratos foi realizado em tubo *ependorf* 1,5 mL e em seguida foi repassado para *ependorf* 0,2 mL onde foi adicionado o RNA viral extraído das amostras, o volume final para reação foi de 55µL. A mesma etapa descrita fora realizada utilizando um segundo par de *primers (internos)*; MMRT10 e MMRT5 obtidos na Fiocruz-RJ (Tabela 4), obtendo mais dois tubos *ependorf*, com exceção da não necessidade do uso da enzima na segunda reação. A amplificação foi realizada utilizando o termociclador *Eppendorf® Mastercycle* modelo 22331 (Eppendorf AG, Hamburg, GER), seguindo os parâmetros de termociclagem já padronizados na Fiocruz-RJ (Tabela 5).

Finalizado a PCR, os produtos amplificados foram analisados por meio de uma eletroforese em gel de agarose (BioAmerica Inc., Miami, USA) a 0,5% em TBE 0,5X.

Tabela 4 - Primers utilizados para realização da Nested-PCR.

Região	Primer	Primers externo Primers interno	Posição do genoma
PoI (PR/TR)	G17S	(5'AAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGA3')	2017- 2040
	MMRT6	(5'TTTTACATCATTAGTGTGGG3')	3628- 3647
	MMRT10	(5'CAGGCTAATTTTTTAGGGAA3')	2077- 2096
	MMRT5	(5'TAAATTTGATATGTCCATTG3')	3555- 3574

Tabela 5 - Parâmetros de termociclagem da Nested-PCR para posterior sequenciamento

Transcriptase Reversa	45°C	45 min	1 ciclo
Ativação da enzima	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturação	94°C	30 seg	35 ciclos
Hibridização	55°C	30 min	
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4°C	∞	-

4.3.3 Eletroforese em gel de Agarose

Após realização da *Nested-PCR* inicia-se a etapa para visualização e análise dos produtos amplificados (*amplicons*), através de eletroforese em gel de agarose, que foi realizada em uma cuba horizontal a 100V durante 60 minutos. Nesta etapa, foram utilizados 5 μ L do produto amplificado na etapa anterior; misturados a 2,5 μ L de azul de bromofenol (Promega, Madison, WI, USA) e 2,5 μ L de Gel Red® (Biotium). Essa mistura foi aplicada gel de agarose a 0,5% (BioAmerica, Inc., Miami, USA) em TRIS-Ácido Bórico-EDTA 0,5X (Promega, Madison, USA), e por fim, foi revelado em luz ultravioleta.

Havendo presença de bandas inespecíficas nos *amplicons*, o produto foi isolado e purificado utilizando o *kit* comercial *Gel Extraction* (Qiagen, Inc., Valencia, CA), realizados no LADIC, as etapas estão descritas no item a seguir. Após realizada a purificação os *amplicons* foram enviados para o Laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG)/UFRN. Quando observado *amplicons* específicos na eletroforese em gel de agarose foi realizado a purificação diretamente do produto da *Nested-PCR* usando o *kit* comercial *Exosap* (Applied Biosystems), realizadas na LBMG/UFRN, seguindo recomendações do fabricante, sendo esta etapa descrita posteriormente em tópico específico.

4.3.4 Purificação do produto de PCR para sequenciamento por Extração de Gel de Agarose

Nas amostras que apresentaram *amplicons* múltiplos, ou seja, com bandas inespecíficas, elas foram submetidas ao processo de purificação do produto de PCR por extração de gel de agarose, por meio do *kit* comercial *Gel Extraction* (Qiagen, Inc., Valencia, CA), seguindo as instruções recomendadas pelo fabricante.

Para realização desse procedimento foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 0,7%, utilizando todo produto amplificado durante a *Nested-PCR* da etapa anterior, sendo misturado a 5 μ L de Gel Red e 5 μ L de azul de bromofenol (BioAmerica, Inc., Miami, USA). Após análise em ultravioleta, os *amplicons* de interesse foram cortados diretamente do gel, com o auxílio de lâminas de bisturi; e

transferidos para tubos de 1,5 mL de fundo cônico para seguir o procedimento de purificação com o *kit* comercial.

Em cada tubo, para cada 100 mg do fragmento foram adicionados 300 µL de Buffer QG, com o propósito de solubilizar o gel de agarose cortado. Logo após os tubos foram incubados no termobloco (50°C) por dez minutos, sendo homogeneizados no decorrer do tempo. Com o gel completamente dissolvido, foram adicionados 100 µL de isopropanol à amostra, que foi em seguida transferida para uma coluna de fundo cônico, sendo esta fornecida pelo *kit*. Após centrifugação, o filtrado no fundo do tubo foi desprezado e acrescentados de 500 µL do Buffer QG à coluna, e submetido a nova centrifugação (13.000 rpm por 1 minuto). Após a centrifugação o filtrado foi novamente desprezado e foram adicionados 750 µL do Buffer PE cujo objetivo é remover impurezas que ainda restam, mais uma centrifugação foi necessária e então o filtrado mais uma vez foi desprezado e a amostra deixada à temperatura ambiente, por três minutos. No término desse tempo foram realizadas mais duas centrifugações. Finalmente, a coluna foi encaixada em um tubo de 1,5mL de fundo cônico (*eppendorf*), com posterior adição de 30 µL de água isenta de nucleases, seguida de uma centrifugação. O DNA foi estocado a -20°C para utilização futura.

4.3.5 Purificação do produto da Nested-PCR purificado

Quando detectados *amplicons* específicos e desejáveis as amostras foram consideradas aptas para envio ao LBMG/UFRN para purificação pelo *kit* comercial *ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup* (Applied Biosystems) , cujo protocolo segue as orientações discriminadas pelo fabricante.

Neste protocolo foram misturados 5 µL do produto de *Nested-PCR* com 2 µL do reagente *ExoSAP-IT™*. Para purificação, a amostra foi incubada por 37°C durante 30 minutos, para degradação de excedentes de *primers* e nucleotídeos, seguida por outra incubação à 80°C por 15 minutos, para ativação da enzima *ExoSAP-IT*. Posteriormente sendo realizado a quantificação de DNA da amostra.

4.3.6 Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA foi utilizado o aparelho Qubit® na versão 2.0 *Fluorometer Quantitation* (Invitrogen, Eugene, EUA), esse equipamento é capaz de detectar a fluorescência gerada por um fluoróforo específico para DNA, que se ligará a dupla fita, que será então convertido em quantificação de DNA.

Nessa etapa o ensaio apresenta como volume final o valor de 200 µL, proveniente da mistura entre o tampão, fluoróforo e a amostra. Posteriormente, os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante dois minutos, com consecutivo padrão de leitura no equipamento Qubit® 2.0 (Invitrogen).

Por fim, as amostras quantificadas foram submetidas à nova purificação utilizando o *kit ExoSAP-TM™* descrito anteriormente.

4.3.7 Reação de Sequenciamento

Uma vez os fragmentos quantificados e purificados o passo a seguir foi o sequenciamento (*cycle sequencing*), cujo fundamentação teórico consiste na utilização de dideoxynucleotídeos (ddNTPs), onde houve a incorporação à cadeia do material genético, e bloqueio a síntese da cadeia pela DNA polimerase. Os fragmentos foram sequenciados em ambos os sentidos utilizando o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems, Foster City, CA), versão 3.1.

Neste ensaio foi realizado uma mistura entre 2 µL de *primer* específico (*sense* ou *antisense*); 2 µL de *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready*; 1,5 µL de *5X Sequencing Buffer*, quantidade de DNA delibrada pela quantificação (em µL); e para completar o volume final de 10 µL, foi adicionado água isenta de nucleases. Os parâmetros de termociclagem encontra-se na tabela 6.

Tabela 3 - Parâmetros de termociclagem para a reação de sequenciamento (Cycle Sequencing)

Condição	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da enzima	96°C	1 min	1 ciclo
Desnaturação	96°C	15 min	35 ciclos
Hibridização	50°C	15 min	
Extensão	60°C	4 min	
Temperatura Final	4°C	∞	-

4.3.8 Purificação e Precipitação de DNA para remoção de Dye Terminators

O produto da reação de sequenciamento foi purificado com o *Big Dye® XTerminator™ Purification Kit* (Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante, as amostras encontraram-se em ambiente escuro para realização desta etapa.

A princípio foi realizado um *mix* contendo as soluções *SAM Solution* e *Big Dye XTerminators Solution*, os quais foram aplicados em uma placa de 96 poços juntamente com a amostra proveniente da reação de sequenciamento. A placa foi incubada à temperatura ambiente, por 30 minutos sob agitação; e finalmente, colocada no sequenciador automático Applied Biosystems ABI-3500 (Applied Biosystems/Hitachi, Foster City, CA).

4.3.9 Análise de Sequências

A análise das sequências foram feitas no programa Chromas versão 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd.) sendo editadas manualmente por meio de alinhamentos múltiplos feitos no software Jalview (Waterhouse *et. al.*, 2009); MEGA versão 7.0 (<http://www.megasoftware.net/>) e Clustal W2 (Thompson *et. al.*, 1997) com sequências referências coletadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

O subtipo genético do HIV-1 foi determinado com o uso do software REGA HIV *subtyping tool* v.3 e posteriormente confirmado na análise filogenética. Para construção da árvore filogenética foi utilizado o MEGA versão 7.0 (<http://www.megasoftware.net/>), foram utilizados o métodos de *Maximum Likelihood* (Máxima Verossimilhança), modelo *General Time Reversible* com distribuição Gamma e valores de *bootstrap* de 1.000 replicações. Para construção da árvore filogenética foram coletadas referências do banco de dados da Los Alamos HIV *database* (<http://www.hiv.lanl.gov>).

Para análise e comparação dos segmentos gênicos sequenciados da PR e RT foi utilizado um algoritmo de interpretação de mutações (HIVdb *Program* versão 8.7 – *Genotypic Resistance Interpretation Algorithm* – <http://hivdb.stanford.edu>), sendo possível análise de mutações e sua possível relação com perfil de resistência aos ARV's.

A modelagem de proteínas foi realizada através do UCFS Chimera® versão 1.13.1 (<http://www.cgl.usfc.edu/chimera/>). Para construção da modelagem foi selecionada uma sequência nucleotídica de uma das amostras contendo as mutações mais encontradas e realizada a tradução para aminoácidos através do ExPASy *Bioinformatics Resource Portal* (<http://web.expasy.org>) e selecionado o melhor *frame* de aminoácidos. Uma vez obtida a sequência de aminoácidos foi necessária a obtenção de dez amostras referências com valores mínimos de 93% de identidade no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O alinhamento das sequências de aminoácidos foi realizado por meio do *Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences* – MAFFT versão 7 (<http://www.mafft.cbrc.jp>).

4.4 Implantação de Protocolo alternativo para amplificação do gene Pol no HIV-1 em Nested-PCR

Dois protocolos alternativos para realização da *Nested-PCR* foram utilizados com amostras positivas para HIV-1 no Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer (LADIC) na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Os resultados destes protocolos foram avaliados após análise dos fragmentos revelados em gel de agarose 0,5%. Um dos protocolos foi validado após análise dos resultados.

Para avaliação dos protocolos alternativos foram utilizadas duas amostras soropositivas para o HIV-1, ambas testadas anteriormente com protocolo laboratorial já validado e em uso, em ambas as amostras houve a amplificação esperada expressa em fragmentos com aproximadamente 1.000 pares de base na revelação no gel de agarose 0,5%.

Um dos protocolos avaliados consistia do não uso da enzima *Go Script Reverse Transcriptase* da Promega® e quantidade maior de substratos enquanto em um segundo protocolo foi utilizada a enzima anteriormente descrita com uma menor quantidade de substrato para reação. O perfil laboratorial das amostras referente a carga viral e contagem de linfócitos T CD4⁺ encontram-se na tabela 7.

Tabela 4 - Descrição do perfil de carga viral e contagem de linfócitos T CD4⁺ das amostras envolvidas na validação para protocolo alternativo.

Amostra	Carga viral / log	CD4
25JMJ	865.058 cópias/mL plasma / log 5.937	382 células/μL sangue
19JNPS	883.235 cópias/mL plasma / log 5.946	492 células/μL sangue

O quantitativo dos substratos e os parâmetros de termociclagem utilizados em cada protocolo avaliado assim como cada uma das etapas de *Nested-PCR* encontram-se descrito nas tabelas 8, 9, 10, 11, 12.

Tabela 5 - Descrição do quantitativo utilizado na 1ª etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo sem uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®

Reagentes	Concentração	µl/tubo	X (3)
PCR Master Mix (Acess Quick-Promega)	2x	25	75 µl
H₂O Nuclease Free	-	11	33 µl
Primer G17S	400nM	2	6 µl
Primer MMRT6	400nM	2	6 µl
RNA viral	-	10	-

Volume final = 40 µl + 10 µl = 50 µl

Tabela 6 - Descrição do quantitativo utilizado na 2ª etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo sem uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®

Reagentes	Concentração	µl/tubo	X (3)
PCR Master Mix (Acess Quick-Promega)	2x	25	75 µl
H₂O Nuclease Free	-	11	33 µl
Primer MMRT10	400nM	2	6 µl
Primer MMRT5	400nM	2	6 µl
DNAc	-	5	-

Volume final = 40 µl + 5 µl = 45 µl

Tabela 70 - Parâmetros de termociclagem utilizados para cada uma das etapas da reação da Nested-PCR. Os parâmetros são os mesmos em ambos os protocolos.

