



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

**ORNELLA MARTINS BOTELHO**

**Caracterização de genomas provirais quase completos do HIV-1 e predição da afinidade dos epítomos do HIV aos alelos dos HLA-A, B e C de pacientes HIV+ em sucesso terapêutico do Rio de Janeiro e Rio Grande**

**Orientador:** Dr. Marcelo Alves Soares

**Co-orientadora:** Dra. Brunna Luiza Misael Alves

**RIO DE JANEIRO**

**2021**



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**Pós-Graduação em Oncologia**

**ORNELLA MARTINS BOTELHO**

**Caracterização de genomas provirais quase completos do HIV-1 e predição da afinidade dos epítomos do HIV aos alelos dos HLA-A, B e C de pacientes HIV+ em sucesso terapêutico do Rio de Janeiro e Rio Grande**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia

**Orientador:** Dr. Marcelo Alves Soares

**Co-orientadora:** Dra. Brunna Luiza Misael Alves

**RIO DE JANEIRO**

**2021**

B748c Botelho, Ornella Martins

Caracterização de genomas provirais quase completos do HIV-1 aos alelos dos HLA-A, B e C de pacientes HIV+ em sucesso terapêutico do Rio de Janeiro e Rio Grande / Ornella Martins Botelho – Rio de Janeiro, 2021.

125 f.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Alves Soares

1. HIV. 2. Provírus. 3. Epítipo. 4. HLA. 5. NGS I. (Orient.). Soares, Marcelo Alves. II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.079



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER  
Pós-Graduação em Oncologia**

**AUTORA:** Ornella Martins Botelho

**Caracterização de genomas provirais quase completos do HIV-1 e predição da afinidade dos epítomos do HIV aos alelos dos HLA-A, B e C de pacientes HIV+ em sucesso terapêutico do Rio de Janeiro e Rio Grande**

**ORIENTADOR:** Dr. Marcelo Aves Soares

**CO-ORIENTADORA:** Dra. Brunna Luiza Misael Aves

Aprovada em: 16 / 08 / 2021

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Mariana Lima Boroni Martins

Prof. Dra. Luciana Barros de Arruda

Prof. Dra. Vanusa Pousada da Hora

Prof. Dr. André Felipe Andrade dos Santos

Prof. Dr. Martín Bonamino

**RIO DE JANEIRO**

**2021**

DEDICATÓRIA

À minha mãe.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, em especial ao meu irmão e minha mãe, por sempre apoiarem as minhas decisões, me incentivarem a ir mais longe e por se orgulharem dos meus passos. Vocês foram e são a base de tudo o que eu faço;

Agradeço ao meu marido, Lucas, por embarcar nos meus projetos; por ser meu companheiro; pela força e suporte, principalmente nesses últimos meses; por me lembrar que vai dar certo (e que vai dar tempo!); por vibrar cada conquista comigo e por ser, sempre, o meu ponto de paz em meio ao caos;

Agradeço ao meu orientador, Dr. Marcelo Soares, por todo ensinamento, incentivo, atenção e por acreditar na minha capacidade de desenvolver esse projeto. Também gostaria de agradecer pela paciência e respeito quando precisei me dedicar à minha saúde;

À minha co-orientadora, Dra. Brunna Misael, por todo apoio, suporte, críticas, conselhos, ideias, confiança, por todos os ensinamentos e por toda a parceria desde a iniciação científica. Sou muito grata por ter encontrado em você orientação, amizade e uma pessoa para eu me inspirar;

À Isabel Prellwitz por sempre ser tão gentil, por ter me ensinado tanto sobre o sequenciamento de nova geração e os epítomos; por ser muito solícita, mesmo quando eu mandava áudios de 10 minutos repletos de dúvidas. Sinto muita saudade do nosso dia-a-dia juntas;

À Juliana e Lívia por todos os conselhos, ajudas, críticas, incentivo e, principalmente, por tornarem a minha rotina mais leve. A força e o profissionalismo de vocês me inspiram. A nossa sala é muito mais alegre e animada quando vocês estão presentes;

A todo o grupo de Oncovirologia pelo acolhimento desde o meu primeiro dia de iniciação científica. Muito obrigada pelos almoços divertidos e pelas conversas científicas e não-científicas.

Aos alunos, funcionários e pesquisadores do laboratório de genética do INCA por sempre me ajudarem e pela convivência harmoniosa no laboratório;

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo. Sem vocês esse projeto não sairia do papel;

Ao Ministério da Saúde, Capes, CNPq, FAPERJ e INCT do Câncer pelo apoio financeiro.

“¿Quién diría que las manchas viven y ayudan a vivir? Tinta, sangre, olor (...). ¿Que haría yo sin lo absurdo y lo fugaz?”

Frida Kahlo



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**Caracterização de genomas provirais quase completos do HIV-1 e predição da afinidade dos epítomos do HIV aos alelos dos HLA-A, B e C de pacientes HIV+ em sucesso terapêutico do Rio de Janeiro e Rio Grande**

**RESUMO - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ornella Martins Botelho**

A terapia antirretroviral revolucionou o tratamento do HIV, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e proporcionando a diminuição da morbidade, mortalidade, progressão para a aids e transmissão do vírus. Apesar de seus benefícios, a expansão do tratamento resultou no aumento de vírus resistentes aos antirretrovirais, necessita de alto investimento financeiro anual, pode apresentar efeitos colaterais e deve ser usada de forma crônica, inclusive pelos pacientes em sucesso terapêutico. Pensando nisso, novas abordagens contra o HIV têm sido estudadas, como a vacinação terapêutica, que visa a cura funcional do paciente. O HIV-1 apresenta diferentes padrões de distribuição pelo mundo. A análise de sequenciamento do genoma quase completo (NFLG) do HIV permite a identificação fidedigna do subtipo viral. Esse estudo analisou a composição genética do NFLG dos provírus arquivados de pacientes em sucesso terapêutico através do sequenciamento de nova geração (NGS); determinou a presença e frequência das mutações de resistência aos antirretrovirais; determinou o subtipo viral e identificou os epítomos provirais que possuíam alta afinidade aos alelos de HLA-A, –B e –C mais frequentes de duas cidades brasileiras. Os 46 pacientes do Rio de Janeiro (RJ) e 40 pacientes de Rio Grande (RS) que aceitaram participar do estudo tiveram seu sangue total periférico coletado e enviado ao Programa de Oncovirologia do INCA. O DNA genômico do hospedeiro, que contém o DNA proviral, foi extraído e utilizado na amplificação por PCR, de forma que abrangesse o NFLG. Posteriormente, eles foram purificados, utilizados na construção de bibliotecas genômicas virais e sequenciados na plataforma Illumina MiSeq. As *reads* resultantes do sequenciamento foram alinhadas à sequência-referência do subtipo B do HIV-1 (HXB2) no programa Geneious, onde foi possível averiguar a presença e frequência das mutações de resistência aos antirretrovirais. A árvore filogenética foi criada no programa PhyML e o programa SimPlot foi utilizado para averiguar a recombinação entre os subtipos. Os consensos das amostras foram submetidos na ferramenta *MHC-I Binding Predictions* de predição de epítomos de células T, sendo considerados de alta afinidade aos alelos de HLA os epítomos com *percentil rank* até 1%. Todas as amostras incluídas no estudo foram sequenciadas e 69 (80,2%) possuíam o NFLG. O RJ apresentou predomínio do subtipo B (78,3%), seguido por 15,2% de formas recombinantes, enquanto o RS apresentou predomínio do subtipo C (67,5%) e 25% de recombinantes. Foram encontradas 168 mutações de resistência aos antirretrovirais em 63 (73,3%) amostras e 105 (62,5%) delas eram mutações minoritárias. Entre as 168 mutações, 68 (40,5%) eram capazes de conferir algum grau de resistência a pelo menos um medicamento utilizado pelos pacientes. Foram selecionados oito epítomos que apresentaram alta afinidade aos HLAs mais frequentes, sendo eles: RTLNAWVKV (*gag*-RJ), HQKEPPFLW (*pol*-RJ), KHQKEPPFL (*pol*-RJ), TQDFWEVQL (*pol*-RJ), VLDVGDAYF (*pol*-RJ), KHQKEPPFL (*pol*-RS), TQDFWEVQL (*pol*-RS) e VLDVGDAYF (*pol*-RS). Desse modo, as informações encontradas no estudo complementarão o perfil epidemiológico-molecular do HIV-1 no país, auxiliarão o entendimento sobre as mutações de resistência aos antirretrovirais e contribuirão para o avanço de estudos que almejam desenvolver vacinas terapêuticas contra HIV/aids.





**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer  
Coordenação de Pós-graduação**

**Characterization of HIV-1 near full-length proviral genomes and affinity prediction of HIV epitopes to HLA-A, B and C alleles of HIV+ patients under therapeutic success from Rio de Janeiro and Rio Grande**