Transcriptase Reversa	45°C	45 min	1 ciclo
Ativação da enzima	94°C	2 min	1 ciclo
Desnaturação	94°C	30 seg	35 ciclos
Hibridização	55°C	30 min	
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	10 min	1 ciclo
Temperatura final	4°C	∞	-

Tabela 8 - Descrição do quantitativo utilizado na 1ª etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo com uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®

Reagentes	Concentração	µl/tubo	X (3)
PCR Master Mix (Access Quick-Promega)	2x	12,5	37,5 µl
H₂O Nuclease Free	-	5	15 µl
Primer G17S	400nM	1	3 µl
Primer MMRT6	400nM	1	3 µl
Go Script RT	5nM	0,5	1,5 µl
RNA viral	-	10	
Volume final = 20 µl + 10 µl = 30 µl			

Tabela 9- Descrição do quantitativo utilizado na 2ª etapa da reação de Nested-PCR para avaliação do protocolo com uso da enzima Go Script Reverse Transcriptase da Promega®

Reagentes	Concentração	µl/tubo	X (3)
PCR Master Mix (Access Quick- Promega)	2x	12,5	37,5 µl
H ₂ O Nuclease Free	-	5,5	16,5 µl
Primer MMRT10	400nM	1	3 µl
Primer MMRT5	400nM	1	3 µl
DNAc	-	5	-

Volume final = 20 µl + 5 µl = 25 µl

Uma vez adicionado os substratos e adicionada as amostras e finalizado o tempo da termociclagem, foi realizada a eletroforese em gel de Agarose 0,5%. Para ser considerado adequado o uso do protocolo deveria gerar na revelação do gel o fragmento da sequência no tamanho correto cujo tamanho, para o HIV-1, encontra-se em torno de 1.000 pares de base. Na figura 10 é possível observar a amplificação do fragmento em ambas as amostras onde foi aplicado o protocolo, agora validado, sem uso da *Go Script Reverse Transcriptase*, ou seja, foi utilizada a enzima da transcriptase reversa do próprio vírus, já no protocolo com uso da enzima da Promega® não foi possível a amplificação do fragmento esperado.

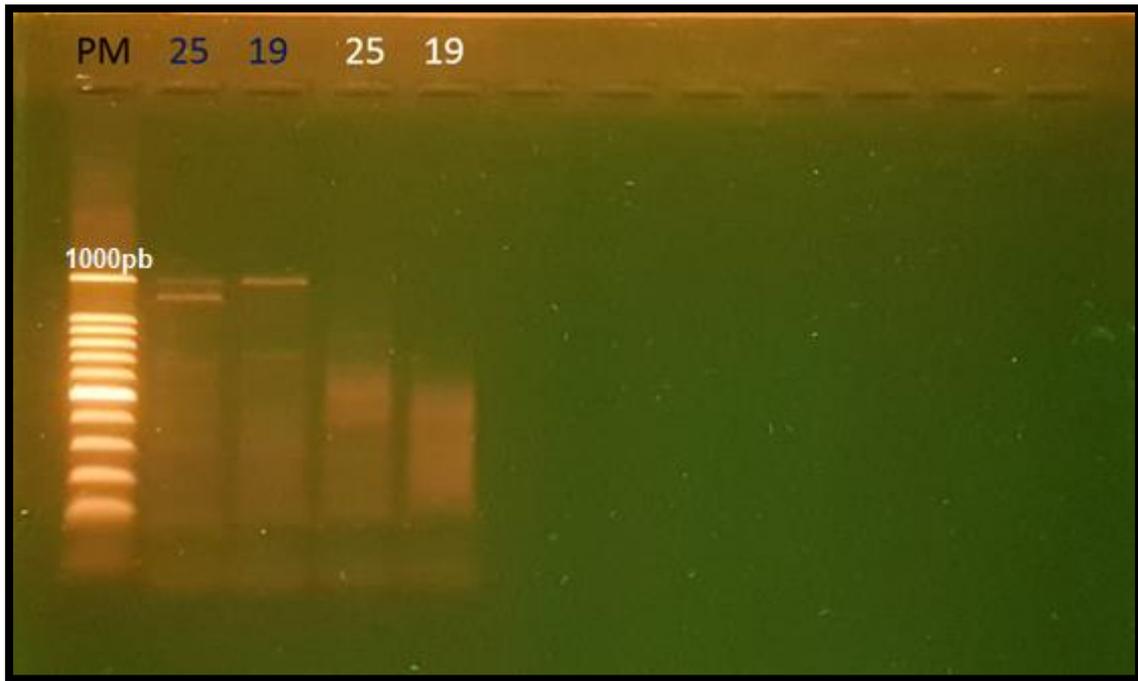


Figura 10 - Revelação dos fragmentos em gel de agarose 0,5%. As amostras destacadas em azul são referentes a aplicação do protocolo alternativo com uso da transcriptase reversa do próprio vírus e maior quantidade de substratos para reação de Nested-PCR enquanto que os destaques em branco referem-se ao protocolo com uso da Go Script Transcriptase Reverse em quantidade reduzida de substratos. PM = Peso Molecular.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil clínico laboratorial das amostras

Amostras reagentes para HIV foram coletados no Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Almino Fernandes do Rio Grande do Norte (LACEN-RN) no período de janeiro a outubro do 2018 totalizando 170 amostras. As amostras foram submetidas aos critérios de inclusão e exclusão para posterior execução da *Nested-PCR*, sequenciamento, caracterização genética, filogenia e modelagem de proteína. A realização da carga viral e contagem de subpopulações linfocitárias de linfócitos T CD4⁺ foram realizadas no LACEN-RN, sendo este o laboratório de referência do estado para realização de carga viral e contagem de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com infecção pelo HIV.

Os indivíduos selecionados para realização do sequenciamento são resultado de diagnóstico tardio, em avançada fase crônica ou mesmo já em estágio AIDS. Dentre os pacientes cujo vírus foi sequenciado, filogeneticamente analisado e a proteína modelada, sete pacientes eram virgens de terapia antirretroviral (avaliação de resistência transmitida) e apenas um encontrava-se em tratamento vigente (avaliação de resistência adquirida). Tais pacientes encontram-se listados na tabela 20.

Foram selecionadas 170 amostras analisando o Laudo Médico para Emissão de Boletim de Produção Ambulatorial (BPA-I) emitido pelo Ministério da Saúde de cada paciente, a seleção contemplou todas as regiões de saúde do Rio Grande do Norte (Lestes Potiguar, Agreste Potiguar, Centro Potiguar, Oeste Potiguar) do período de janeiro à setembro de 2018, todavia apenas 22 amostras atenderam os critérios (descrito anteriormente) para realização da *Nested-PCR*, sendo esta realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Doenças Infecciosas e do Câncer (LADIC) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DMP/UFRN), as demais amostras 148 amostras foram excluídas, por apresentarem carga viral indetectável ou abaixo de 100.000 cópias virais, não sendo gerado resultados. Do total de 22 amostras, 17 apresentaram fragmentos de

materiais genéticos satisfatoriamente amplificados e foram enviadas para sequenciamento do gene Pol (TR/PR) no Núcleo de Genômica da UFRN. Entre as 17 amostras apenas oito foram satisfatoriamente sequenciados e geneticamente caracterizadas, sendo sete filogeneticamente analisadas e em uma delas a proteína foi modelada para análise de mutação.

As informações do perfil clínico laboratorial, a representação do quantitativo de amostras em cada etapa assim como o resumo da condição terapêutica, sexo e carga viral dos 170 pacientes encontram-se na tabela 13 e figuras 11, 12, 13, 14. A tabela 14 organiza os dados referentes aos resultados e médias da carga viral dos pacientes realizados por PCR em tempo real assim como dos valores da contagem dos linfócitos T CD4⁺ por citometria de fluxo utilizando metodologia de 4 cores, condição terapêutica e região de saúde.

Tabela 10 Perfil clínico laboratorial dos 170 pacientes.

Nome / Idade (anos)	Sexo	Local/Região de Saúde	C.V	CD4	TARV	Diagnóstico
1LDM / 38	M	Santo Antônio / AG	16.443	78	Sim (10/12/16)	11/2016
2JJM / 27	M	São Gonçalo do Amarante / LE	24.515	85	Sim	-
3FRBN / 35	F	Touros / LE	471	184	Sim (15/09/14)	-
4ELC / 50	M	Marcelino Vieira / OE	415.888	98	Não	-
5ABC / 34	M	Mossoró / OE	605.983	36	Sim (05/08/05)	10/2004
6RPVF / 38	F	Caicó / CE	73	421	Sim	-
7FHMB / 41	M	Caicó / CE	Não detectável	1.441	Sim (29/05/15)	02/2015
8EKGMS / 21	F	Eloi de Souza / AG	622.803	10	Não	-
1CHCS / 23	M	São Miguel / OE	Não detectável	115	Sim (01/05/17)	03/2017
2VNA / 35	M	Natal / LE	Não detectável	205	Sim (08/11/17)	10/2017
3 FES / 49	M	Pau dos Ferros / OE	Não detectável	123	Sim (25/08/17)	-
4MBS / 52	F	Monte Alegre / AG	Não detectável	56	Sim (19/05/98)	-
5MCC / 44	F	Boa Saúde / AG	84.586	22	Sim (30/01/06)	-
6DSD / 34	M	Natal / LE	478.587	84	Não	02/2018
11NM / 39	M	São Paulo do Potengi / AG	603.157	42	Não	-

8MGN / 43	F	Natal / LE	68.832	502	Não	02/2018
9LSC / 35	M	Mossoró / OE	272.080	18	-	02/2018
1JMJ / 28	M	Nova Cruz / AG	865.058	372	Não	01/2018
2JAP / 36	M	Natal / LE	8.818	418	Não	01/2018
3RBAA / 34	M	Natal / LE	5.939	550	Não	03/2018
1JNPS / 22	M	Lagoa Nova / CE	883.235	492	Sim	-
2BKS / 22	F	Serra Negra do Norte / CE	6.076	393	Sim (08/12/16)	2016
3IFM / 44	F	São Gonçalo do Amarante / LE	84.721	322	Não	09/2016
4EMS / 45	M	Santa Maria / AG	838	508	Sim (01/03/13)	01/2013
5JSN / 62	M	Nova Cruz / AG	45	527	Sim (02/04/18)	02/2018
6TRS / 38	M	Ceará-Mirim / LE	36.362	189	Sim (20/05/14)	05/2013
7DPP / 35	F	Acari / CE	159	660	Sim (2014)	-
8JAMB / 30	M	Tangará / AG	37.133	390	Não	-
20VHGN / 36	M	Natal / LE	771.036	322	Não	-
10PJO / 68	M	Rafael Fernandes / OE	Não detectável	373	Sim (28/04/15)	01/2015
1AFO / 29	M	Natal / LE	13.537	589	Não	04/2018
2ECDA / 32	F	Natal / LE	62.929	168	Não	03/2018
3ESS / 41	M	Poço Branco / AG	35.588	221	Sim (09/17)	08/2017

4FV / 57	F	Poço Branco / AG	Não detectável	332	Sim (06/17)	06/2017
5MCXS / 30	M	Pendências / OE	Não detectável	700	Sim (17/04/17)	08/2016
6MAA / 31	F	Mossoró / OE	488.643	55	Sim (01/05/10)	02/2010
7AAS / 49	M	Mossoró / OE	385.629	14	Sim (28/02/14)	01/2014
8JCBN / 23	M	Caicó / CE	Não detectável	255	-	05/2017
1MFJ / 37	M	Natal / LE	357.030	155	Não	-
2CC / 52	M	Natal / LE	66	281	Sim (28/03/18)	-
3BE / 52	M	Santo Antônio / AG	Não detectável	222	Sim (10/09/07)	08/2007
4GMS / 54	M	Nova Cruz / AG	Não detectável	224	Sim (01/01/07)	-
5JGS / 18	M	Nova Cruz / AG	930	1.599	Sim (04/05/18)	2009
6RPVF / 38	F	São João do Sabugi / CE	Não detectável	653	Sim (02/01/03)	11/1996
7FS / 33	M	Ouro Branco / CE	Não detectável	1.150	Sim (05/08/15)	05/2014
8MBS / 70	M	Parelhas / CE	39.244	567	Sim (07/02/18)	02/2018
1CCPS / 35	M	Mossoró / OE	Não detectável	617	Não	06/2018
2MFF / 46	M	Natal / LE	1.199.268	237	Não	05/2018
3MIS / 53	F	Natal / LE	36.807	1.000	Sim	02/2018
4MCG / 44	M	Natal / LE	59.226	631	Não	-
5BSD / 25	F	Nova Cruz / AG	8.717	570	Sim	-

6AMV / 57	M	Nova Cruz / AG	Não detectável	657	Sim	-
7CLS / 48	M	Rodolfo Fernandes / OE	31.668	923	Sim	11/2017
2FHM / 34	M	Mossoró / OE	366.970	412	Não	07/2018
9RRS / 54	M	Mossoró / OE	52.843	401	Sim (17/01/18)	12/2017
10MAAF / 35	M	Patú / OE	1.356	453	Não	07/2018
11RMS / 29	M	Mossoró / OE	40	337	Sim (17/11/17)	10/2017
12MCS / 9	F	Mossoró / OE	64.226	542	Sim	08/2009
13FHVC / 26	M	Mossoró / OE	146	182	Sim (28/03/18)	01/2018
14JNNC / 50	M	Mossoró / OE	Não detectável	922	Sim (16/05/06)	07/2005
15EJOL / 30	M	Mossoró / OE	60	513	Sim (17/01/18)	12/2017
16MFM / 22	F	Mossoró / OE	63.697	1.095	Sim (27/12/18)	12/2017
17FCF / 40	M	Mossoró / OE	55	226	Sim (05/05/17)	04/2017
18GBS / 31	M	Parelhas / CE	12.380	144	Sim (13/12/13)	12/2013
19DS / 45	M	Santana do Matos / CE	1.696	176	Sim	-
6LMA / 48	M	Natal / LE	1.761	292	Sim (30/12/14)	12/2014
7GJSS / 19	M	Jucurutu / CE	4.782	272	Sim	-
8LN / 45	M	Currais Novos / OE	379.835	39	Sim	-