**ABSTRACT - MASTER THESIS**

Ornella Martins Botelho

Antiretroviral therapy revolutionized HIV treatment, improving the quality of life of patients and providing a reduction in morbidity, mortality, progression to AIDS and transmission of the virus. Despite its benefits, the expansion of treatment has resulted in an increase in antiretroviral resistant viruses, requires a high financial investment annually, may have side effects and should be used chronically, even by patients with therapeutic success. With this in mind, new approaches against HIV have been studied, such as therapeutic vaccination, which aims to provide a functional cure for the infected patient. HIV-1 has different distribution patterns around the world. Near full-length genome (NFLG) sequencing analysis of HIV allows genuine identification of the viral subtype. This study analyzed the genetic composition of NFLG from the archived proviruses from patients under therapeutic success through next-generation sequencing (NGS); determined the presence and frequency of antiretroviral resistance mutations; determined the viral subtype and identified the proviral epitopes that had high affinity to the most frequent HLA-A, -B and -C alleles from two Brazilian cities. Forty-six patients from Rio de Janeiro (RJ) and 40 patients from Rio Grande (RS) who agreed to participate in the study had their peripheral whole blood collected and sent to the Oncovirology Program at INCA. The host's genomic DNA, which contains the proviral DNA, was extracted and used in PCR amplification so that it encompassed the NFLG. PCR products were then purified, used in the construction of viral genomic libraries and sequenced on an Illumina MiSeq platform. The reads resulting from the sequencing were aligned to the reference sequence of HIV-1 subtype B (HXB2) in the Geneious program, where it was possible to determine the presence and frequency of antiretroviral resistance mutations. The phylogenetic tree was created in the PhyML program and the SimPlot program was used to investigate the recombination between the subtypes. The consensus of the samples was submitted to the MHC-I Binding Predictions tool for prediction of T cell epitopes. Epitopes with top 1% percentile rank were considered of high affinity to HLA alleles. All samples included in the study have been sequenced and 69 (80.2%) had the complete NFLG. RJ showed a predominance of subtype B (78.3%), followed by 15.2% of recombinant forms, while RS showed a predominance of subtype C (67.5%) and 25% of recombinant forms. One hundred sixty eight antiretroviral resistance mutations were found in 63 (73.3%) samples and 105 (62.5%) of them were minority mutations. Among the 168 mutations, 68 (40.5%) were able to confer some degree of resistance to at least one drug used by the patients. Eight epitopes that showed high affinity to the most frequent HLAs were selected, namely: RTLNAWVKV (*gag*-RJ), HQKEPPFLW (*pol*-RJ), KHQKEPPFL (*pol*-RJ), TQDFWEVQL (*pol*-RJ), VLDVGDAYF (*pol*-RJ), KHQKEPPFL (*pol*-RS), TQDFWEVQL (*pol*-RS) and VLDVGDAYF (*pol*-RS). The information provided by this study will complement studies on the molecular epidemiological profiling of HIV-1 in Brazil; will help the understanding of antiretroviral resistance mutations and will contribute to the advancement of studies that aim to develop therapeutic vaccines against HIV/AIDS.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS .....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1. Histórico .....	20
1.2. Epidemiologia do HIV e aids.....	24
1.3. Partícula viral e estrutura genômica do HIV .....	26
1.4. Ciclo replicativo do HIV .....	27
1.5. História natural da infecção pelo HIV.....	30
1.6. Classificação filogenética e diversidade genética do HIV.....	32
1.7. Tratamento antirretroviral.....	35
1.8. Mutações de resistência aos antirretrovirais.....	37
1.9. Infecção viral e apresentação ao sistema imune .....	39
1.10. Sistema HLA.....	40
1.11. Polimorfismo e nomenclatura do sistema HLA.....	42
1.12. Processamento e apresentação de antígenos via HLA de classe I .....	44
1.13. papel do HLA de classe I na infecção pelo HIV-1.....	46
1.14. Novas estratégias contra o HIV-1.....	48
1.14.1. Vacina profilática e cura esterilizante .....	48
1.14.2. Cura funcional .....	49
2. JUSTIFICATIVA .....	52
3. OBJETIVO.....	53
3.1. Objetivos específicos.....	53

4.	METODOLOGIA.....	54
4.1.	Colaborações.....	54
4.2.	Casuística.....	54
4.3.	Extração do DNA genômico.....	55
4.4.	Quantificação do DNA genômico extraído.....	56
4.5.	Amplificação do DNA proviral.....	56
4.6.	Eletroforese em gel de agarose.....	61
4.7.	Purificação dos produtos de PCR.....	61
4.8.	Eletroforese e quantificação das amostras purificadas.....	62
4.9.	Bibliotecas genômicas.....	62
4.10.	Eletroforese e quantificação das bibliotecas.....	65
4.11.	Sequenciamento de Nova Geração.....	65
4.12.	Análise das <i>reads</i> .....	67
4.13.	Análise das mutações de resistência aos antirretrovirais.....	68
4.14.	Análises filogenéticas.....	70
4.15.	Análises de predição de epítomos de células T.....	70
4.15.1.	Predição de epítomos de células T.....	71
4.15.2.	Afinidade dos epítomos mais frequentes aos HLAs –A, –B e –C de cada paciente.....	72
5.	RESULTADOS.....	73
5.1.	Casuística.....	73
5.2.	Análise molecular.....	75
5.3.	Diversidade genética.....	76
5.4.	Mutações de resistência aos antirretrovirais.....	79
5.5.	Predição de epítomos de células T.....	84
5.5.1.	Predição de epítomos de células T e sua afinidade aos alelos mais frequentes da casuística do estudo.....	84

5.5.2.	Afinidade dos epítomos selecionados aos alelos específicos dos pacientes .....	86
6.	DISCUSSÃO .....	88
7.	CONCLUSÕES.....	100
8.	REFERÊNCIAS.....	102
9.	ANEXOS .....	120
9.1.	Modelo do questionário para preenchimento de dados a partir dos prontuários médicos 120	
9.2.	Mutações analisadas nas regiões genômicas virais RNase H e Conexão .....	123
9.3.	Resultado do sequenciamento das amostras na plataforma Illumina MiSeq .....	124

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Iniciadores utilizados na primeira e segunda reação de PCR para a amplificação do genoma quase completo do HIV.....	58
Tabela 5.1: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo.....	73
Tabela 5.2: Subtipos puros e recombinantes do HIV -1 resultantes da análise realizada no programa SimPlot com todas as 86 amostras incluídas no estudo (sequências parciais e sequências completas).....	78
Tabela 5.3: Mutações de resistência aos antirretrovirais encontradas ao longo do genoma das 86 amostras incluídas no estudo e o esquema terapêutico de cada paciente.....	80
Tabela 5.4: Epítomos selecionados a partir da predição de epítomos de células T aos alelos de HLA mais frequentes da população do estudo.....	85
Tabela 5.5: Predição de epítomos de células T aos alelos de HLA mais frequentes da população do estudo.....	85
Tabela 5.6: Predição da afinidade dos epítomos selecionados aos seis alelos de HLA específicos das 44 amostras do Rio de Janeiro.....	86
Tabela 5.7: Predição da afinidade dos epítomos selecionados aos seis alelos de HLA específicos das 40 amostras de Rio Grande.....	87
Tabela 9.1: Mutações analisadas nas regiões RNase H e Conexão.....	123
Tabela 9.2: Especificação dos fragmentos sequenciados, os números de reads produzidos, os números de reads alinhados e a média de cobertura para cada amostra.....	124

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Microscopia eletrônica da partícula do HIV emergindo da membrana plasmática de um linfócito.....	21
Figura 1.2: Linha do tempo destacando os marcos históricos da pesquisa em HIV.....	23
Figura 1.3: Partícula viral do HIV.....	26
Figura 1.4: Estrutura genômica do HIV e suas proteínas.....	27
Figura 1.5: Mecanismo de entrada da partícula viral na célula do hospedeiro.....	28
Figura 1.6: Replicação do HIV-1.....	29
Figura 1.7: Evolução clínica da infecção pelo HIV.....	31
Figura 1.8: Distribuição global dos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1, de 2010 a 2015.....	34
Figura 1.9: Distribuição regional dos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1, de 2010 a 2015.....	35
Figura 1.10: Atuação dos antirretrovirais em diferentes etapas do ciclo replicativo do HIV.....	36
Figura 1.11: Mapa esquemático da região genômica do sistema HLA humano.....	41
Figura 1.12: Figura esquemática representando a interação entre o peptídeo e a fenda de ligação das moléculas de HLA de classe I.....	43
Figura 1.13: Nomenclatura do sistema HLA.....	44
Figura 1.14: Etapas do processamento e apresentação de antígeno via HLA de classe I.....	45
Figura 4.1: Genoma completo do HIV e as diferentes estratégias de amplificação.....	57
Figura 4.2: Etapas da construção da biblioteca genômica.....	63
Figura 4.3: Sequência-referência anotada utilizada no alinhamento das amostras.....	68
Figura 5.1: Árvore filogenética de máxima verossimilhança contendo todas as 69 amostras que possuem o genoma proviral quase completo do HIV-1.....	77

## **LISTA DE GRÁFICOS**

Gráfico 5.1: Esquemas terapêuticos utilizados pelos pacientes incluídos no estudo.....75

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

µl – microlitro

3TC – lamivudina

ABC – abacavir

AC – antagonista de CCR5

aids – síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*)

ARV – retrovírus associado a aids (do inglês *aids-associated retrovirus*)

ATM – do inglês *Amplicon Tagment Mix*

ATV – atazanavir

ATV/r – atazanavir/ritonavir

AZT – zidovudina

AZT/r – zidovudina/ritonavir

Biovir – lamivudina + zidovudina

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCR5 – receptor de quimiocina tipo 5

CD4 – grupamento de diferenciação 4 (do inglês *cluster of differentiation 4*)

CD8 – grupamento de diferenciação 8 (do inglês *cluster of differentiation 8*)

cDNA – DNA complementar

Cél – célula

cen – centrômero

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CPI – complexo de pré-integração

cpx – complexo

CRF – forma recombinante circulante (do inglês *circulating recombinant form*)



CTL – célula T citotóxica CD8<sup>+</sup> (do inglês *cytotoxic T cell*)

CXCR4 – receptor de quimiocina tipo 4

d4T – estavudina

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DRV – darunavir

DTG – dolutegravir

EFV – efavirenz

ERAAP – aminopeptidase associada ao processamento de antígenos

EUA – Estados Unidos da América

FPV/r – fosamprenavir/ritonavir

FTC – Emtricitabina

HU-FURG – Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior

g – força g

GALT – tecido linfóide associado ao intestino (do inglês *gut-associated lymphoid tissue*)

H<sub>2</sub>O – água

HI – Hospital Federal de Ipanema

HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*)

HIV-1 – vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HIV-2 – vírus da imunodeficiência humana tipo 2

HLA – antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigen*)

HSH – homens que fazem sexo com homens

HT1 – do inglês *Hybridization Buffer*

HTLV-III – vírus linfotrópico de células T humano tipo 3 (do inglês *human T-cell lymphotropic virus type III*)

HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

i=i – indetectável = intransmissível

IAS – Sociedade Internacional Antiviral (do inglês *International Antiviral Society*)

IEDB – do inglês *Immune Epitope Database Analysis Resource*

IF – inibidor de fusão

II – inibidor de integrase

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

INNTR – inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa

INTR – inibidor nucleosídicos/nucleotídico da transcriptase reversa

IP – inibidor de protease

IQR<sub>50</sub> – variação interquartil

Kaletra – lopinavir + ritonavir

kb – quilobase

LAV – vírus associado à linfadenopatia (do inglês *lymphadenopathy-associated virus*)