11JAS / 41	M	São José do Seridó / CE	20.913	328	Sim	-
12LGS / 50	M	Jardim do Seridó / CE	Não detectável	389	Sim (19/09/00)	-
13ESGS / 24	F	Jucurutu / CE	59.915	428	Sim	-
14LBA / 36	F	Touros / LE	11.151	218	Sim	10/2008
22JBS / 42	M	Macaíba / LE	81.412	671	Não	-
23JMS / 59	M	Natal / LE	1.295.845	101	Não	06/2018
24RHGB / 41	M	Natal / LE	41	378	Sim	01/2016
31JSSN / 26	M	Natal / LE	Não detectável	473	Sim	-
18CAS / 35	M	Baraúna / OE	Não detectável	608	Sim (01/06/12)	05/2009
23AZF / *	F	Mossoró / OE	Não detectável	363	Não	08/2018
25JFO / 68	M	Apodi / OE	1.761	292	Sim	12/2017
28FRML / 35	M	Apodi / OE	727	421	Sim	-
44FFS / 29	F	Mossoró / OE	Não detectável	520	Sim (04/04/18)	-
46AJPFM / *	M	Mossoró / OE	Não detectável	396	Sim (04/04/18)	03/2018
47AJSF / 8	M	Mossoró / OE	Não detectável	971	Sim (04/04/18)	03/2018
53LELD / 16	M	Assú / OE	5.562	331	Não	08/2018
2STS / 59	M	Canguaretama / LE	1.428.678	29	Não	-
3NVS / 15	F	Natal / LE	1.259	398	Sim (01/02/04)	-

6TESJ / 25	M	Natal / LE	41.699	707	Não	-
8RSN / 30	M	Natal / LE	61.181	470	Não	-
9AGFP / 27	M	Natal / LE	Não detectável	423	Não	-
10JFF / 39	M	Natal / LE	101.767	424	Não	-
11ACS / 42	M	Macaíba / LE	293.596	31	Sim (01/08/10)	-
13JVO / 51	M	Natal / LE	26	784	Sim	-
14ALTM / 32	F	Nísia Floresta / LE	14.353	486	Não	-
1JVSJ / 23	M	Macau / LE	54.398	388	Não	-
3EJLA / 25	M	Natal / LE	237	637	Sim (01/08/12)	08/2012
4WASS / 34	M	Natal / LE	70.826	155	Não	-
8FFR / 1	M	Natal / LE	136	2.253	Sim (24/05/17)	05/2017
10RML / 22	M	Natal / LE	1.364	447	Sim	-
12OSC / 45	M	Ceará-Mirim / LE	Não detectável	487	Sim (04/07/11)	02/2011
13ECN / 32	M	Rio do Fogo / LE	39.163	305	Sim (01/12/15)	12/2015
13CAQ / 25	M	Mossoró / OE	525	436	Sim (17/01/18)	12/2017
14APC / 58	F	Barcelona / AG	199	346	Sim (28/09/16)	07/2016
18FES / 32	M	Mossoró / OE	106	101	Sim (10/07/17)	10/2016
30JBS / 70	M	Assú / OE	265	379	Sim	08/2018
32MCM / 23	M	Assú / OE	1058	352	Sim (05/01/18)	07/2017

33VRS / 40	M	Assú / OE	98.339	261	Sim (25/01/08)	05/1999
39ASO / 47	M	Mossoró / OE	774	469	Sim (21/03/18)	12/2017
27WCO / 40	M	Natal / LE	712	521	Sim	2013
38EJFF / 39	F	Natal / LE	83	687	Sim (26/11/08)	-
2AKSC / 23	M	Natal / LE	98	863	Sim	09/2017
8JFS / 40	M	Natal / LE	430	387	Sim (13/06/06)	06/2006
16DFCS / 51	M	São José do Campestre / AG	438	302	Sim (29/10/03)	-
3CB / 38	M	Poço Branco / AG	Não detectável	512	Sim (17/12/09)	-
2MRFC / 46	F	Mossoró / OE	Não detectável	469	Sim (26/05/17)	-
23RAA / 35	M	Triunfo Potiguar / OE	Não detectável	708	Sim (2000)	08/1996
25GFB / 60	M	Mossoró / OE	Não detectável	635	Sim (16/08/2011)	11/2010
34RMPS / 20	F	Açu / OE	56.789	420	Não	08/2018
38FBS / 22	F	Angicos / CE	Não detectável	382	Sim (23/01/15)	05/2012
42FLF / 63	M	Mossoró / OE	Não detectável	427	Sim (12/09/05)	09/2005
43SER / 29	M	Mossoró / OE	Não detectável	350	Sim (08/05/18)	05/2018
45EM / 44	M	Caraúbas / OE	Não detectável	369	Sim (15/07/18)	07/2018

6IPS / 47	M	Parnamirim / LE	Não detectável	458	Sim (22/09/14)	09/2014
7CGS / 33	M	Nísia Floresta / LE	Não detectável	574	Sim 22/05/17)	05/2017
8ERG / 39	F	Natal / LE	Não detectável	496	Sim (29/09/14)	09/2014
13FVB / 62	M	Natal / LE	71.820	356	Sim	09/2013
10GBS / 71	M	Natal / LE	11.645	387	Sim (06/06/97)	-
11FNC / 26	M	Natal / LE	Não detectável	896	-	06/2016
14MMM / 55	F	São José do Mipibu / LE	53.967	217	Não	-
5AFGS / 37	M	Natal / LE	Não detectável	389	-	-
18FAP / 47	M	Natal / LE	Não detectável	665	Sim (24/07/18)	-
12JAFJ / 23	M	João Câmara / LE	45.747	387	Não	07/2018
11LMF / 46	M	Natal / LE	Não detectável	257	Sim (01/01/07)	01/2006
21APS / 27	F	Guamaré / LE	5.886	367	Sim (01/01/11)	09/2011
23JRSC / 53	M	Natal / LE	57	458	Sim (01/06/10)	-
8RLM / 36	M	Natal / LE	267	441	Sim (12/07/18)	-
17JLC / 38	M	Natal / LE	71.332	401	Não	-
3JMM / 48	M	Natal / LE	96.374	329	Não	-
45EAS / 41	M	Mossoró / OE	Não detectável	416	Sim (04/05/07)	04/2007
29MAC / 54	F	Angicos / CE	74.236	97	Não	09/2018

26BJLS / 21	M	Mossoró / OE	Não detectável	387	Sim (26/07/18)	-
25DS / 42	F	Mossoró / OE	82.932	50	Sim (02/09/08)	06/2008
24ALS / *	F	Mossoró / OE	97.254	108	Não	09/2018
16JFOS / *	M	Apodi / OE	1.451.725	106	Não	09/2018
10MNR / *	F	Patu / OE	Não detectável	452	Sim (15/01/10)	01/2010
1MAJB / 39	F	Mossoró / OE	1.623.741	204	Não	09/2018
21AOC / 22	M	Natal / LE	78.787	98	Não	09/2018
20JAAS / 18	F	Natal / LE	54.234	278	Não	-
14MGBSL / 47	F	Macaíba / LE	4.235.623	32	Não	-
1WSC / 39	M	Natal / LE	94.369	72	Não	-
28DJC / 48	M	Angicos / CE	45.254	147	Não	09/2018
6MLGR / 24	F	São José do Mipibu / LE	Não detectável	298	Sim	-
15EAB / 30	M	Jardim do Seridó / CE	Não detectável	369	Sim (25/04/18)	04/2018
16DAD / 26	M	Jardim do Seridó / CE	Não detectável	457	Sim (25/04/18)	03/2018
17CCSJ / 35	M	Caicó / CE	Não detectável	415	Sim (17/08/17)	08/2017
19VOBS / 47	F	Montanhas / LE	Não detectável	341	Sim	12/2014
30KFS / 33	F	Itaú / OE	Não detectável	256	Sim	-
33JFSN / 40	M	Natal / LE	Não detectável	696	Sim	04/2013

41AMTF / 39	M	São Gonçalo do Amarante / LE	Não detectável	412	Sim	10/2018
46EFS / 48	M	Natal / LE	Não detectável	874	Sim (02/01/00)	04/1998
6GSS / 38	M	Natal / LE	Não detectável	423	Sim	07/2016
10CEAT / 4	F	Natal / LE	62	555	Sim (01/10/18)	06/2018
13ELP / 46	F	Natal / LE	Não detectável	378	Sim	-
12ELL / 49	F	Extremoz / LE	125	445	Sim (01/11/05)	03/2002
1PSD / 40	F	Serra do Mel / OE	Não detectável	741	Sim (24/02/16)	01/2016
15MPS / 79	M	Mossoró / OE	Não detectável	643	Sim (28/09/12)	08/2012
19JHNS / 25	M	Mossoró / OE	Não detectável	450	Sim (28/02/13)	01/2013
22JVAS / 17	M	Apodi / CE	74.987	345	Não	10/2018
23CAS / 45	M	Angicos / CE	Não detectável	241	Sim (21/08/18)	07/2018
28MJL / 53	M	Baraúna / OE	Não detectável	356	Sim (25/08/15)	07/2015
29ARS / 42	M	Ipangaçu / CE	Não detectável	387	Sim (10/08/18)	-

Legenda: LE = Leste Potiguar / OE = Oeste Potiguar / AG = Agreste Potiguar / CE = Centro Potiguar.
As datas entre parênteses representam a data de início do primeiro ARV. (*) = Sem registro.

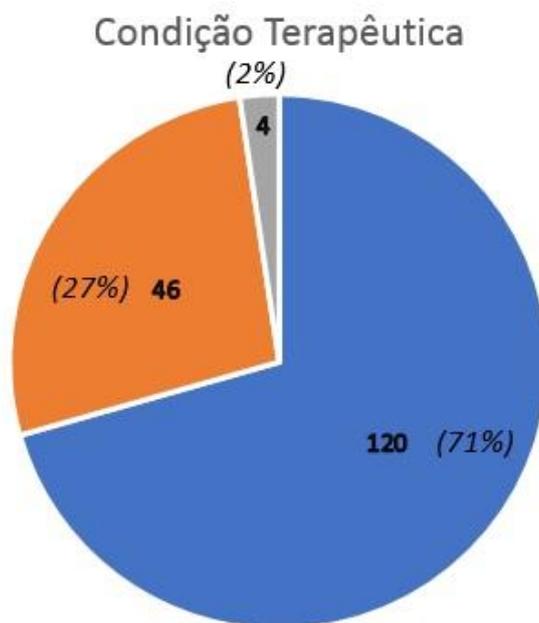


Figura 11 - Resumo da condição terapêutica dos pacientes do estudo.

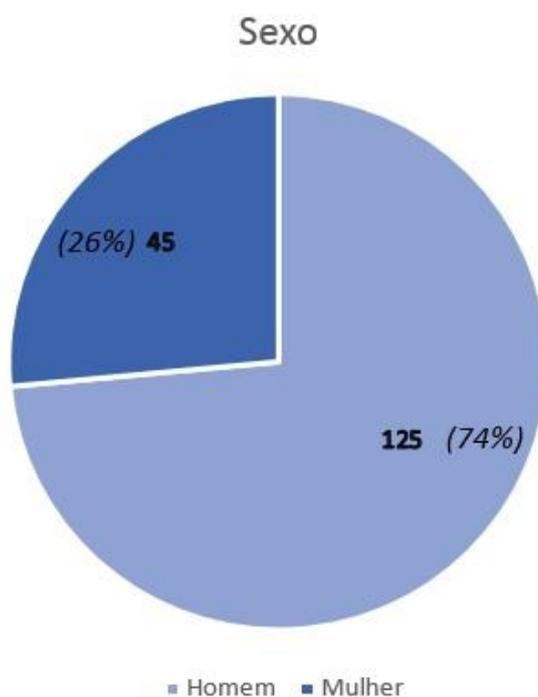


Figura 12 – Resumo estatístico do sexo dos pacientes do estudo.

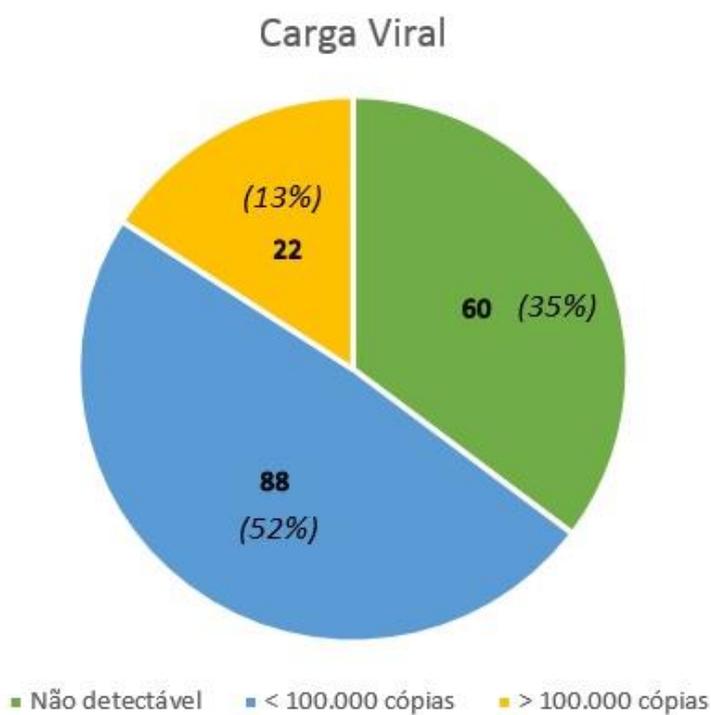


Figura 13 - Resumo da carga viral dos pacientes do estudo.

Quantitativo das amostras no estudo

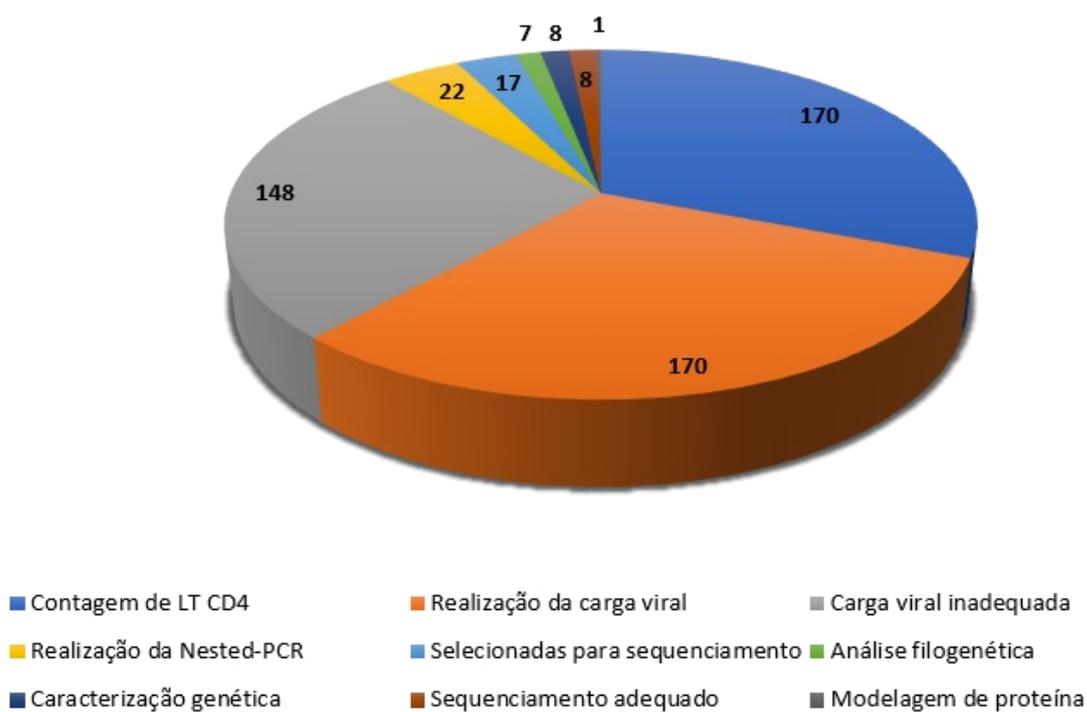


Figura 14 - Descrição do quantitativo de amostras em cada etapa do estudo.

Tabela 11 - Valores da carga viral e contagem de linfócitos T CD4 dos pacientes enviados para sequenciamento.

Amostras	Condição terapêutica	Região de saúde	Carga viral / log	CD4	Média carga viral / CD4
20VHGN	Virgem	Leste potiguar	771.036 cópias/mL plasma / log 5.852	322 células/ μ L sangue	810.598 cópias/mL plasma / 195,6 células/ μ L sangue
11NM	Virgem	Agrete potiguar	603.157 cópias/mL plasma / log 5.780	42 células/ μ L sangue	
2STS	Virgem	Leste potiguar	1.428.678 cópias/mL plasma / log 6.155	29 células/ μ L sangue	
10JFF	Virgem	Leste potiguar	101.767 cópias/mL plasma / log 5.008	424 células/ μ L sangue	
11ACS	Em TARV	Leste potiguar	293.596 cópias/mL plasma / log 5.008	31 células/ μ L sangue	
23JMS	Virgem	Leste potiguar	1.295.845 cópias/mL plasma / log 6.113	101 células/ μ L sangue	
1MAJB	Virgem	Oeste potiguar	1.623.741 cópias/mL plasma / log 6.211	204 células/ μ L sangue	
2FHM	Virgem	Oeste potiguar	366.970 cópias/mL plasma / log 5.565	412 células/ μ L sangue	

5.2 Caracterização Genética

As amostras com bons resultados foram aquelas cujos resultados de fragmentos foram bem definidas na eletroforese com tamanho de aproximadamente 1.000 pares de base. Esses fragmentos de amplificação do segmento gênico Pol foram enviados para sequenciamento. A porcentagem da região Pol amplificada foi calculada baseado na capacidade de extensão do par de *inner primers* utilizados nas reações de *Nested-PCR*. As amostras foram subtipadas através da utilização do REGA HIV Subtyping Tool v.3.4 e confirmadas posteriormente na construção da árvore filogenética. O local de residência dos pacientes foi obtido através da consulta do Laudo Médico para Emissão de BPA-I emitido pelo Ministério da Saúde. As informações encontram-se na tabela 15.

Tabela 12 - Valores percentuais da região sequenciada do gene da PR e TR, resultado da subtipagem viral e localidade dos pacientes

Amostra	Nested-PCR (Região Pol)	Classificação viral	Mesorregião	Local
20VHGN	100% PR, 47,3% TR	HIV-1 (M) F1	Leste Potiguar	Natal
11NM	100% PR, 25% TR	HIV-1 (M) B	Agreste Potiguar	São Paulo do Potengi
2STS	100% PR, 37,4% TR	HIV-1 (M) B	Leste Potiguar	Canguaretama
10JFF	100% PR, 50,5% TR	HIV-1 (M) B	Leste Potiguar	Natal
11ACS	0% PR, 48,3% TR	HIV-1 (M) B	Leste Potiguar	Macaíba
23JMS	100% PR, 48,3% TR	HIV-1 (M) B	Leste Potiguar	Natal
1MAJB	100%PR, 63,4% TR	HIV-1 (M) C	Oeste Potiguar	Mossoró
2FHM	100% PR, 57,7% TR	HIV-1 (M) B	Oeste Potiguar	Mossoró

5.3 Mutações e Perfil de Resistência aos ARV's

Análise de possíveis mutações das sequências analisadas na região da TR e PR, do segmento gênico Pol, foram realizadas e interpretadas por intermédio do algoritmo de interpretação de resistência genotípica (HIVdb *Program* versão 8.7 – *Genotypic Resistance Interpretation Algorithm*; <http://hivdb.stanford.edu>). Foram evidenciadas mutações importantes na transcriptase reversa (primárias) e na protease viral (acessórias). Os resultados encontram-se na tabela 16.

Tabela 13 - Mutações primárias e acessórias associados a resistência à inibidores de protease, inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo e inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleotídeo.

Amostras	Subtipo	Mutações			Perfil de resistência		
		IP	ITRN	ITRNN	Baixo	Intermediário	Alto
20VHGN	F1	K20T, Q58E	-	-	-	-	-
11NM	B	-	M41L, K65R, D67A, T69L_ELA, K70E, L74I	-	-	AZT	ABC, FTC, 3TC, TDF
2STS	B	-	-	-	-	-	-
10JFF	B	-	M41L, M184V, L210W, T215Y	-	-	TDF	ABC, AZT, FTC, 3TC
11ACS*	B	-**	M41L, M184V, T215Y	K103N, V108I	TDF, DOR	ABC, AZT	FTC,3TC, EFV, NVP
23JMS	B	-	-	-	-	-	-
1MAJB	C	-	F77L	-	***AZT	-	-
2FHM	B	L10V	-	-	-	-	-

*Suscetível a ETR e RPV / ** Tamanho insuficiente para análise do gene da PR / *** Redução em potencial

Mutações primárias encontram-se destacadas, ao contrário das mutações acessórias. IP, inibidor de protease; ITRN, inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo; ITRNN, inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleotídeo. ABC, abacavir; FTC, emtricitabina; 3TC, lamivudina; TDF, tenofovir; AZT, zidovudina; EFV, efavirenz; NVP, nevirapina; DOR, doravirina.

As mutações primárias encontradas com maiores frequências foram a M41L, M184V, T215Y, todas elas se localizam no gene sequenciado que codifica a proteína da transcriptase reversa viral e são clinicamente relevantes por prejudicarem o tratamento com os ITR. A classe farmacológica mais afetada dentro dos ITR foram os ITRN cujos fármacos fazem parte, como componente, da primeira linha de tratamento. Entre os três pacientes com mutações primárias importantes para o tratamento dois eram virgens de terapia. Informações encontram-se na tabela 17.

Tabela 14 - Descrição das mutações encontradas com maior frequência e o seu impacto na terapia antirretroviral.

Mutações	Amostras	Terapia Antirretroviral		
		Virgem	Vigência	ARV afetado
M41L	11NM; 10JFF; 11ACS	11NM; 10JFF	11ACS	ITRN
M184V	10JFF; 11ACS	10JFF	11ACS	ITRN
T215Y	10JFF; 11ACS	10JFF	11ACS	ITRN

5.4 Análise Filogenética

A construção da árvore filogenética foi realizado com auxílio do MEGA® versão 7.0.26 (<http://www.megasoftware.net/>). Foram utilizadas diversas sequências referências de diferentes clados filogenéticos do HIV coletadas no Los Alamos HIV *database* (<http://www.hiv.lanl.gov>). A árvore filogenética gerada foi realizada utilizando o método *Maximum Likelihood* (Máxima Verossimilhança) e *modelo General Time Reversible* com distribuição *Gamma*. Entre as cinco amostras sequenciadas apenas em uma delas não foi possível a construção da árvore filogenética devido ao pouco tamanho da sequência, todavia foi suficiente para realização da subtipagem. A representação gráfica da filogenia encontra-se nas figuras 15 e 16.

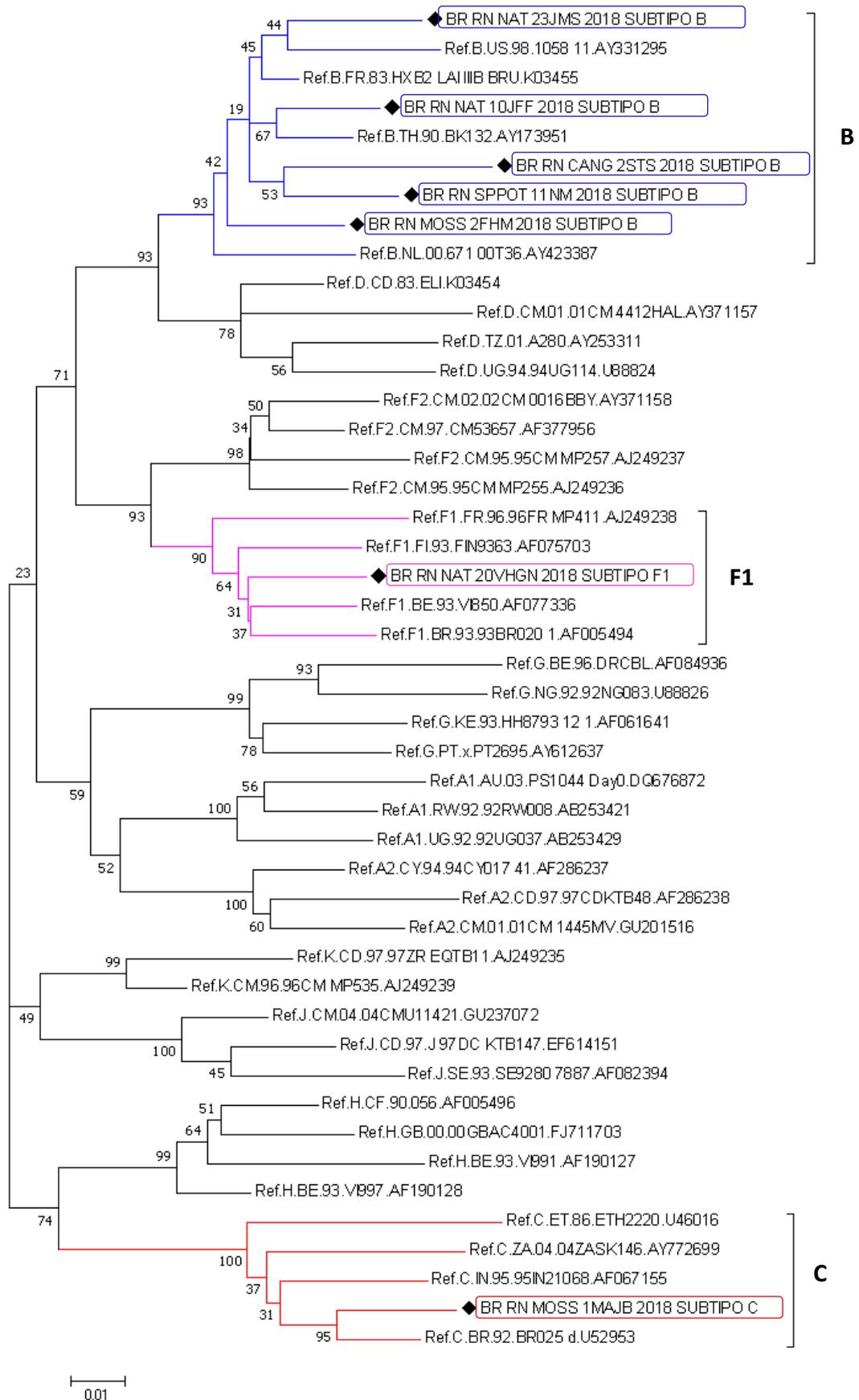


Figura 15 - Árvore filogenética distribuída em ramos. Ramos vermelhos, lilás e azuis referentes aos clados C, F1 e B do HIV-1, respectivamente. Amostras deste estudo encontram-se destacadas.