LPV/r – lopinavir/ritonavir

LTR – regiões de repetições terminais longas (do inglês *long terminal repeats*)

M – molar

MgSO<sub>4</sub> – sulfato de magnésio

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês *Major Histocompatibility Complex*)

ml – mililitro

mM – milimolar

mm<sup>3</sup> – milímetro cúbico

N – normal

NaOH – hidróxido de sódio

ND – não disponível

NFLG – genoma quase completo (do inglês *near full-length genome*)

ng – nanograma

NGS – sequenciamento de nova geração (do inglês *next-generation sequencing*)

NK – do inglês *natural killer*

nm – nanômetro

nM – nanomolar

NPM – do inglês *Nextera PCR Master Mix*

NT – do inglês *Neutralize Tagment Buffer*

NVP – nevirapine

OH – hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

p – braço curto

pb – pares de bases

PBMC – célula mononuclear do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cell*)

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PEP – profilaxia pós-exposição

pH – potencial hidrogeniônico

PLC – complexo de carregamento de peptídeos (do inglês *peptide-loading complex*)

pM – picomol

pmol – picomol

PrEP – profilaxia pré-exposição

q – braço longo

RE – retículo endoplasmático

RJ – Rio de Janeiro

RNA – ácido ribonucléico (do inglês *ribonucleic acid*)

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

rpm – rotações por minuto

RS – Rio Grande do Sul

RSB – do inglês *Resuspension Buffer*

RT – transcriptase reversa

RTV – ritonavir

SIV – vírus da imunodeficiência símia (do inglês *simian immunodeficiency virus*)

SUS – Sistema Único de Saúde

TAM – mutações dos análogos da timidina (do inglês *thymidine analog mutations*)

TAP – transportador associado ao processamento de antígenos

TARV – tratamento antirretroviral

TasP – tratamento como prevenção (do inglês *treatment as prevention*)

TCD4 – linfócito T CD4

TCD4<sup>+</sup> – linfócito T CD4 positivo

TCD8 – linfócito T CD8

TCD8<sup>+</sup> – linfócito T CD8 positivo

TD – do inglês *Tagment DNA Buffer*

TDF – tenofovir

TDRM – mutações de resistência à droga transmitidas (do inglês *transmitted drug resistance mutations*)

Ter – telômero

TNF – fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrosis factor*)

U – unidade

UNAIDS – Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids (do inglês *The Joint United Nations Program on HIV/AIDS*)

URF – forma recombinante única (do inglês *unique recombinant form*)

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Histórico

No início da década de 80, nos Estados Unidos, foi relatado o primeiro caso de aids em humanos. Nesse primeiro registro, foi descrito que quatro homens homossexuais previamente saudáveis haviam contraído pneumonia, candidíase mucosa e múltiplas infecções virais. Com o decorrer dos meses, pelas características clínicas da doença, a síndrome foi associada a uma imunodeficiência potencialmente transmissível (GOTTLIEB *ET AL.*, 1981). Em 1983, o novo vírus foi isolado pela primeira vez por Françoise Barré-Sinoussi e colaboradores, no Instituto Pasteur na França, a partir da biópsia de linfonodo de um paciente homossexual (Figura 1.1) (BARRE-SINOUSSE *ET AL.*, 1983). Pelo fato dos primeiros registros clínicos terem ocorrido em pacientes homossexuais, a epidemia de aids foi associada exclusivamente a homens que fazem sexo com homens (HSH). Entretanto, com o decorrer dos anos, a epidemia passou a ser associada a usuários de drogas injetáveis, pessoas que receberam transfusão sanguínea, profissionais do sexo e, por fim, à população geral.

Em 1983, a doença já era denominada síndrome da imunodeficiência adquirida (aids, do inglês: *acquired immunodeficiency syndrome*), mas ainda não havia maiores esclarecimentos sobre seu agente etiológico. Um ano após o primeiro isolamento do vírus, foram realizados outros isolamentos independentes de vírus encontrados em pacientes com aids, o que gerou diversas nomenclaturas, como: vírus associado à linfadenopatia (LAV, do inglês: *lymphadenopathy-associated virus*) (BARRE-SINOUSSE *ET AL.*, 1983), vírus linfotrópico de células T humano tipo 3 (HTLV-III, do inglês: *human T-cell lymphotropic virus type III*) (POPOVIC *ET AL.*, 1984) e retrovírus associado a aids (ARV, do inglês: *aids-associated retrovirus*) (LEVY *ET AL.*, 1984). Somente em 1986 ocorreu o estabelecimento da nomenclatura para o HIV pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, o denominando Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês: *human immunodeficiency virus*) (COFFIN *ET AL.*, 1986B; COFFIN *ET AL.*, 1986A) (Figura 1.2).

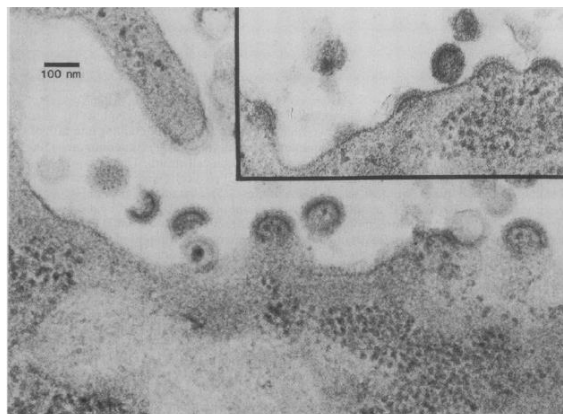


Figura 1.1: Microscopia eletrônica da partícula do HIV emergindo da membrana plasmática de um linfócito. Retirado de BARRE-SINOSSI *ET AL.*, 1983.

A sequência nucleotídica do HIV foi descrita por Sanchez-Pescador e colaboradores (1985) e por Wain-Hobson e colaboradores (1985). Com a informação genética disponível, foi possível a realização de estudos sobre diversidade, origem e evolução do vírus. Com isso, havia evidência suficiente de que o vírus era resultado de uma transmissão entre espécies. Dessa forma, no final da década de 80 foi descoberto que o HIV era uma zoonose derivada do vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês: *simian immunodeficiency virus*), que infecta mais de 40 espécies de primatas não-humanos na África sub-sariana (SHARP E HAHN, 2011; LOCATELLI E PEETERS, 2012).

Ainda na década de 80, o ciclo replicativo do HIV começou a ser caracterizado, o que possibilitou estudos mais abrangentes relacionados aos antirretrovirais. Estudos demonstraram que o fármaco AZT (zidovudina), originalmente sintetizado na década de 60 para o tratamento de câncer, tinha capacidade de bloquear a ação da enzima transcriptase reversa durante o ciclo replicativo viral (MITSUYA *ET AL.*, 1985), diminuindo a mortalidade e infecções oportunistas em pacientes com aids (FISCHL *ET AL.*, 1987). Entretanto, vírus resistentes à medicação começaram a surgir, levando à falha do tratamento e piorando o prognóstico clínico dos pacientes. Em 1996, um esquema terapêutico combinando três tipos de drogas foi empregado, visando uma melhor eficácia no tratamento. Desse modo, começou a ser administrado aos pacientes um inibidor de protease com dois inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa, marcando o início da utilização da terapia antirretroviral combinada (GULICK *ET AL.*, 1997; HAMMER

ET AL., 1997; PALELLA ET AL., 1998), o que transformou a infecção pelo HIV de uma doença fatal a uma doença crônica manejável que tem pouco efeito na expectativa de vida dos pacientes infectados (MARCUS ET AL., 2020).

Além dos avanços relacionados ao controle da replicação viral, iniciou-se a conscientização em relação à prevenção ao HIV, visando a diminuição da transmissão do vírus. Durante muitos anos o preservativo foi a principal forma de prevenção efetiva. O primeiro marco para as outras formas de prevenção ocorreu em 1994. Nesse ano um ensaio clínico mostrou que a administração de AZT a mulheres grávidas, e posteriormente ao recém-nascido, diminuía em 65% a chance de transmissão do vírus ao neonato (CONNOR ET AL., 1994), marcando o início da prevenção da transmissão do vírus de mãe para filho. Com o passar dos anos, diferentes métodos de prevenção foram desenvolvidos, como a circuncisão de homens na África do Sul (AUVERT ET AL., 2005), a utilização de um microbicida em gel à base de tenofovir em mulheres antes e depois do coito (ABDOOL KARIM ET AL., 2010), a profilaxia pós-exposição (PEP) (SMITH ET AL., 2005) e a profilaxia pré-exposição (PrEP) em homens que fazem sexo com homens (GRANT ET AL., 2010). Entretanto, todas as formas de prevenção só são eficazes com altos níveis de aderência ao método escolhido.

Outra mudança significativa ocorreu em 2012, quando a Sociedade Internacional Antiviral (IAS, do inglês: *International Antiviral Society*) passou a recomendar o início do tratamento antirretroviral a partir do diagnóstico positivo para o HIV, independente da contagem de células TCD4 (THOMPSON ET AL., 2012). Até então, o paciente só poderia iniciar o tratamento quando sua contagem de células TCD4<sup>+</sup> estivesse abaixo de 500 células/mm<sup>3</sup>. Em 2013, o Ministério da Saúde Brasileiro implementou essa recomendação no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Por fim, foi implementado o conceito de i=i (indetectável = intransmissível) para pessoas com carga viral indetectável há pelo menos seis meses, baseado em diversos estudos que mostraram uma redução significativa na taxa de transmissão entre casais soro-discordantes onde o parceiro HIV+ fazia uso de antirretrovirais, evidenciando que uma boa adesão ao tratamento antirretroviral também é uma forma de prevenção à transmissão (COHEN ET AL., 2011; COHEN ET AL., 2016; RODGER ET AL., 2016; THE LANCET, 2017; BAVINTON ET AL., 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019B; RODGER ET AL., 2019).