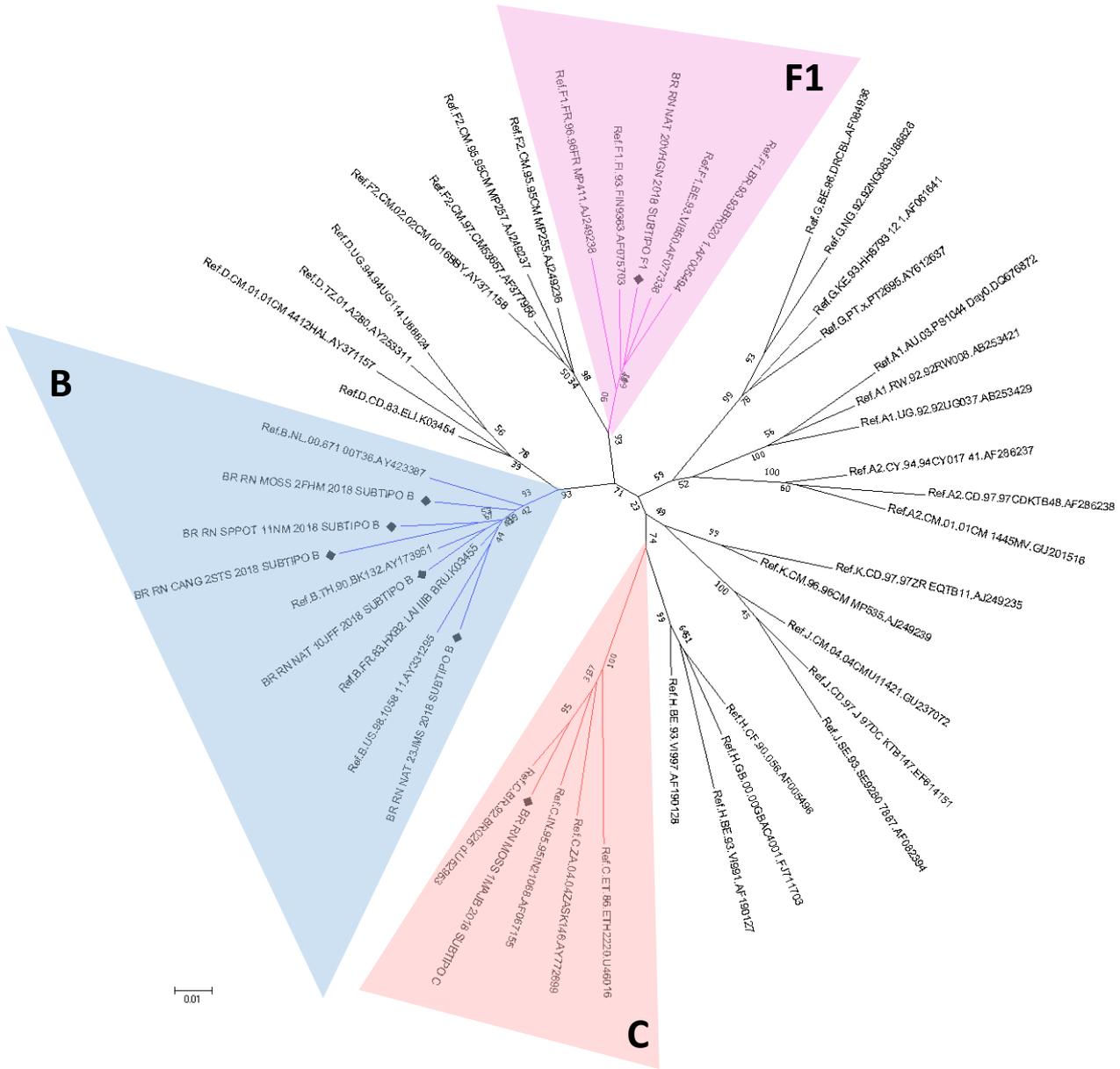


Figura 16 - Árvore filogenética em topografia radial. Os retângulos vermelho, lilás e azul são referentes aos clados C, F1 e B do HIV-1, respectivamente. Amostras do RN são precedidas de marcação em losango.

5.5 Modelagem de Proteína

A modelagem proteica contendo as mutações contempla as descritas anteriormente (tabela 17) como sendo aquelas de maiores frequências além da mutação L210W. A mutação M41L encontra-se representada na figura 18. A modelagem foi realizado por intermédio do *software* UCFS Chimera® versão 1.13.1 (<http://www.cgl.usfc.edu/chimera/>) e refere-se a um fragmento da enzima transcriptase reversa contemplando as mutações M184V, L210W e T215Y conforme indicado na figura 17.

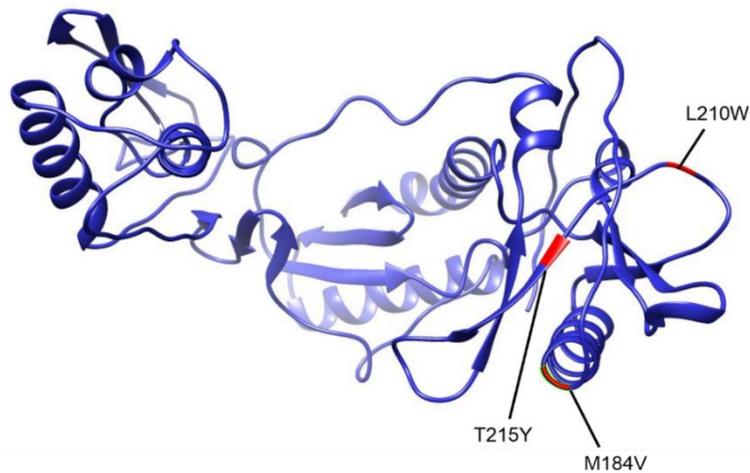


Figura 17 - Modelagem de fragmento da transcriptase reversa contendo as mutações M184V, L210W e T215Y.

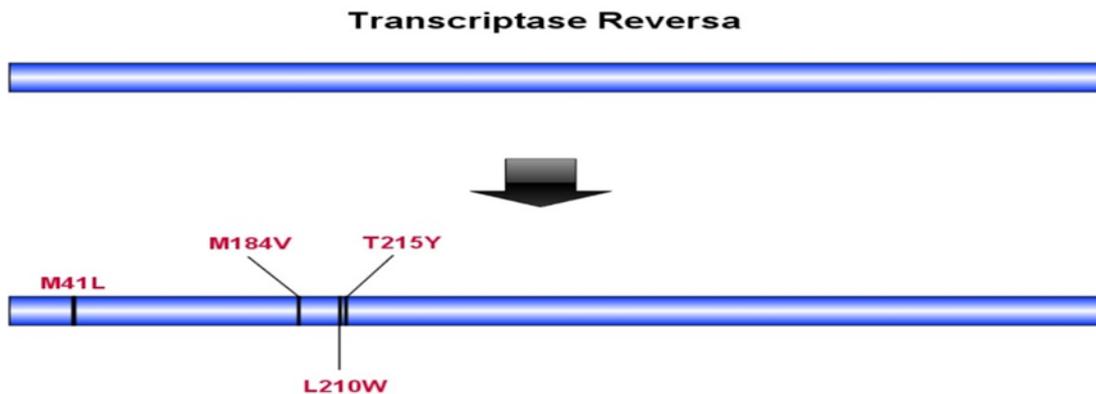


Figura 18 - Representação gráfica da transcriptase reversa contendo as mutações M41L, M184V, T215Y, L210W.

6 DISCUSSÃO

Ao realizar análise filogenética a partir de sequências de HIV-1 circulante entre os pacientes do Rio Grande do Norte constatou-se predomínio do subtipo B, seguido pelo subtipo F1 e C (Tabela 19) como já também evidenciado em outros estudos (PINTO, 2004; DELATORRE et al., 2017). Outros estudos sugerem predomínio do subtipo B no nordeste à semelhança da região sudeste e norte do Brasil (BRASIL, 2016; DELATORRE et al., 2017; GADELHA et al., 2003; VÉRAS, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) em seu relatório de 2017 alerta para o crescimento da prevalência de cepas virais resistentes aos ARVs. O Brasil foi avaliado quanto ao índice de prevalência do HIV resistente transmitido indicando um índice de 6,8% aos antirretrovirais da primeira linha de tratamento (EFV/NVP – ITRNN) todavia apresenta índice de 9,8% quando levado em consideração as demais classes de ARV's. Os valores estipulados pela OMS como limite são 10%, índices acima devem levar o país a rever seus protocolos terapêuticos afim de impedir o avanço da resistência aos ARV's. O relatório chama atenção para as seguintes mutações: K101EP, K103NS, V106AM, Y181, Y188, G190, P225H, M41L, D67EGN, K70ER, V75AMST, M184IV, L210W, T215, K219, além de outras mutações aos ITRN e ITRNN. Quanto as mutações mais prevalentes destacam-se no Brasil a K103NS, M41L, T215, M184IV, K219 (WHO, 2017). Ao analisar o gene *pol*, mais especificamente o segmento da protease viral e parte do segmento da transcriptase viral foram achadas, neste estudo, mutações importantes de relevância clínica na TARV.

O presente estudo encontrou mutações consistentes ao relatório da OMS em pacientes virgens de terapia (resistência transmitida) e em um paciente com terapia vigente (resistência adquirida). As principais mutações encontradas foram M41L, M184V, T215Y. No paciente em terapia vigente foi encontrado mutações como K103N, V108I, sendo a primeira uma mutação principal e a segunda mutação acessória. As primeiras mutações estão relacionadas ao uso de ITRN enquanto que as segundas mutações citadas estão relacionadas ao uso de ITRNN. Outras mutações encontradas foram K65R, D67A, K70E, L74I, T69L, L210W e são

selecionadas a partir do uso de ITRN. Foram encontradas também mutações acessórias tais como K20T e Q58E relacionados aos IP.

As mutações M184V, K65R, K70E, L74I encontradas nos vírus circulantes nos pacientes no Rio Grande do Norte são classificadas na literatura como mutações discriminatórias selecionadas por uso de ITRN. As mutações discriminatórias são alterações que permitem a transcriptase reversa viral discriminar entre o substrato natural e o ITRN, ou seja, nessas mutações o vírus é capaz de discriminar por exemplo a citosina à 3TC (CLAVEL & HANCE, 2004).

A mutação M184V é considerada uma mutação comum e a mais importante entre as discriminatórias, é facilmente selecionada pelo tratamento com 3TC (baixa barreira genética) e confere alta resistência a este fármaco e também ao FTC (TANG & SHAFER, 2012). Esta mutação também confere resistência cruzada intermediária ao ABC e ddl, todavia não é uma contraindicação do tratamento pois o vírus contendo esta mutação ainda é sensível ao AZT, TDF e d4T (POUGA et al., 2018; STANFORD, 2018a).

A mutação K65R é considerada a segunda mutação mais comum entre as discriminatórias e é primariamente selecionada pelo uso de TDF e menos selecionados pelo ddl, ABC e d4T. A mutação K65R confere resistência intermediária ao TDF, ABC, ddl, 3TC e FTC, confere baixa resistência ao d4T porém aumenta suscetibilidade ao AZT (STANFORD, 2018a; TANG & SHAFER, 2012). Quando o paciente apresenta as mutações M184V e K65R juntas existe alta resistência ao ABC, ou seja, duas mutações podem levar a uma resistência completa aos ITRNs, caracterizando baixa barreira genética destes ARVs (DIAZ, 2016).

Outras mutações discriminatórias encontradas nos vírus detectados nos pacientes deste estudo como K70E e L74I conferem resistência aos ITRN. A K70E confere baixa resistência ao TDF, ABC, ddl e possivelmente ao 3TC e FTC, porém aumenta suscetibilidade ao AZT e d4T. A presença da mutação L74I confere resistência elevada ao ddl e intermediária ao ABC (BRADSHAW et al., 2007; STANFORD, 2018a).

As mutações M41L, L210W, T215Y e T69ins foram mutações encontradas nos vírus circulantes em pacientes deste estudo e são classificadas na literatura como

mutações selecionadas pelos análogos da timidina (TAM) AZT ou d4T. Este grupo de mutações, quando presentes, concedem a capacidade ao vírus de aprimorar a capacidade de remoção hidrolítica do ITRN incorporado em um processo conhecido como pirofosforólise mediada pelo ATP, promovendo assim uma excisão e conseqüentemente uma resistência aos ITRN, exceto 3TC (IYIDOGAN & ANDERSON, 2014; TANG & SHAFER, 2012). As mutações do tipo TAM conferem resistência cruzada para o TDF, ABC e ddl e ocorrem em duas vias mutacionais distintas, TAM1 e TAM2. As mutações do tipo TAM1 envolvem seleções dos códons M41L, L210W e T215Y, enquanto que a via TAM2 selecionam os códons D67N, K70R e K219QEM. A via TAM1 é a causa maior do nível de resistência clínica e fenotípica para os análogos de timidina e resistência cruzada ao TDF, ABC e ddl quando comparado a via TAM2. A via TAM1 (encontrada neste estudo) também é encontrado com mais frequência no subtipo B do HIV-1. As mutações TAM proporcionam redução da suscetibilidade *in vitro* em grau variado a todos os ITRN e seu acúmulo é causa de múltipla resistência aos ARV (MDR) (ALBUQUERQUE, 2016; TANG & SHAFER, 2012).