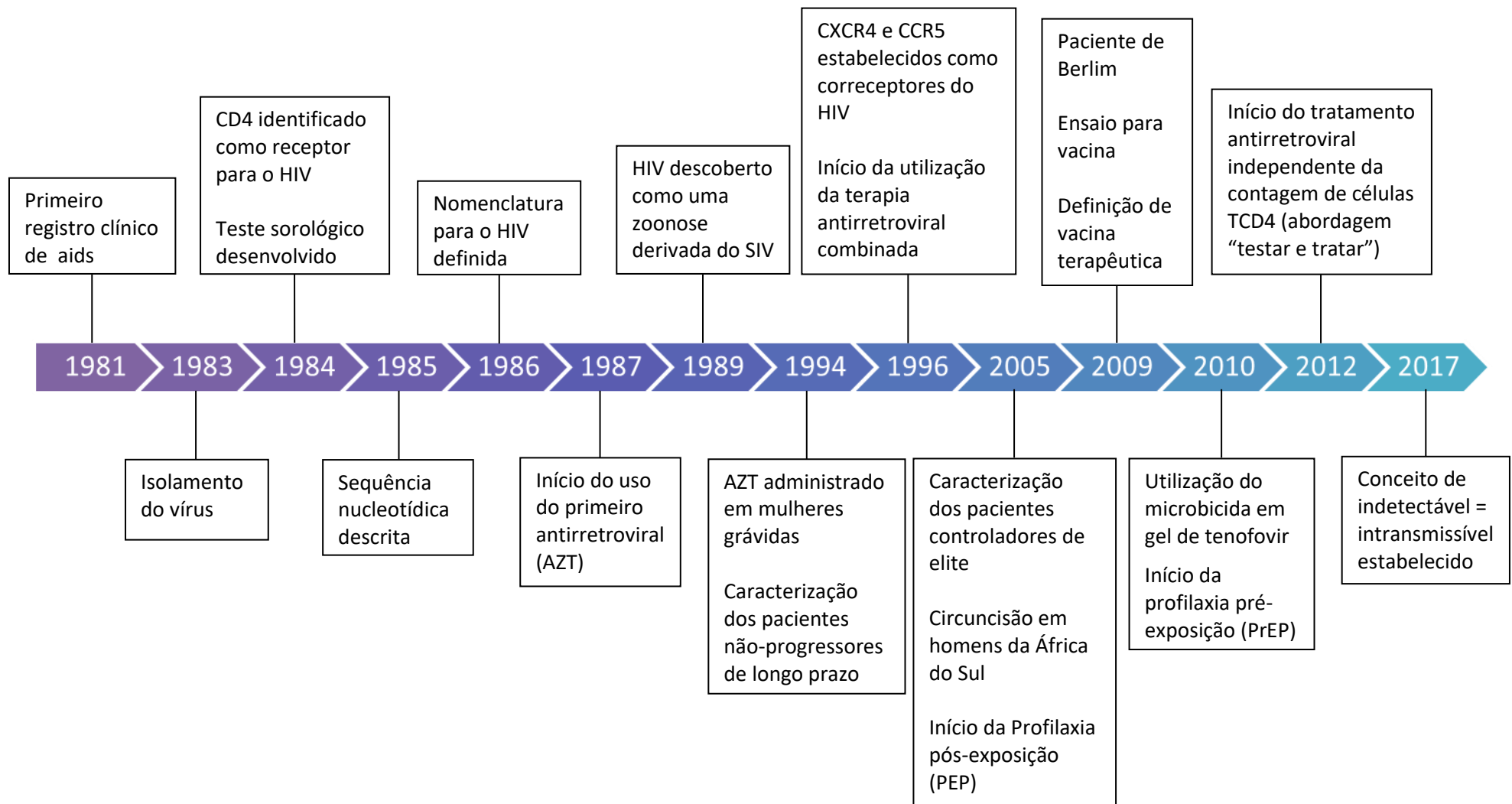


Figura 1.2: Linha do tempo destacando os marcos históricos da pesquisa em HIV.



## 1.2. Epidemiologia do HIV e aids

O último relatório da UNAIDS (2020) estimou que, até o fim de 2019, 38 milhões de pessoas viviam com HIV no mundo, sendo que dessas, 36,2 milhões eram adultos e 1,8 milhão eram crianças até os 14 anos de idade. Em 2019, 1,7 milhão de pessoas se infectaram pelo HIV, representando um declínio de 23% nas novas infecções por ano desde 2010 e sendo o menor número de novas infecções desde 1989. Além disso, até o fim de 2019, 25,4 milhões de pessoas tinham acesso ao tratamento antirretroviral, um aumento de quase quatro vezes em comparação a 2009. Estima-se que a ampliação do tratamento antirretroviral foi capaz de evitar 12,1 milhões de mortes relacionadas à aids desde 2010. Contudo, ainda assim, 690 mil pessoas morreram, em 2019, devido a enfermidades relacionadas à aids (UNAIDS, 2020).

Apesar dos avanços das últimas décadas, foi estimado que, em 2019, apenas 81% das pessoas que vivem com HIV sabiam de seu status sorológico, o que significa que, aproximadamente, sete milhões de pessoas no mundo ainda não estão cientes de sua sorologia positiva para o vírus. Além disso, é estimado que apenas 67% de todas as pessoas vivendo com HIV tenham acesso à terapia antirretroviral (UNAIDS, 2020).

Em 2019 foi estimado que haviam 2,1 milhões de pessoas vivendo com HIV na América Latina. O Brasil, o maior país da América Latina, é responsável por quase metade das pessoas que vivem com HIV na região, estimado em 920 mil pessoas até o final de 2019. Apesar de ser o único país da América Latina que distribui a profilaxia pré-exposição (PrEP) gratuitamente através do Sistema Único de Saúde (SUS), em 2019 foi registrado um aumento de 19% nos casos de novas infecções em relação a 2010. Em contrapartida, também foi estimado que 88% das pessoas que vivem com HIV no Brasil sabiam de seu status positivo e que 69% estavam fazendo uso da terapia antirretroviral, o que contribuiu para um decréscimo de 12% nas mortes relacionadas à aids em comparação a 2010 (UNAIDS, 2020).

Desde 1996, o Ministério da Saúde brasileiro distribui gratuitamente os medicamentos antirretrovirais através do SUS e, desde 2013, garante o tratamento para todas as pessoas que vivem com HIV, independente da sua contagem de carga viral e células TCD4<sup>+</sup>. Tais medidas resultaram na diminuição na taxa de detecção de casos de aids, que passou de 21,9 casos/100 mil habitantes em 2012 para 17,8/100 mil habitantes em 2019, representando um decréscimo de 18,7% na taxa

de detecção entre esses anos. Conseqüentemente, o acesso facilitado ao tratamento também mostra um impacto na mortalidade relacionada à aids, que apresentou uma redução de 28,1% no período de 2014 a 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O último boletim epidemiológico sobre HIV/aids disponibilizado pelo Ministério da Saúde (2020) estimou que das 42 mil novas infecções ocorridas no Brasil em 2019, o Sudeste e o Sul eram responsáveis por 35,3% e 18,2% delas, respectivamente. Em relação à taxa de detecção de aids nessas regiões, é visto uma diminuição em um período de dez anos, apresentando um decréscimo de 33,6% (de 23,2 para 15,4 casos/100 mil habitantes) no Sudeste e 30,3% (de 32,7 para 22,8/100 mil habitantes) no Sul entre 2009 e 2019. Quanto a mortalidade relacionada à aids, 39,7% e 19,1% dos óbitos ocorridos no Brasil em 2019 foram oriundos das regiões Sudeste e Sul, respectivamente. A principal via de transmissão para homens (85,3%) e mulheres (88%) maiores de 13 anos de idade, em todas as regiões brasileiras, é a via sexual. Entre os homens, em 2019, foi estimado um predomínio da categoria de exposição homossexual (46,3%) no Brasil, enquanto para as mulheres foi estimado um predomínio da categoria de exposição heterossexual (88%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Em 2017, no estado do Rio de Janeiro, foram notificados 4500 novos casos de HIV, sendo que a metade dos novos casos (2405; 53,4%) era proveniente da cidade do Rio de Janeiro. Além disso, também em 2017, 4173 casos de aids foram notificados no estado e quase a metade (2064; 49,4%) era oriunda da cidade do Rio de Janeiro, resultando em uma taxa de detecção de casos de aids de 25 e 31,7 casos/100 mil habitantes no estado e na cidade do Rio, respectivamente. (GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2018). Em relação ao Rio Grande do Sul, foram notificados 3697 novos casos de HIV no ano de 2017, sendo que 3,2% (120) deles foram provenientes da cidade de Rio Grande. Além disso, no estado, foram notificados 3316 casos de aids em 2017, o que representa uma taxa de detecção de aids de 29,4/100 mil habitantes, enquanto na cidade de Rio Grande a taxa de detecção de aids foi de 55,1/100 mil casos nesse mesmo ano. Tanto para o estado quanto para a cidade, a taxa de detecção é maior do que a encontrada no Brasil também em 2017, que foi estimada em 18,3 casos/100 mil habitantes (SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL, 2019). Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde de 2019, a cidade de Rio Grande é a primeira no ranking dos 100 municípios com mais de 100 mil habitantes segundo índice

composto (2014 a 2018), enquanto a cidade do Rio de Janeiro é a 54<sup>a</sup>. O índice composto considera a taxa de detecção, taxa de mortalidade e a primeira contagem de CD4 nos últimos cinco anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019A).

### 1.3. Partícula viral e estrutura genômica do HIV

O HIV é um membro do gênero *Lentivirus* pertencente à família *Retroviridae* (COFFIN *ET AL.*, 1997). Os retrovírus são capazes de integrar seu genoma ao DNA da célula hospedeira invadida e são caracterizados por possuir duas fitas de RNA como material genético associado à ação da enzima transcriptase reversa. Já os lentivírus são caracterizados por possuírem um longo período de incubação e são causadores de doenças de progressão lenta, como a síndrome de emaciação e a degeneração do sistema nervoso central.

A partícula infecciosa do HIV possui diâmetro de, aproximadamente, 100 nanômetros e uma forma arredondada (Figura 1.3). Sua região externa é envolta por um envelope glicoproteico de bicamada fosfolipídica derivado da membrana da célula do hospedeiro (GOTO *ET AL.*, 1994). Na região interna há a matriz, que é responsável por circundar o capsídeo e garantir a integridade da partícula viral e, interno à matriz, há o capsídeo, que é o responsável por englobar o genoma viral e suas enzimas associadas, como a transcriptase reversa, a integrase e a protease (WAIN-HOBSON *ET AL.*, 1985; MASSIAH *ET AL.*, 1996).

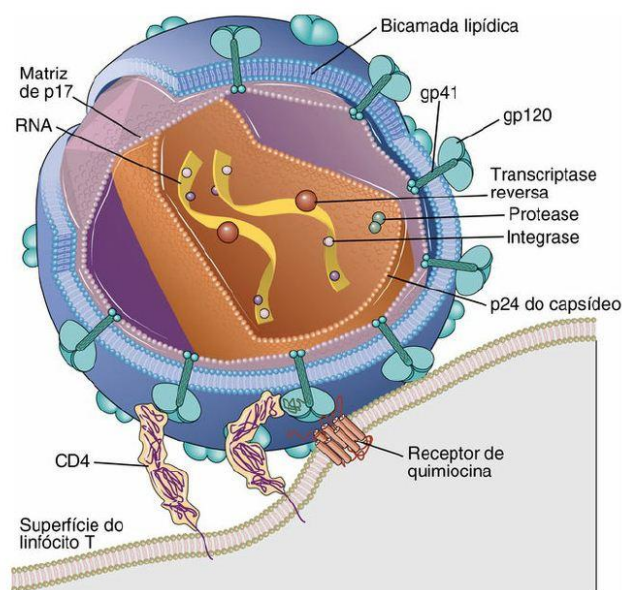


Figura 1.3: Partícula viral do HIV. Retirado de ABBAS *ET AL.*, 2015.

O genoma viral está localizado dentro do capsídeo e é composto por duas fitas simples de RNA similares de polaridade positiva com, aproximadamente, 9700 nucleotídeos cada (WAIN-HOBSON *ET AL.*, 1985). Sua estrutura genômica é linear e engloba nove genes (*gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* e *nef*) e duas regiões de repetições terminais longas (LTR, do inglês: *long terminal repeats*). Os genes podem ser classificados em três classes de acordo com suas funções: genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), que são comuns a todos os retrovírus; genes regulatórios (*tat* e *rev*) e genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*). A estrutura genômica e suas proteínas estão esquematizadas na Figura 1.4.

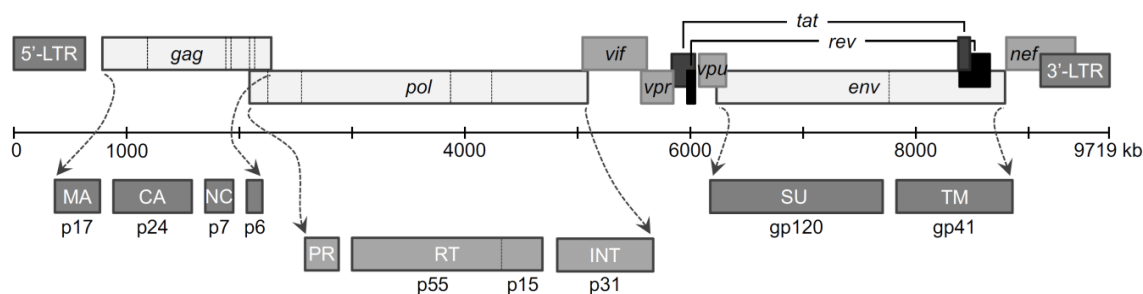


Figura 1.4: Estrutura genômica do HIV e suas proteínas. Retirado de DE GOEDE *ET AL.*, 2015A.

#### 1.4. Ciclo replicativo do HIV

O ciclo replicativo do HIV é iniciado pela ligação do vírus à célula-alvo e termina com o brotamento de um novo vírus, como esquematizado na Figura 1.6. O envelope viral possui um complexo de glicoproteínas que é composto por duas subunidades, uma gp120 (SU) externa e uma gp41 (TM) transmembranar. Esse complexo envolve a partícula viral e é responsável pela fusão da membrana da partícula com a membrana do hospedeiro (SATTENTAU *ET AL.*, 1993). Para que essa fusão ocorra, a subunidade de gp120 se liga ao seu receptor na célula-alvo, as moléculas de CD4, que estão presentes na superfície celular de células T, macrófagos e células dendríticas (DALGLEISH *ET AL.*, 1984; GARTNER *ET AL.*, 1986). A ligação de gp120 à molécula de CD4 causa uma alteração conformacional na gp120, proporcionando a sua ligação ao seu correceptor de quimiocina, CCR5 e/ou CXCR4 (Figura 1.5). A ligação ao correceptor induz uma alteração conformacional na subunidade gp41, que expõe o peptídeo de fusão e o insere na membrana celular, permitindo assim a fusão entre as membranas viral e do hospedeiro (SATTENTAU *ET AL.*, 1993).

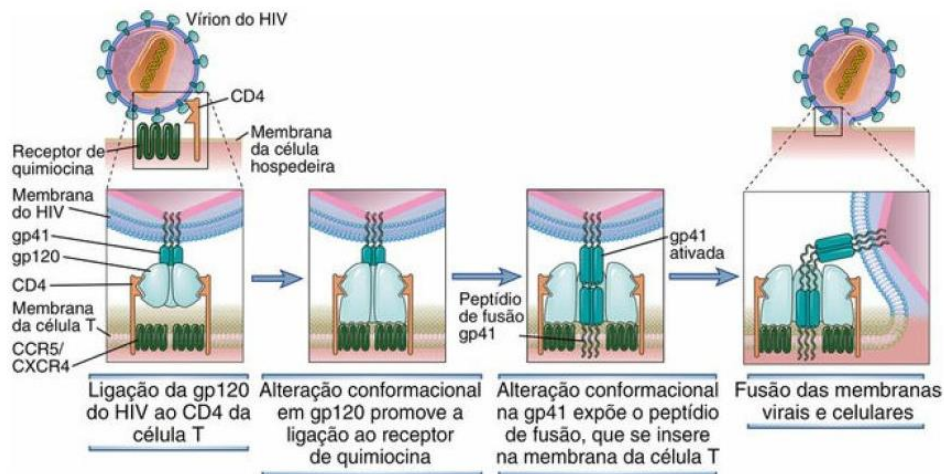


Figura 1.5: Mecanismo de entrada da partícula viral na célula do hospedeiro. Retirado de *ABBAS ET AL.*, 2015.

Depois da fusão celular, o capsídeo sofre desnudamento e seu material genético, junto de suas enzimas virais associadas, são liberados dentro do citoplasma da célula-alvo (KLIGER E SHAI, 1997). No citoplasma, a enzima transcriptase reversa viral transcreve o RNA viral em DNA complementar (cDNA) e o seu domínio RNase H cliva os híbridos de RNA-DNA gerados nesse momento e degrada a fita de RNA viral que foi utilizada como molde para a síntese de cDNA, permitindo então a formação de um cDNA de fita dupla (HANSEN *ET AL.*, 1988). O final do processo de retrotranscrição resulta no complexo de pré-integração (CPI), que é formado pelo cDNA e suas enzimas associadas, como a transcriptase reversa e a integrase (BOWERMAN *ET AL.*, 1989). O CPI é transportado até o núcleo celular em células não-proliferativas (HEINZINGER *ET AL.*, 1994) e é integrado ao genoma do hospedeiro através da enzima integrase (BOWERMAN *ET AL.*, 1989). O DNA integrado é chamado de provírus e ele passa a ser copiado durante os ciclos de divisão celular como se fosse parte do genoma do hospedeiro. O provírus pode permanecer inativo durante muitos anos, levando a célula ao estágio conhecido como latência, que é quando há pouca ou nenhuma produção de novas proteínas virais. Novos transcritos virais são produzidos somente quando ocorre a reativação das células latentes (MILLER *ET AL.*, 1997).

Quando ocorre a reativação das células latentes, o provírus começa a ser transcrito em RNA mensageiro (RNAm). Os pré-RNAm formados são processados pela maquinaria de *splicing* do hospedeiro e os RNAm maduros são transportados para o citoplasma. O controle dessa etapa é exercido, principalmente, pelos genes regulatórios *tat* e *rev*, onde a proteína Tat melhora o alongamento transcricional e

Rev realiza o transporte dos transcritos não-processados ou parcialmente processados do núcleo para o citoplasma (JONES E PETERLIN, 1994; FISCHER *ET AL.*, 1995). No citoplasma, os RNAm são traduzidos em proteínas virais e são transportados para perto da membrana plasmática, onde são empacotados para a formação de um novo vírus. As etapas de transporte e empacotamento são mediadas pelas poliproteínas Gag e Pol. Próximo à membrana, as novas partículas virais começam a ser montadas através do empacotamento dos componentes virais dentro de um complexo de nucleoproteínas (WILK *ET AL.*, 2001). Depois, esse complexo começa a brotar através da membrana do hospedeiro, capturando Env e glicoproteínas para a formação de seu envelope viral e a proteína Vpu permite a liberação das partículas virais da célula hospedeira. Durante o brotamento da partícula viral, a etapa de maturação é iniciada. Essa etapa é mediada pela enzima viral protease que cliva as poliproteínas de Gag e Pol, resultando em vírus maduros e infecciosos (KAPLAN *ET AL.*, 1994). Por fim, o novo vírus é capaz de propagar a infecção ao se ligar a outras células não infectadas, reiniciando assim o seu ciclo replicativo.