Em um dos vírus sequenciados entre pacientes deste estudo foi encontrado a presença de inserção no códon 69 da transcriptase reversa viral, este tipo de mutação pode ser selecionado por qualquer ITRN, embora seja mais comum na presença de outras TAM (MILLER et al., 2004). A T69ins geralmente confere ampla resistência aos ITRN, e na presença de outras TAM confere resistência intermediária ao 3TC e FTC, elevada resistência aos demais ITRN (STANFORD, 2018a).

A mutação D67A, encontrada em um dos vírus sequenciados de pacientes deste estudo, é considerada uma mutação extremamente não comum pelo algoritmo de interpretação de mutações do HIV *Resistance Database* da *Stanford University*. Outros estudos mostram que as mutações mais encontradas neste códon são classificadas como mutações TAM (D67N e D67G/ESTH) (MARCELIN, 2006; MARCELIN et al., 2004; STANFORD, 2018a; TOLEDO et al., 2010). A mutação D67A foi apontada em alguns estudos na literatura como uma mutação acessória atípica, sendo o estudo de Gashnikova et al., 2003, considerando tal alteração atípica, *in vitro*, como selecionada pelo AZT e conferindo resistência fenotípica ao mesmo em até 160 vezes quando comparado a linhagens sensíveis (GASHNIKOVA et al., 2003; HANDEMA et al., 2003).

Em um dos pacientes deste estudo o vírus sequenciado apresentou a mutação K103N, tal paciente encontra-se em vigência de TARV. A mutação citada é classificada como mutação selecionada pelo uso de ITRNN (AKINSETE et al., 2004). As mutações selecionadas por algum ITRNN confere, ao vírus, uma mudança conformacional significativa na porção hidrofóbica (ou adjacente a ela) próxima ao sítio ativo da TR a ponto de impedir a inibição alostérica causada por esta classe de ARV, a eficácia dos ITRNN dependem desta inibição para afetar a flexibilidade enzimática viral bloqueando sua capacidade de polimerizar o DNA (CLAVEL & HANCE, 2004; REN & STAMMERS, 2008). A mutação K103N é a mais comum alteração relatada como resistente aos ITRNN (REN & STAMMERS, 2008), tal mutação confere elevada resistência a NVP e EFV (DIAZ, 2011), provocando redução de 50 vezes e 20 vezes a suscetibilidade destes fármacos, respectivamente. (STANFORD, 2018b).

A presença da mutação F77L em um dos vírus circulantes em um dos pacientes da região oeste (1MAJB) é classificado como uma mutação acessória relacionada ao uso de ITRN, geralmente associado a mutação Q151M formando um complexo (A62V, V75I, F77L e F116Y) de multirresistência aos ITRN via mecanismo de discriminação de substratos (DAS et al., 2017; DIAZ, 2011; TANG & SHAFER, 2012). A mutação primária Q151M pode, sozinha, conferir resistência aos ITRN todavia promove prejuízo ao *fitness* viral, mutações que formam o complexo como a F77L compensam a deficiência do *fitness* ao tornar o vírus mutante competente em replicar seu material genético (DAS et al., 2017). Apesar da mutação F77L estar relacionada, primariamente, a mutações que apresentam mecanismo de discriminação de substratos é possível que a mesma apresenta algum papel na contribuição em mecanismos de excisão nucleotídica vista nas mutações tipo TAM (METEER et al., 2014). Sua presença isolada, contudo, apresenta relevância clínica incerta podendo alguns pacientes apresentarem uma baixa redução da suscetibilidade ao AZT em potencial (STANFORD, 2018a).

Entre os HIV-1 sequenciados neste estudo não foram encontradas mutações principais selecionados por uso dos IP, todavia foi identificado presença de mutações acessórias que compensam o *fitness* viral e conseqüente aumento de resistência a estes ARVs como a Q58E, K20T e L10V (BUDAMBULA et al., 2015; FRANÇA et al., 2018; GASHNIKOVA et al., 2016; NAMAKOOLA et al., 2016; TANG & SHAFER,

2012). Apesar de não se constituírem mutações principais as mutações acessórias compensam a diminuição do *fitness* viral ocasionado pelas mutações principais e ajudam, na presença destas, a reduzirem ainda mais a suscetibilidade dos IP. As mutações acessórias ou secundárias dos IP ocorrem em regiões não ativas da protease e conferem estabilidade a enzima, ao lado das mutações secundárias outros mecanismos moleculares ajudam a aprimorar o *fitness* do vírus mutante aos IP. A mutação Q58E auxilia na redução da suscetibilidade do TPV/r (IYIDOGAN & ANDERSON, 2014; STANFORD, 2018c), enquanto K20T provoca diminuição da suscetibilidade de cada IP com exceção do DRV e TPV (MARCK et al., 2009; RHEE et al., 2010), a presença isolada da mutação L10V não leva a perda de suscetibilidade aos IP (STANFORD, 2018c).

Os profissionais médicos infectologistas que acompanham clinicamente os pacientes deste estudo foram alertados para a presença das mutações afim de direcionar um esquema antirretroviral mais adequado e personalizado para a necessidade de cada paciente, com isso espera-se uma maior eficácia terapêutica traduzindo em supressão da replicação do vírus interrompendo assim a cadeia de transmissão e promovendo melhor qualidade de vida para os pacientes. A indicação terapêutica mais adequada são esquemas contendo dois ITRN associado preferencialmente a INI (Dolutegravir) ou IP (inibidor de integrase apresenta menor toxicidade quando comparado a IP por exemplo) ao invés do esquema tradicional somente com inibidores de transcriptase reversa (2ITRN/1ITRNN).

As principais mutações encontradas neste estudo encontram-se modeladas na figura 15 e refere-se ao domínio da polimerase da TR próximo ao sítio catalítico na subunidade p66, onde encontram-se localizada as mutações modeladas. É possível observar na figura que a mutação M184V, facilmente selecionada pelo uso do 3TC, encontra-se em uma região de α -hélice, tais regiões são consideradas mais robustas para suporte de mutações quando comparada a regiões de folha- β , a preservação desta estrutura secundária é necessária para o funcionamento da enzima, a mutação contudo leva a um prejuízo da função enzimática da TR (ABRUSÁN & MARSH, 2016; DIALLO et al., 2003; WANG et al., 2008; WEI et al., 2003).

A mutação T215Y localiza-se em região de folha- β e sua presença aprimora a ligação com ATP na reação de pirofosforólise (CHAMBERLAIN et al., 2002), esta

mutação pode ser observada de forma isolada uma vez que a troca de aminoácido (aa) por uma tirosina (Y) é suportada pela estrutura de folha- β por conter um grande resíduo aromático (COX et al., 2012; FANTINI et al., 2001) porém, ainda assim mutações primárias, como a T215Y, promove prejuízo e interfere negativamente a atividade da TR diminuindo o *fitness* viral (FANTINI et al., 2001).

A mutação L210W, localizado em uma região de alça na porção c-terminal próximo da região de α -F α -hélice (FANTINI et al., 2001; SVICHER et al., 2006), é considerada uma mutação secundária selecionada apenas após observada a T215Y (YAHY et al., 2000) e sua função é promover uma maior estabilização da alteração conformacional gerada pela T215Y através de interações hidrofóbicas entre o triptofano (W) na posição 210 e a tirosina (Y) na posição 215 (COX et al., 2012; FANTINI et al., 2001; YAHY et al., 2000), sendo assim a mutação acessória L210W, assim como a mutação M41L, reverteria a perda do *fitness* viral (apenas na presença da T215Y). Como citado anteriormente a mutação L210W nunca é selecionada de forma isolada pela grande perda de estabilidade da região de alça com ação deletéria para o vírus (FANTINI et al., 2001). Supõe-se que a troca por um aa quimicamente destoante, como o caso da leucina (L) considerado um aa estabilizante e rígido pelo triptofano (W), cuja propriedade química hidrofóbica é conhecida, podem inviabilizar a estrutura de alça e inutilizar a TR e por isso nunca é selecionada isoladamente, porém seriam necessários testes complementares para confirmação desta hipótese.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados discutidos acima e nos objetivos deste estudo, conclui-se uma circulação, no Rio Grande do Norte, dos subtipos B, F1 e C, subtipos estes que predominam no Brasil. A maior parte das mutações dos vírus encontrados neste estudo classificam-se como mutações transmitidas com um caso de mutação adquirida, concluindo assim uma maior necessidade de estudos (prevalência) com maior amostragem envolvendo pacientes virgens de terapia assim como indivíduos tratados, porém com carga viral detectável. Os antirretrovirais mais prejudicados foram os inibidores da transcriptase reversa análogo de nucleosídeo/nucleotídeo e inibidores da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo, ARVs conhecidos por participarem de esquemas terapêuticos iniciais. As mutações mais encontradas foram aquelas pertencentes da via TAM1 de mutação, encontrado com maior frequência no subtipo B e mutações discriminatórias como M184V e K65R. Apesar de não terem sido evidenciadas mutações principais selecionados por inibidores de protease, foram encontradas mutações acessórias (K20T e Q58E) que, na presença de mutações primárias conferem alta resistência a tais inibidores. Análise da modelagem da proteína viral contendo as principais mutações mostrou que as regiões de mutação selecionadas se encontram em regiões de α hélice e folha β da transcriptase reversa. O protocolo validado aponta a viabilidade do uso da própria enzima viral ao invés de enzimas sintéticas na quantidade dos reagentes descritos.

No entanto, torna-se claro a necessidade da análise de um número maior de sequências para um resultado de prevalência do subtipo de HIV-1 circulante por meio de método filogenéticos e análises mais robustas de bioinformática assim como um maior quantitativo de amostras para avaliação da estrutura 3D das proteínas virais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAM, M. E. et al. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 9864–9878, 2010.

ABRUSÁN, G.; MARSH, J. A. Alpha Helices Are More Robust to Mutations than Beta Strands. **PLoS Computational Biology**, v. 12, n. 12, p. 1–16, 2016.

ADESOKAN, A. A. et al. Prediction of HIV-1 Integrase/Viral DNA Interactions in the Catalytic Domain by Fast Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 821–828, 2004.

AKINSETE, O. et al. K103N Mutation in Antiretroviral Therapy--Naive African Patients Infected with HIV Type 1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 4, p. 575–578, 2004.

ALBUQUERQUE, M. **Avaliação do Perfil de Resistência Genotípica do HIV-1 aos Antirretrovirais em Crianças e Adolescentes em Falha Terapêutica em Goiás, no Período de 2003 a 2015**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2016.

ALENCAR, C. et al. HIV genotypes and primary drug resistance among HIV seropositive blood donors in Brazil: role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 63, n. 3, p. 387–392, 2013.

ALIZON, S. et al. Phylogenetic approach reveals that virus genotype largely determines HIV set-point viral load. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.

ARTS, E. J.; HAZUDA, D. J. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 3–24, 2012.

BARIN, F. et al. Serological Evidence for Virus Related To Simian T-Lymphotropic Retrovirus lii in Residents of West Africa. **The Lancet**, v. 326, n. 8469–8470, p. 1387–1389, 1985.

BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Revista de Investigacion Clinica**, v. 56, n. 2, p. 126–129, 1983.

- BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. **Lancet**, v. 348, n. 9019, p. 31–35, 1996.
- BECERRA, J. C.; BILDSTEIN, L. S.; GACH, J. S. Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. **Microbial Cell**, v. 3, n. 9, p. 450–474, 2016.
- BEER, B. E. et al. Diversity and Evolution of Primate Lentiviruses. **Human retroviruses and AIDS**, p. 460–474, 1999.
- BELL, L. C. K.; NOURSADEGHI, M. Pathogenesis of HIV-1 and mycobacterium tuberculosis co-infection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 80–90, 2017.
- BELLO, G. et al. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 263–270, 2006.
- BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 263–270, 2007.
- BELLO, G.; AFONSO, J. M.; MORGADO, M. G. Phylodynamics of HIV-1 subtype F1 in Angola, Brazil and Romania. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 5, p. 1079–1086, 2012.
- BERRY, C. et al. Selection of target sites for mobile DNA integration in the human genome. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 11, p. 1450–1462, 2006.
- BHATTI, A. B.; USMAN, M.; KANDI, V. Current Scenario of HIV / AIDS , Treatment Options , and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. **Cureus**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2016.
- BOYER, P. L. et al. Developing and Evaluating Inhibitors against the RNase H Active Site of HIV-1 Reverse Transcriptase. **Journal of Virology**, v. 92, n. 13, 2018.
- BOYER, P. L.; CLARK, P. K.; HUGHES, S. H. HIV-1 and HIV-2 Reverse Transcriptases: Different Mechanisms of Resistance to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. **Journal of Virology**, v. 86, n. 10, p. 5885–5894, 2012.
- BRADSHAW, D. et al. Novel drug resistance pattern associated with the mutations K70G and M184V in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4489–4491, 2007.

BRASIL. **Lei N 9.313, de 13 de Novembro de 1996** Brasília-DF, Brasil Diário Oficial da União, , 1996. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1996/lei-9313-13-novembro-1996-349070-publicacaooriginal-1-pl.html>>

BRASIL. **Manual Técnico Para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV**. 1. ed. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2016. v. 3

BRASIL. **Boletim Epidemiológico HIV AIDS 2017**. 1. ed. Brasília: [s.n.].

BRASIL. **Relatório de Monitoramento Clínico do HIV**. 1. ed. Brasília-DF: [s.n.].