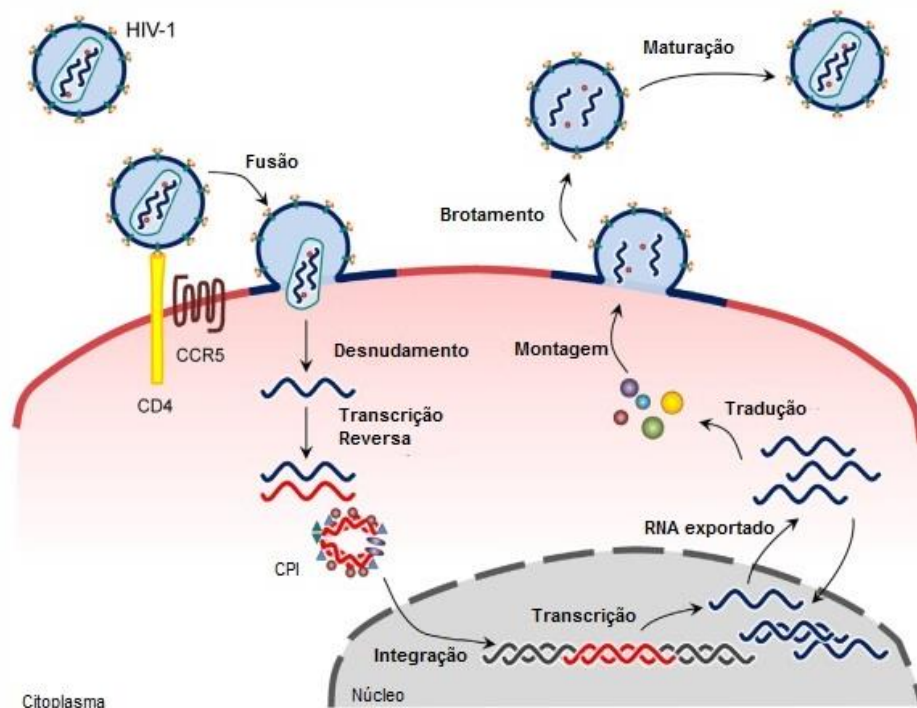


Figura 1.6: Replicação do HIV-1. Retirado e traduzido de DE GOEDE *ET AL.*, 2015A.

### **1.5. História natural da infecção pelo HIV**

A transmissão do HIV pode ocorrer por meio de três vias, conhecidas como transmissão sexual, transmissão vertical e transmissão intravenosa. A transmissão sexual consiste na infecção do indivíduo através de relações sexuais desprotegidas, enquanto a transmissão vertical consiste na transmissão do vírus de mãe para filho, podendo ocorrer durante a gestação, no momento do parto ou através da amamentação. Já a transmissão intravenosa ocorre durante o compartilhamento de agulhas contaminadas por usuários de drogas injetáveis ou durante a transfusão de sangue contaminado (COWAN *ET AL.*, 1984; DES JARLAIS *ET AL.*, 1986; SPIRA *ET AL.*, 1996).

Quando há exposição ao vírus, o seu principal alvo são as células que expressam em sua superfície os receptores CD4. Dessa forma, as principais células-alvo do HIV são os linfócitos T, macrófagos e células dendríticas (DALGLEISH *ET AL.*, 1984; GARTNER *ET AL.*, 1986; COFFIN *ET AL.*, 1997). Além do CD4, o vírus também necessita se ligar a um correceptor para que ocorra a fusão entre as membranas viral e do hospedeiro, sendo esse papel desempenhado, principalmente, pelos receptores de quimiocina CCR5 e/ou CXCR4 (FENG *ET AL.*, 1996). Quando a infecção se estabelece, o vírus é carregado para outros tecidos e órgãos, principalmente para os órgãos linfóides, que possuem uma grande quantidade de células-alvo para o HIV (SPIRA *ET AL.*, 1996).

A história natural da infecção pelo HIV ocorre em quatro fases: fase de eclipse, fase aguda, fase crônica de latência clínica e fase de aids. A fase de eclipse se inicia no momento em que ocorre a infecção e acontece durante os primeiros dias da mesma. Essa fase é caracterizada pelos eventos de infecção iniciais nos sítios de entrada e pela disseminação do vírus para outros tecidos e órgãos. Nessa fase ainda não há resposta imune, não há sintomas de infecção e não é possível detectar o vírus por testes laboratoriais, incluindo os testes ultrassensíveis (COFFIN E SWANSTROM, 2013).

A segunda fase da infecção, a fase aguda, também pode ser chamada de infecção primária (Figura 1.7). A fase aguda ocorre do final da fase de eclipse até a quarta semana da infecção e é caracterizada pelos altos níveis de viremia (vírus replicantes na mucosa e vírus circulantes no sangue periférico), pela alta quantidade de células TCD4<sup>+</sup> infectadas no sangue/linfonodos e também pela extensa morte das mesmas. Nessa fase é comum o indivíduo apresentar sintomas parecidos com os de resfriados, como febre e aumento de gânglios linfáticos (COFFIN E SWANSTROM,



2013). No início da fase aguda, o vírus continua a se disseminar para outros tecidos e órgãos, com uma preferência para os tecidos linfóides associados ao intestino (GALT, do inglês: *gut-associated lymphoid tissues*), uma vez que eles possuem uma grande quantidade de células TCD4<sup>+</sup> expressando o correceptor CCR5 (BRECHLEY *ET AL.*, 2004). O primeiro pico de carga viral ocorre nessa fase e as células TCD8<sup>+</sup> são ativadas para controlar a replicação viral, pois são elas que eliminam as células infectadas pelo HIV. As principais células infectadas pelo HIV são as células TCD4<sup>+</sup>, desse modo, é visto uma acentuada diminuição das células TCD4<sup>+</sup> durante o primeiro pico de carga viral. Na metade da fase aguda, os anticorpos específicos para o HIV passam a ser encontrados no sangue, marcando a soroconversão do indivíduo e possibilitando a detecção do vírus através de testes laboratoriais (MCMICHAEL *ET AL.*, 2010). No final da fase aguda, a viremia sofre uma queda, principalmente pela resposta imune do hospedeiro, e atinge um ponto estável; a contagem de células TCD4<sup>+</sup> aumenta, quase retornando aos níveis normais e muitos linfócitos infectados entram em latência, criando reservatórios virais no organismo (DE GOEDE *ET AL.*, 2015A).

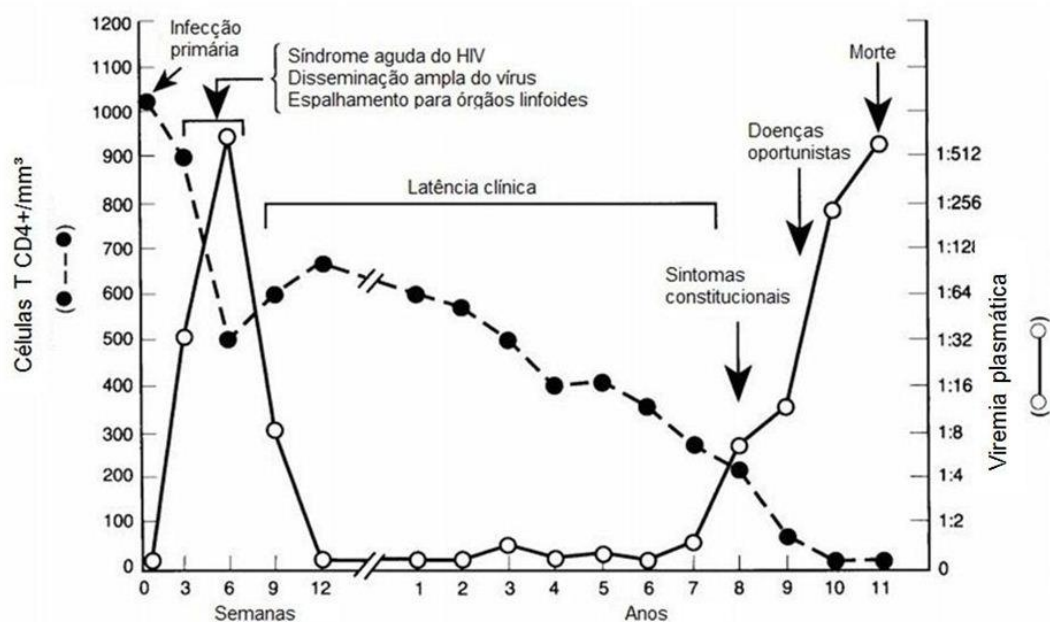


Figura 1.7: Evolução clínica da infecção pelo HIV. Retirado e traduzido de PANTALEO *ET AL.*, 1993.

A terceira fase da infecção é a fase crônica de latência clínica. Nessa fase, os pacientes são assintomáticos e ela é caracterizada por um nível constante ou levemente crescente da viremia, podendo perdurar por mais de dez anos. Por mais que essa seja uma fase de latência, o vírus continua a se replicar e a infectar novas



células. Com isso, em decorrência da ação do sistema imune, a contagem de células TCD4<sup>+</sup> diminui gradualmente e com a perda da resposta imune e da falta de tratamento, o paciente pode progredir para a última fase, conhecida como fase de aids (COFFIN E SWANSTROM, 2013). A síndrome da imunodeficiência adquirida (aids, do inglês: *acquired immunodeficiency syndrome*) é a doença causada pelo HIV e é a última fase da história natural da infecção. A fase de aids é iniciada quando a contagem de células TCD4<sup>+</sup> cai abaixo de 200 células/mm<sup>3</sup> e/ou quando aparecem doenças oportunistas (também conhecidas como doenças definidoras de aids), como infecções bacterianas múltiplas ou recorrentes, candidíase, sarcoma de Kaposi, pneumonia recorrente, câncer cervical invasivo, entre outros (CENTERS FOR DISEASE E PREVENTION, 2014). Na ausência de tratamento, a fase de aids comumente leva o paciente a óbito.

### **1.6. Classificação filogenética e diversidade genética do HIV**

Os fatores mais importantes do sucesso da disseminação do HIV pelo mundo são sua rápida evolução e sua variabilidade genética. O HIV é originário de diversas e independentes transmissões zoonóticas do vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês: *simian immunodeficiency virus*) de primatas não-humanos para humanos, que resultaram em duas linhagens distintas do HIV: HIV do tipo 1 (HIV-1) e HIV do tipo 2 (HIV-2). Em razão das diferenças filogenéticas e da diferente origem das cepas de HIV, os dois tipos tiveram que ser divididos em grupos. Dessa forma, o HIV-1 é dividido em M (main/major), N (non-M/non-O), O (outlier) e P; o HIV-2 é dividido em oito grupos, de A a H. Estudos mostram que os grupos M e N do HIV-1 se originaram, independentemente, do SIVcpz encontrado em chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*) do centro-oeste da África e os grupos O e P se originaram do SIVgor encontrado em gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) de Camarões (GAO ET AL., 1999; KEELE ET AL., 2006; VAN HEUVERSWYN ET AL., 2006; PLANTIER ET AL., 2009; D'ARC ET AL., 2015). Atualmente, em razão de seu sucesso disseminativo, o grupo M do HIV-1 é encontrado no mundo todo, sendo o principal responsável pela pandemia; o grupo O é encontrado na África Central Ocidental e os grupos N e P são encontrados em Camarões (GURTLER ET AL., 1994; SIMON ET AL., 1998; ROBERTSON ET AL., 2000; ROQUES ET AL., 2004; PLANTIER ET AL., 2009).

Durante o ciclo replicativo do HIV, para que haja sucesso ao integrar o seu genoma ao genoma do hospedeiro, é necessário que a enzima transcriptase reversa

transcreva o RNA viral em cDNA. Entretanto, essa enzima não possui um mecanismo de revisão de pareamento de bases no sentido 3' → 5', acarretando em muitos erros (mutações) por incorporação errônea de nucleotídeos no momento da retrotranscrição (ROBERTS *ET AL.*, 1988). Dessa forma, a alta variabilidade genética do HIV é causada pela infidelidade da enzima transcriptase reversa. Além disso, é visto que as mutações de deleção, inserção e substituição, somadas às altas taxas de replicação do vírus, resultam em uma população viral heterogênea, podendo atingir até 10% de diferença em um mesmo indivíduo (KORBER *ET AL.*, 2001). Frente a isso, com o decorrer dos anos e com a adaptação dos vírus às pressões seletivas do hospedeiro, os grupos do HIV-1 foram se diversificando cada vez mais. Sendo assim, o grupo M foi dividido em dez subtipos puros: A, B, C, D, F, G, H, J, K e L (ROBERTSON *ET AL.*, 2000; YAMAGUCHI *ET AL.*, 2020) e o grupo O em cinco: I, II, III, IV e V (YAMAGUCHI *ET AL.*, 2002). Os subtipos A e F do grupo M tiveram que ser subdivididos por conta de suas diferenças filogenéticas. Dessa forma, o subtipo A foi subdividido em cinco sub-subtipos (A1 – A5) e o subtipo F foi dividido em dois sub-subtipos (F1 e F2). Os grupos N e P não precisaram ser divididos em subtipos em função das poucas cepas descritas até o momento (PLANTIER *ET AL.*, 2009; DELAUGERRE *ET AL.*, 2011; VALLARI *ET AL.*, 2011).

A análise de múltiplas regiões genômicas, a partir do sequenciamento genômico completo, possibilitou a identificação de recombinação entre diferentes subtipos. É visto que a recombinação pode ocorrer entre subtipos do mesmo grupo ou entre subtipos de grupos diferentes (PEETERS *ET AL.*, 1999; ROUSSEAU *ET AL.*, 2007), aumentando ainda mais a variabilidade genética do HIV. As recombinações que ocorrem entre os subtipos do grupo M do HIV-1 são classificadas em formas recombinantes únicas (URF, do inglês: *unique recombinant form*) ou em formas recombinantes circulantes (CRF, do inglês: *circulating recombinant form*). Os URFs são caracterizados quando os pontos de quebra da recombinação são encontrados em um único indivíduo, enquanto os CRFs são classificados quando os pontos de quebra da recombinação são os mesmos encontrados em três ou mais pessoas que não estão interligadas epidemiologicamente, evidenciando uma transmissão sustentada (ROBERTSON *ET AL.*, 2000). Além disso, o CRF é chamado de complexo (cpx) quando é formado por três ou mais subtipos, como é o caso do CRF18\_cpx e CRF27\_cpx, que são formados por seis e sete subtipos diferentes, respectivamente (THOMSON *ET AL.*, 2005; VIDAL *ET AL.*, 2008). Dessa forma, é visto que os CRFs podem compor verdadeiros mosaicos, uma vez que podem ser compostos por diversos

subtipos puros ou recombinantes. Atualmente, já foram descritos 102 CRFs para o HIV-1 e um para o HIV-2 (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html>; acessado em 02 de junho de 2021).

Hemelaar e colaboradores (2019) mostraram que, de 2010 a 2015, o grupo M apresentava diferentes padrões de distribuição de seus subtipos puros e recombinantes no mundo. Esse estudo mostrou que havia uma prevalência global de 46,6% do subtipo C, 12,1% do subtipo B, 10,2% do subtipo A e 22,9% das formas recombinantes únicas e circulantes (Figura 1.8).

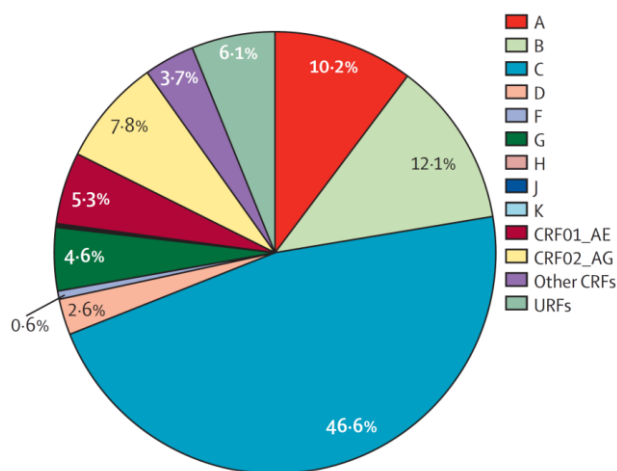


Figura 1.8: Distribuição global dos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1, de 2010 a 2015. CRF: forma recombinante circulante; URF: forma recombinante única. Retirado de HEMELAAR ET AL., 2019.

O estudo realizado por Hemelaar e colaboradores (2019) também mostrou a distribuição dos subtipos, de 2010 a 2015, ao agrupar os países em 14 regiões (Figura 1.9). É possível observar na Figura 1.9 que o subtipo B é predominante na Europa, América do Norte, Caribe e América Latina. O Brasil segue o mesmo padrão da América Latina e também apresenta uma prevalência do subtipo B. Entretanto, é observada uma ascensão dos subtipos não-B no país, como os subtipos F1, C e recombinantes, principalmente as recombinações entre BF1 e BC (BRIGIDO ET AL., 2005; PEDROSO ET AL., 2007; CARDOSO ET AL., 2009; MACHADO ET AL., 2009; MONTEIRO-CUNHA ET AL., 2011). Além disso, há uma diferença na prevalência dos subtipos entre os estados brasileiros, tendo a maioria das regiões (Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) uma alta prevalência do subtipo B, seguido pelo subtipo F1 e pelo recombinante BF1. Já na região Sul do Brasil há uma prevalência do subtipo C,

seguido pelo subtipo B e pelo recombinante BC (CARDOSO *ET AL.*, 2009; DIAS *ET AL.*, 2009; MACHADO *ET AL.*, 2009; PASSAES *ET AL.*, 2009).

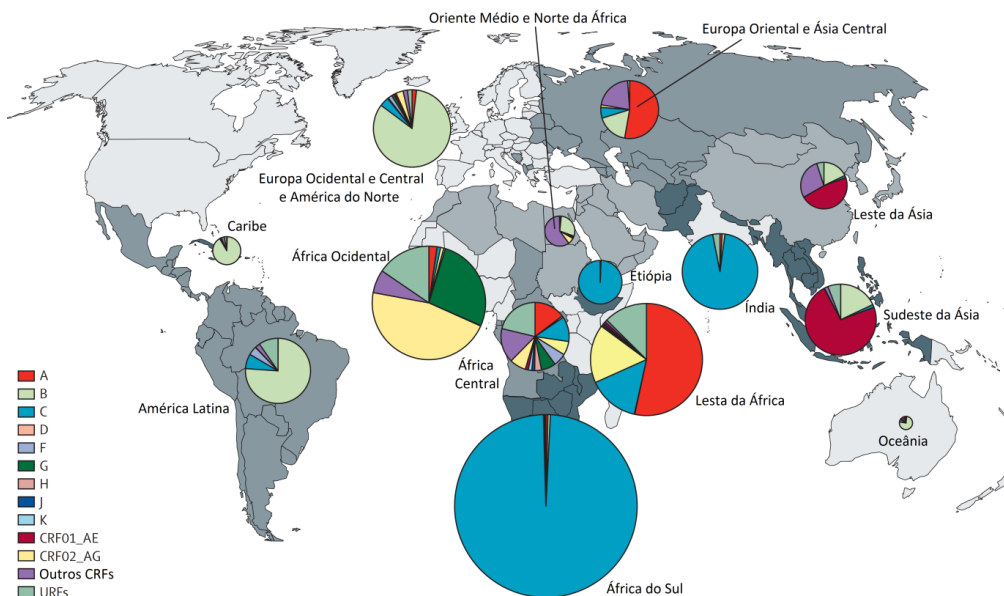


Figura 1.9: Distribuição regional dos subtipos puros e recombinantes do grupo M do HIV-1, de 2010 a 2015. CRF: forma recombinante circulante; URF: forma recombinante única. Retirado e traduzido de HEMELAAR *ET AL.*, 2019.

## 1.7. Tratamento antirretroviral

O tratamento de pessoas vivendo com HIV consiste na utilização de medicamentos antirretrovirais. Esses medicamentos não são capazes de erradicar o vírus do organismo, mas são capazes de inibir a replicação viral e, conseqüentemente, melhorar a resposta imunológica do hospedeiro. Com a replicação viral inibida, o paciente pode atingir a carga viral indetectável, situação na qual os níveis de HIV no sangue são muito baixos, a ponto de não poderem ser detectados pelos testes laboratoriais. A carga viral indetectável é o principal objetivo da utilização da terapia, sendo assim, quando a mesma é atingida, é dito que o paciente está em sucesso terapêutico. Estudos indicam que pacientes em sucesso terapêutico apresentam uma melhoria em sua qualidade de vida, com a diminuição da morbidade, mortalidade e a progressão para a aids (GULICK *ET AL.*, 1997; HAMMER *ET AL.*, 1997; PALELLA *ET AL.*, 1998; HIRSCH *ET AL.*, 2008). Além disso, a carga viral indetectável também elimina o risco de transmissão do vírus pela via sexual, (THE LANCET, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019B).