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Para o Manejo da Infecção Pelo HIV em Adultos**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a.

BRASIL. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Crianças e Adolescentes**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018b.

BUDAMBULA, V. et al. HIV - 1 protease inhibitor drug resistance in Kenyan antiretroviral treatment - naive and - experienced injection drug users and non - drug users. **AIDS Research and Therapy**, v. 12, n. 27, p. 1–9, 2015.

CAMPBELL-YESUFU, O. T.; GANDHI, R. T. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 6, p. 780–787, 2011.

CARIDE, E. et al. Drug-Resistant Reverse Transcriptase Genotyping and Phenotyping of B and Non-B Subtypes (F and A) of Human Immunodeficiency Virus Type I Found in Brazilian Patients Failing HAART. **Virology**, v. 115, n. 275, p. 107–115, 2000.

CDC. **Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) --United States**. Disponível em:

<<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001163.htm>>. Acesso em: 29 nov. 2018.

CHALMET, K. et al. Epidemiological study of phylogenetic transmission clusters in a local HIV-1 epidemic reveals distinct differences between subtype B and non-B infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 1–9, 2010.

CHAMBERLAIN, P. P. et al. Crystal structures of Zidovudine- or Lamivudine-resistant

human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptases containing mutations at codons 41, 184, and 215. **J Virol**, v. 76, n. 19, p. 10015–10019, 2002.

CHANG, M. W.; TORBETT, B. E. Accessory Mutations Maintain Stability in Drug-Resistant HIV-1 Protease. **Journal of Molecular Biology**, v. 410, n. 4, p. 756–760, 2011.

CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 233, n. 4761, p. 343–346, 1986.

CLAVEL, F.; HANCE, A. J. HIV Drug Resistance. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 10, p. 1023–1035, 2004.

CLUMECK, N. et al. Acquired Immune Deficiency Syndrome in Black Africans. **The Lancet**, v. 321, n. 8325, p. 642, 1983.

COELHO, A. V. C. **Fatores Genéticos e Terapia Anti-HIV1 resistencia a antirretrovirais, efeitos adversos, resposta imunologica e estrategias vacinais.** [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

COFFIN, J. et al. Immunodeficiency viruses. **Letters**, v. 4 Suppl 1, p. 59S–63S, 1986.

COFFIN, J.; SWANSTROM, R. HIV pathogenesis: Dynamics and genetics of viral populations and infected cells. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, 2013.

COHEN, M. S. Preventing Sexual Transmission of HIV. **Clinical Infectious Diseases**, v. 7030, p. 1–7, 2007.

COX, M.; DOUDNA, J.; O'DONNELL, M. *Biologia Molecular: Princípios e Técnicas.* In: FRAGA, S. DE (Ed.). . Artmed ed. Porto Alegre: [s.n.]. p. 914.

D'ARC, M. et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 11, p. E1343–E1352, 2015.

DAMME, N. VAN et al. The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein. **Cell**

Host & Microbe, v. 3, n. April, p. 245–252, 2008.

DANEL, C. et al. A Trial of Early Antiretrovirals and Isoniazid Preventive Therapy in Africa. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 9, p. 808–822, 2015.

DANIEL, M. D. et al. Isolation of T-Cell Tropic HTLV-III-Like Retrovirus from Macaques. v. 409, n. 12, p. 14–17, 1985.

DAS, K.; MARTINEZ, S. E.; ARNOLD, E. Structural Insights into HIV Reverse Transcriptase Mutations Q151M and Q151M Complex that Confer Multi-Nucleoside Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 1, n. April, 2017.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. September, p. 350–354, 2006.

DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, n. October, 2015.

DEJUCQ, N. HIV-1 replication in CD4 + T cell lines : the effects of adaptation on co-receptor use , tropism , and accessory gene function. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 68, n. September, p. 331–337, 2000.

DELATORRE, E.; COUTO-FERNANDEZ, J. C.; BELLO, G. HIV-1 Genetic Diversity in Northeastern Brazil: High Prevalence of Non-B Subtypes. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 7, p. 639–647, 2017.

DELATORRE, E. O. **Avaliação da Prevalência de Mutações Transmitidas de Resistência aos Antirretrovirais e da História Evolutiva de Clados Raros do HIV-1 no Rio de Janeiro em uma População de Gestantes Antes do Início da Terapia para Prevenção da Transmissão Vertical**. [s.l.] FIOCRUZ, 2015.

DHHS, G. FOR THE USE OF ANTIRETROVIRAL AGENTS IN PEDIATRIC H. INFECTION. **Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection**. Disponível em:
<<https://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>>. Acesso em: 22 maio. 2019.

DIALLO, K.; GOTTE, M.; WAINBERG, M. . Molecular Impact of the M184V Mutation

in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. **The Ammonoidea: Environment, Ecology, and Evolutionary Change. Systematics Association Special Volume No. 47**, v. 47, n. 11, p. 13–34, 2003.

DIAZ, R. S. et al. Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. **Virology**, v. 381, n. 2, p. 184–193, 2008.

DIAZ, R. S. **Guia para o Manuseio de Resistência Antirretroviral**. 1. ed. São Paulo - SP: Permanyer Brasil, 2011.

DIAZ, R. S. Potência e barreira genética dos medicamentos e esquemas antirretrovirais. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases - Educação Médica Continuada**, v. 2, n. 3, p. 70–81, 2016.

DIVINO, F. et al. High prevalence and onward transmission of non-pandemic HIV-1 subtype B clades in northern and northeastern brazilian regions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2016.

DOITSH, G.; GREENE, W. C. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 3, p. 280–291, 2016.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: Mechanistic and therapeutic insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 279–290, 2012.

ERON, J. et al. The KLEAN study of fosamprenavir-ritonavir versus lopinavir-ritonavir, each in combination with abacavir-lamivudine, for initial treatment of HIV infection over 48 weeks: a randomised non-inferiority trial. **Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 476–482, 2006.

ESBJÖRNSSON, J. et al. Long-term follow-up of HIV-2-related AIDS and mortality in Guinea-Bissau : a prospective open cohort study. **Lancet**, v. 3018, n. November, p. 1–7, 2018.

ESTES, J. D. et al. Simian Immunodeficiency Virus–Induced Lymphatic Tissue Fibrosis Is Mediated by Transforming Growth Factor β 1–Positive Regulatory T Cells and Begins in Early Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 4, p. 551–561, 2007.

EYER-SILVA, W. A. et al. Prevalence of HIV type 1 drug resistance mutations in

treatment-naïve and experienced patients from resource-limited settings with universal access to antiretroviral therapy : a survey in two small Brazilian cities.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 103, n. March, p. 143–149, 2008.

EYER-SILVA, W. A.; MORGADO, M. G. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02 _ AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro , Southeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. November, p. 809–815, 2007.

FANALES-BELASIO, E. et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection : a brief overview. **Ann Ist Super Sanità**, v. 46, n. 1, p. 5–14, 2010.

FANTINI, J.; TAMALET, C.; YAHY, N. Secondary structure predictions of HIV-1 reverse transcriptase provide new insights into the development of drug-resistance genotypes. **AIDS**, v. 15, n. 9, p. 1191–1192, 2001.

FARIA, N. R. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 56–61, 2014.

FDA. **FDA approves new HIV treatment for patients who have limited treatment options**. Disponível em:

<<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm599657.htm>>. Acesso em: 1 dez. 2018.

FERNANDES, J. D.; JAYARAMAN, B.; FRANKEL, A. D. The HIV-1 Rev response element. **RNA Biology**, v. 9, n. 1, p. 6–11, 2012.

FRANÇA, S. et al. HIV-1 infection among crack cocaine users in a region far from the epicenter of the HIV epidemic in Brazil : Prevalence and molecular characteristics. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, p. 1–13, 2018.

FRASER, C. et al. Virulence and pathogenesis of HIV-1 infection: An evolutionary perspective. **Science**, v. 343, n. 6177, 2014.

GACH, J. S.; LEAMAN, D. P.; ZWICK, M. B. Targeting HIV-1 gp41 in Close Proximity to the Membrane Using Anti- body and Other Molecules. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 24, p. 2997–3021, 2011.

GADELHA, S. R. et al. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus-1

in the State of Ceará, Northeast, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 461–463, 2003.

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. February, p. 436–441, 1999.

GASHNIKOVA, N. et al. In Vitro Study of Resistance-Associated Genotypic Mutations to Nucleoside Analogs. **Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids**, v. 22, n. 5–8, p. 991–994, 2003.

GASHNIKOVA, N. M. et al. HIV-1 Epidemiology , Genetic Diversity , and Primary Drug Resistance in the Tyumen Oblast , Russia. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 13, 2016.

GEFFEN, N. et al. Community perspective on the INSIGHT Strategic Timing of AntiRetroviral Treatment (START) trial. **HIV Medicine**, v. 16, n. S1, p. 10–13, 2015.

GILBOA, E. et al. A Detailed Model of Reverse Transcription of Crucial Aspects and Tests of Crucial Aspects. **Cell**, v. 18, n. September, p. 93–100, 1979.

GRAF, T. **Epidemiologia molecular do HIV-1 e resistência primária a antirretrovirais em indivíduos soropositivos da região metropolitana de Florianópolis/SC**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

GUIMARÃES, M. L. et al. Close phylogenetic relationship between Angolan and Romanian HIV-1 subtype F1 isolates. **Retrovirology**, v. 6, p. 1–11, 2009.

HAHN, PAUL M. SHARP, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1–22, 2011.

HALLENBERGER, S. et al. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. **Nature**, v. 360, n. 26, p. 358–361, 1992.

HANDEMA, R. A. Y. et al. Prevalence of Drug-Resistance-Associated Mutations in Antiretroviral Drug-Naive Zambians Infected with Subtype C HIV-1. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 2, p. 151–160, 2003.

HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **AIDS**, v. 20, n. 16, p. 13–23, 2006.

- HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000 – 2007. **AIDS**, v. 25, n. 5, p. 679–689, 2011.
- HERSCHHORN, A.; HIZI, A. Retroviral reverse transcriptases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p. 2717–2747, 2010.
- HIRSCH, V. M. et al. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. **Nature**, v. 342, p. 340–342, 1989.
- HU, W.; HUGHES, S. H. HIV-1 Reverse Transcription. p. 1–22, 2012.
- HYMES, K. B. et al. Kaposi's Sarcoma in Homosexual Men - A Report of Eight Cases. **The Lancet Infectious Diseases**, n. case 3, p. 598–600, 1981.
- IACOB, S. A.; IACOB, D. G. Ibalizumab Targeting CD4 Receptors , An Emerging Molecule in HIV Therapy. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. November, p. 1–8, 2017.
- ICTV. **Taxonomy**. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 28 nov. 2018.
- ISEL, C. et al. Specific initiation and switch to elongation of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription require the post-transcriptional modifications of primer tRNA³Lys. **The EMBO journal**, v. 15, n. 4, p. 917–24, 1996.
- IYIDOGAN, P.; ANDERSON, K. S. Current Perspectives on HIV-1 Antiretroviral Drug Resistance. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 4095–4139, 2014.
- JACOBO-MOLINA, A. et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 13, p. 6320–6324, 1993.
- JON COHEN, M. E. HIV , HPV Researchers Honored , But One Scientist Is Left Out. **Science**, v. 322, n. October, p. 174–175, 2008.
- JÚNIOR, S. S.; ITSUKO, C. S. Terapia Antirretroviral para HIV/AIDS: O Estado da Arte. **Revista de Enfermagem - UFPE**, v. 12, n. 4, p. 1103–1111, abr. 2018.
- KEELE, B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.

Science, v. 313, n. 5786, p. 523–526, 2006.

KILARESKI, E. M. et al. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. **Retrovirology**, v. 2, n. 6, p. 1–24, 2009.

KNIPE, D. M. et al. Fields Virology (two volumes). In: KNIPE, D. M.; M., H. (Eds.). . **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1425–1473.

LAZZAROTTO, A. R.; DERESZ, L. F.; SPRINZ, E. HIV / Aids e Treinamento Concorrente: a Revisão Sistemática. **Rev Bras Med Esporte**, v. 16, n. 2, p. 149–154, 2010.

LEMEY, P. et al. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. **PNAS**, v. 100, n. 11, p. 6588–6592, 2003.

LI, G. et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, 2015.

LIOVAT, A. S. et al. Acute Plasma Biomarkers of T Cell Activation Set-Point Levels and of Disease Progression in HIV-1 Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–13, 2012.

LOCATELLI, S.; PEETERS, M. Non-Human Primates, Retroviruses, and Zoonotic Infection Risks in the Human Population. **Nature**, v. 10, n. 3, p. 62, 2012.

LOS-ALAMOS. **HIV Circulating Recombinant Forms (CRFs)**. Disponível em: <<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>>. Acesso em: 28 set. 2018.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **The Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.

MARCELIN, A.-G. **Resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors**. 1. ed. London: Geretti AM, 2006.

MARCELIN, A. G. et al. Thymidine Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Profiles and Association to Other Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Observed in the Context of Virological

Failure. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 1, p. 162–165, 2004.

MARCK, H. VAN et al. The Impact of Individual Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Mutations on Drug Susceptibility Is Highly Influenced by Complex Interactions with the Background Protease Sequence. **Society**, v. 83, n. 18, p. 9512–9520, 2009.

MARMOR, M. et al. Resistance to HIV Infection. **Journal of Urban Health**, v. 83, n. 1, p. 5–17, 2006.

MASUR, H. et al. An outbreak of community acquired *Pneumocystis Carinii* Pneumonia. **The New England journal of medicine**, v. 305, n. 24, p. 1–8, 1981.

MELIKYAN, G. B. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion : the HIV-1 paradigm. **Retrovirology**, v. 13, n. December, p. 1–13, 2008.

MENÉNDEZ-ARIAS, L.; BERKHOUT, B. Retroviral reverse transcription. **Virus Research**, v. 134, p. 1–3, 2008.

METEER, J. D. et al. Molecular mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine. **Antiviral Research**, v. 101, p. 62–67, 2014.

MILLER, M. D. et al. Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. **The Journal of infectious diseases**, v. 189, n. 5, p. 837–46, 2004.

MOORE, J. The Puzzling Origins of AIDS. **American Scientist**, v. 92, n. 6, p. 540–547, 2004.

MORGADO, M. G. et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. **AIDS research and human retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569–76, 1994.

MORGADO, M.; GUIMARÃES, M.; GALVÃO-CASTRO, B. HIV-1 Polymorphism: a Challenge for Vaccine Development - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 143–150, 2002.

MOUREZ, T.; SIMON, F.; PLANTIERA, J. C. Non-M variants of human immunodeficiency virus type. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 448–

461, 2013.

MURPHY, R. L. et al. ABT-378/ritonavir plus stavudine and lamivudine for the treatment of antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection: 48-Week results. **Aids**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2001.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NACHEGA, J. B. et al. Lower pill burden and once-daily antiretroviral treatment regimens for HIV infection: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 9, p. 1297–1307, 2014.

NAMAKOOLA, I. et al. From antiretroviral therapy access to provision of third line regimens : evidence of HIV Drug resistance mutations to first and second line regimens among Ugandan adults. **BMC Research Notes**, p. 1–6, 2016.

PAIARDINI, M.; MÜLLER-TRUTWIN, M. HIV-associated chronic immune activation. **Immunological Reviews**, v. 254, n. 1, p. 78–101, 2013.

PALELLA, F. et al. The Association of HIV Susceptibility Testing With Survival Among HIV-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy : A Cohort Study. **Annals of Internal Medicine**, v. 151, n. 2, p. 73–84, 2009.

PATEL, K. et al. Impact of HAART and CNS-penetrating antiretroviral regimens on HIV encephalopathy among perinatally infected children and adolescents. v. 23, n. 14, p. 1–15, 2009.

PAU, A. K.; GEORGE, J. M. Antiretroviral therapy: Current drugs. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 371–402, 2014.

PAULA, M. S. DE. **Análise da Diversidade Genética e Mutações no Gene da Integrase de Isolados do HIV-1 de Pacientes Atendidos no Município de Jataí/Goiás**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2018.

PESSÔA, R. et al. Enhanced detection of viral diversity using partial and near full-length genomes of HIV-1 provirus deep sequencing data from recently infected donors at four blood centers in Brazil. **Transfusion**, v. 55, n. 5, p. 980–990, 2015.

- PINCUS, J. M. et al. Acute human immunodeficiency virus infection in patients presenting to an urban urgent care center. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 12, p. 1699–1704, 2003.
- PINTO, A. C. S. et al. Compreensão da Pandemia da AIDS nos Últimos 25 anos. **DST – J bras Doenças Sexualmente Transmissíveis 2007**, v. 19, n. 1, p. 45–50, 2007.
- PINTO, M. E.; STRUCHINER, C. J. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 473–484, 2006.
- POPOV, S. et al. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 4, p. 909–917, 1998.
- POPPER, S. J. et al. Low Plasma Human Immunodeficiency Virus Type 2 Viral Load Is Independent of Proviral Load: Low Virus Production In Vivo. **Journal of Virology**, v. 74, n. 3, p. 1554–1557, 2000.
- POUGA, L. et al. New Resistance Mutations to Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors at Codon 184 of HIV-1 Reverse Transcriptase (M184L and M184T). **Chemical Biology & Drug Design**, p. 1–22, 2018.
- PUTHANAKIT, T.; SIBERRY, G. K. Bone health in children and adolescents with perinatal HIV infection. **JIAS Journal of the International AIDS Society**, v. 27, n. 2, p. 211–220, 2013.
- QUINN, T. C. et al. Viral Load and Heterosexual Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1. **The New England journal of medicine**, v. 342, n. 13, p. 921–929, 2000.
- RAMOS, C. G. **Mutações de Resistência Transmitida do Vírus da Imunodeficiência Humana aos Antirretrovirais : Prevalência e Impacto no Desfecho Viroológico**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.
- REN, J.; STAMMERS, D. K. Structural basis for drug resistance mechanisms for non-nucleoside inhibitors of HIV reverse transcriptase. **Virus Research**, v. 134, n. 1–2, p. 157–170, 2008.
- REQUEJO, H. I. Z. Worldwide molecular epidemiology of HIV. **Revista de Saude**

Publica, v. 40, n. 2, p. 331–345, 2006.

RHEE, S.-Y. et al. HIV-1 Protease Mutations and Protease Inhibitor Cross-Resistance. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 54, n. 10, p. 4253–4261, 2010.

ROBERT C. GALLO, ELIZABETH READ, M.G. SARNGADHARAN, M. P. Frequent Detection and Isolation of Cytopathic Retroviruses (HTLV-III) from Patients with AIDS and at Risk for AIDS. v. 6476, n. 1981, 1984.

SABINO, E. C. **Subtipos de HIV-1 no Brasil**. 1. ed. Rio de Janeiro: Scielo Books, 1998.

SAHU, GAUTAM K, P. Potential Implication of Residual Viremia in Patients on Effective ART. **AIDS Research and Human Retroviruses**, n. 401, p. 1–26, 2014.

SAKSENA, N. K. et al. HIV reservoirs in vivo and new strategies for possible eradication of HIV from the reservoir sites. **Research and Palliative Care**, v. 2, n. May 2014, p. 103–122, 2010.

SANTIAGO, M. L. et al. Simian Immunodeficiency Virus Infection in Free-Ranging Sooty Mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Côte d'Ivoire: Implications for the Origin of Epidemic Human Immunodeficiency Virus Type 2. **Journal of Virology**, v. 79, n. 19, p. 2473–2480, 2005.

SANTOS, A. F. A. **Variação genética em diferentes subtipos do HIV-1 e seu papel na susceptibilidade viral a drogas antirretrovirais**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

SANTOS, N. S. DE O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Virologia Humana. In: 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. v. 39p. 561–563.

SHAFER, R. W. et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. **AIDS**, v. 21, n. February 2006, p. 215–223, 2007.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Prehistory of HIV-1. **Nature**, v. 455, n. October, p. 605–606, 2008.

SHARP, P. M.; ROBERTSON, D. L.; HAHN, B. H. Cross-species transmission and

recombination of “AIDS” viruses. **Philosophical Transactions: Biological Sciences**, v. 349, n. March, p. 41–47, 2015.

SHERPA, C. et al. The HIV-1 Rev response element (RRE) adopts alternative conformations that promote different rates of virus replication. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 9, p. 4676–4686, 2015.

SHIAU, S. et al. Initiation of antiretroviral therapy before 6 months of age is associated with faster growth recovery in south african children perinatally infected with HIV. **Journal Pediatric**, n. 6, p. 1138–1145, 2013.

SILVEIRA, A. A. **Caracterização da Diversidade Genética do HIV-1 em Pacientes do Estado do Mato Grosso do Sul**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2007.

SILVEIRA, J. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 54, n. 1, p. 36–41, 2012.

SODORA, D. L. et al. Toward an AIDS vaccine: Lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 861–865, 2009.

SOUZA, I. V. **AIDS e HIV-2 O vírus negligenciado**. Gramma ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

STANFORD. **NRTI Resistance Notes**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NRTI/>>. Acesso em: 29 nov. 2018a.

STANFORD. **NNRTI Resistance Notes**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/NNRTI/>>. Acesso em: 29 nov. 2018b.

STANFORD. **PI Resistance Notes**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/PI/>>. Acesso em: 29 nov. 2018c.

STANFORD. **INSTI Resistance Notes**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/>>. Acesso em: 29 nov. 2018d.

- STYRT, B. A.; PIAZZA-HEPP, T. D.; CHIKAMI, G. K. Clinical toxicity of antiretroviral nucleoside analogs. **Antiviral Research**, v. 31, n. 3, p. 121–135, 1996.
- SUNDQUIST, W. I.; KRÄUSSLICH, H. G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 7, 2012.
- SVICHER, V. et al. Involvement of Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Mutations in the Regulation of Resistance to Nucleoside Inhibitors. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 7186–7198, 2006.
- TAKEHISA, J. et al. Origin and Biology of Simian Immunodeficiency Virus in Wild-Living Western Gorillas. **Journal of Virology**, v. 83, n. 4, p. 1635–1648, 2009.
- TANG, C. et al. Visualizing transient events in amino-terminal autoprocessing of HIV-1 protease. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 693–696, 2008.
- TANG, M. W.; SHAFER, R. W. HIV-1 Antiretroviral Resistance Scientific Principles and Clinical Applications. v. 72, n. 9, p. 1–25, 2012.
- TARDIF, R.; TREMBLAY, M. J. Presence of Host ICAM-1 in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virions Increases Productive Infection of CD4+ T Lymphocytes by Favoring Cytosolic Delivery of Viral Material. **Journal of Virology**, v. 77, n. 22, p. 12299–12309, 2003.
- TERRASSE, R. et al. Visualization of X4- and R5-Tropic HIV-1 Viruses Expressing Fluorescent Proteins in Human Endometrial Cells : Application to Tropism Study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2017.
- THIERRY HUET, RÉMI CHEYNIER, ANDREAS MEYERHANS, GEORGES ROELANTS, S. W.-H. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. **Nature**, v. 345, p. 356–359, 1990.
- THOMAS, M.; BRADY, L. HIV integrase: A target for AIDS therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 167–172, 1997.
- TOLEDO, P. V. M. et al. HIV-1 genotypic resistance profile of patients failing antiretroviral therapy in Paraná, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 4, p. 360–71, 2010.

TRAUTMANN, L. et al. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 + T cells leads to reversible immune dysfunction. **Nature Medicine**, v. 12, n. 10, p. 1198–1202, 2006.

UNAIDS. **Brazil - Country factsheets**. Disponível em:

<<http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/brazil>>. Acesso em: 29 nov. 2018a.

UNAIDS. **Ending AIDS - Progress Towards The 90-90-90 Targets**. Genebra: [s.n.].

Disponível em:

<http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/Global_AIDS_update_2017_en.pdf>.

UNAIDS. **Estatísticas Globais sobre HIV 2017**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<<https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2018/11/Fact-sheet-UNAIDS-novembro-2018.pdf>>.

UNAIDS. **Estatísticas Globais sobre HIV 2017**. Brasília-DF: [s.n.]. Disponível em:

<<https://unaids.org.br/wp-content/uploads/2018/11/Fact-sheet-UNAIDS-novembro-2018.pdf>>.

UNAIDS. **90-90-90: Treatment for all**. Disponível em:

<<http://www.unaids.org/en/resources/909090>>. Acesso em: 29 nov. 2018c.

VÉRAS, N. M. C. **História Evolutiva do HIV-1 no Brasil**. [s.l.] Universidade de Brasília, 2010.

VIEIRA, J. et al. Acquired immune deficiency in Haitians: opportunistic infections in previously healthy Haitian immigrants. **N Engl J Med**, v. 308, n. 3, p. 125–129, 1983.

VIOLARI, A. et al. Early Antiretroviral Therapy and Mortality among HIV-Infected Infants. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 21, p. 2233–2244, 2008.

WANG, G. P. et al. HIV integration site selection: Analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. **Genome Research**, v. 17, n. 8, p. 1186–1194, 2007.

WANG, Y. X. et al. Mutational analysis of the “turn” of helix clamp motif of HIV-1 reverse transcriptase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,

v. 377, n. 3, p. 915–920, 2008.

WARD, D. Reverse Transcriptase. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 23, n. 1, p. 43622, 1995.

WATTS, J. M. et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 711–716, 2009.

WEI, X. et al. Negative effect of the M184V mutation in HIV-1 reverse transcriptase on initiation of viral DNA synthesis. **Virology**, v. 311, n. 1, p. 202–212, 2003.

WENDEL, S. N. et al. AIDS and Blood Donors in Brazil. **The Lancet**, p. 506, 1985.

WENSING, A. M. et al. 2014 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 22, n. 3, p. 642–643, 2014.

WHITCOMB, J. M. et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 566–575, 2007.

WHITNEY, J. B.; LIM, S. Y.; WAINBERG, M. A. Evolutionary mechanisms of retroviral persistence. **AIDS Reviews**, v. 13, n. 4, p. 234–239, 2011.

WHO. **HIV Drug Resistance Report 2017**. Geneva - Switzerland: [s.n.]. Disponível em: <<http://apps.who.int/bookorders>>.

WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV : Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1–14, 2012.

WOROBAY, M. et al. Island biogeography reveals the deep history of SIV. **Science**, v. 329, n. 5998, p. 1487, 2010.

XU, HUANBIN; WANG, XIAOLEI; VEAZEY, R. S. Mucosal Immunology of HIV Infection. **Immunological Reviews**, v. 254, p. 10–33, 2013.

YAHY, N. et al. Mutation L210W of HIV-1 Reverse Transcriptase in Patients Receiving Combination Therapy. **Journal of Biomedical Science**, v. 20, p. 507–513, 2000.

YOUNG, S. D. Inhibition of HIV-1 integrase by small molecules: the potential for a

new class of AIDS chemotherapeutics. **Current opinion in Drug Discovery & Development**, v. 4, n. 4, p. 402–410, 2001.

ZENG, M. et al. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 3, p. 998–1008, 2011.