Para inibir a replicação viral, os medicamentos antirretrovirais atuam em diferentes etapas do ciclo replicativo do vírus (Figura 1.10). Esses medicamentos são divididos em seis classes de acordo com o mecanismo de ação utilizado no impedimento da replicação viral: inibidores de fusão (IF), antagonistas de CCR5 (AC), inibidores nucleosídicos/nucleotídico da transcriptase reversa (INTR), inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR), inibidores de integrase (II) e inibidores de protease (IP) (POMERANTZ E HORN, 2003).

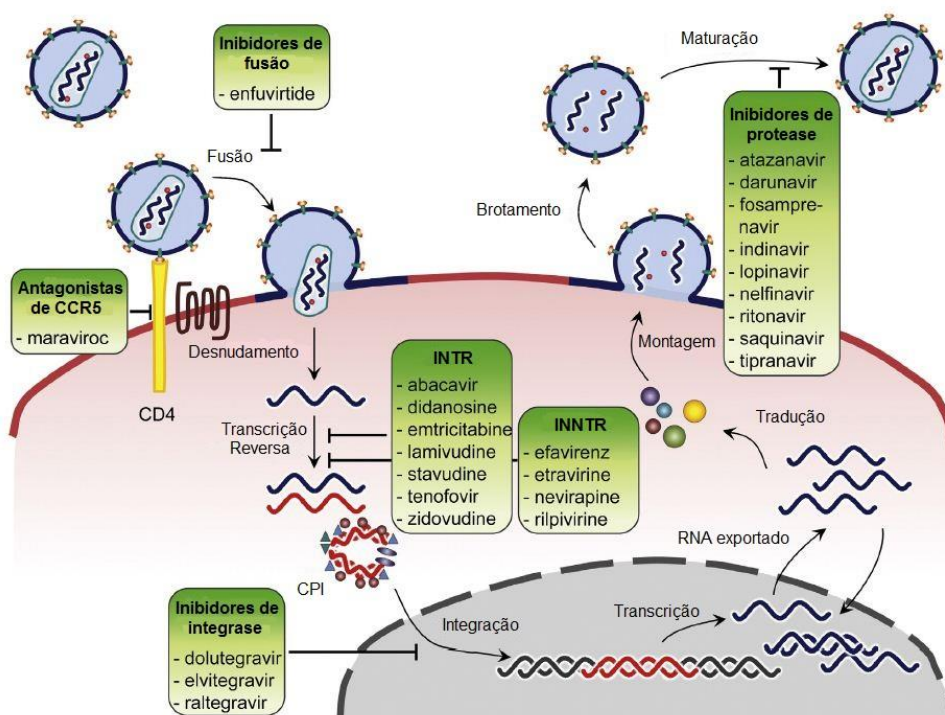


Figura 1.10: Atuação dos antirretrovirais em diferentes etapas do ciclo replicativo do HIV. Retirado e traduzido de DE GOEDE ET AL., 2015B.

A Organização Mundial da Saúde recomenda que a primeira linha de tratamento seja composta por dois medicamentos da classe dos INTRs e um medicamento de alguma outra classe. Atualmente, no Brasil, há 21 fármacos antivirais em 37 apresentações farmacêuticas (<http://www.aids.gov.br/pt-br/publico-geral/o-que-e-hiv/tratamento-para-o-hiv>; acessado em 03 de junho de 2021) e a recomendação é que a primeira linha de tratamento seja composta por dois medicamentos da classe dos INTRs e um medicamento da classe dos IIs, sendo essa combinação preferencialmente composta por lamivudina (3TC), tenofovir (TDF) e dolutegravir (DTG) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Globalmente, até o fim de 2019, haviam 25,4 milhões de pessoas com acesso à terapia antirretroviral (UNAIDS, 2020), representando um aumento de mais de cinco vezes em comparação com 2009. O crescente progresso na distribuição do tratamento está relacionado com a criação de um projeto mundial que visa a erradicação da epidemia de HIV até o ano de 2030. Em 2014, o Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/aids (UNAIDS, do inglês: *The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*) criou o projeto conhecido como Metas 90-90-90 (do inglês: *90-90-90 targets*), propondo que, até 2020, 90% das pessoas infectadas pelo HIV saibam de seu estado sorológico, 90% das pessoas que sabem da sua sorologia positiva estejam recebendo a terapia antirretroviral e que 90% das pessoas em tratamento tenham a carga viral suprimida (UNAIDS, 2015). Contudo, ao final de 2019, 81% das pessoas vivendo com HIV sabiam de seu estado sorológico; desses, 82% tinham acesso ao tratamento antirretroviral e, entre os pacientes em tratamento, 88% tinham atingido a supressão da carga viral (UNAIDS, 2020).

### **1.8. Mutações de resistência aos antirretrovirais**

Como dito anteriormente, a enzima transcriptase reversa (RT) não possui um mecanismo de revisão. Roberts e colaboradores (1988) relataram que a RT possui uma média de taxa de erro por nucleotídeo incorporado de 1/1700. As trocas nucleotídicas (inserção/deleção/substituição) ocasionadas pela RT podem acarretar em trocas de aminoácidos, possibilitando o surgimento de vírus resistentes aos antirretrovirais. A resistência viral é caracterizada pela capacidade do vírus se replicar na presença de um medicamento que tem a finalidade de inibir a replicação. Portanto, o surgimento de vírus resistentes aos antirretrovirais é resultante de um somatório entre as taxas de replicações virais e de pressões seletivas ocasionadas pelos antirretrovirais. Pacientes não tratados também podem apresentar vírus resistentes aos medicamentos (PERELSON E RIBEIRO, 2013), mas eles raramente são fixados na população viral, uma vez que não há uso de medicamentos que selecionem as mutações de resistência e também porque vírus carregando mutações de resistência são, normalmente, menos adaptados à replicação na ausência de pressão seletiva das drogas.

A falta de vigilância sobre o desenvolvimento de mutações permite a seleção de vírus resistentes, os quais podem se tornar majoritários na população viral do indivíduo e ocasionar a falha terapêutica (VANDAMME ET AL., 1999). A falha

terapêutica é a principal preocupação no manejo das pessoas vivendo com HIV, uma vez que ela aumenta a carga viral do paciente, o que pode levar a uma maior taxa de transmissão e pode diminuir a eficácia do sistema imune, prejudicando seu quadro clínico. Diversos estudos mostram a relação das mutações de resistência com a falha terapêutica (LI E KURITZKES, 2013; KARADE *ET AL.*, 2016; KYEYUNE *ET AL.*, 2016; ADAWAYE *ET AL.*, 2017; BACHMANN *ET AL.*, 2019; TAKOU *ET AL.*, 2019; GUPTA-WRIGHT *ET AL.*, 2020; PATIL *ET AL.*, 2020). Desse modo, mostra-se necessária a constante vigilância do surgimento de mutações de resistência aos medicamentos.

As mutações de resistência aos antirretrovirais são classificadas em principais e acessórias. As mutações principais são capazes de gerar resistência aos medicamentos diretamente, enquanto as mutações acessórias necessitam de uma combinação com outras mutações para serem capazes de gerar algum grau de resistência. Além disso, as mutações de resistência aos antirretrovirais possuem duas origens: ou são adquiridas ou são transmitidas. As mutações de resistência adquiridas são provenientes de pressões seletivas sofridas pela população viral do próprio paciente, já as mutações transmitidas são encontradas em pacientes recém-infectados que ainda não iniciaram o tratamento com aquela classe de antirretrovirais, evidenciando uma infecção por um vírus já resistente. No último caso, essas mutações são conhecidas como mutações de resistência à droga transmitidas (TDRM, do inglês: *transmitted drug resistance mutations*). Estudos mostram que a prevalência de TDRMs tem aumentado na população que vive com HIV (PANICHSILLAPAKIT *ET AL.*, 2016; FERREIRA *ET AL.*, 2017; RHEE *ET AL.*, 2019). Desse modo, as mutações de resistência representam um problema de saúde pública e um problema no manejo da população vivendo com HIV, uma vez que diminuem as opções terapêuticas disponíveis, podem causar falha terapêutica e podem ser transmitidas.

Atualmente, as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês: *next-generation sequencing*) permitiram um grande avanço na detecção e monitoramento das mutações associadas à resistência aos antirretrovirais. As principais vantagens do uso do NGS são o aumento do número de bases sequenciadas por corrida, o sequenciamento paralelo de diferentes regiões-alvo, o sequenciamento clonal de moléculas únicas de DNA, o sequenciamento de diversas amostras ao mesmo tempo e o grande volume de sequências geradas por corrida (GRUMBT *ET AL.*, 2013). Além disso, a utilização do NGS no estudo do HIV possibilitou o sequenciamento de genomas quase completos (NFLG, do inglês: *near full-length*

*genomes*), o que amplia os estudos de diversidade genética, evolução, epidemiologia e mutações de resistência aos medicamentos.

Testes de resistência genotípica são prescritos a pacientes HIV-positivos antes do início do tratamento ou em um cenário de falha terapêutica, a fim de verificar a presença de mutações de resistência aos antirretrovirais. Os testes padrões são realizados através da metodologia de Sanger (GIBSON *ET AL.*, 2017; MACHNOWSKA *ET AL.*, 2019; TELELE *ET AL.*, 2019; ZHAO *ET AL.*, 2020). Contudo, o sequenciamento de Sanger possui um limite de detecção de variantes; ele apenas detecta mutações que possuem frequência acima de 20% na população viral. Por outro lado, a metodologia de NGS, por ser mais sensível, possibilita a detecção de variantes que possuem frequência abaixo de 20% na população viral, conhecidas como variantes minoritárias. Diversos estudos comparam as metodologias de Sanger e NGS quanto à sua eficiência na detecção de variantes e concluem que o NGS é mais sensível, mais eficaz e possui um custo mais baixo por sequência (PALMER *ET AL.*, 2005; MOHAMED *ET AL.*, 2014; ARIAS *ET AL.*, 2018; TZOU *ET AL.*, 2018; AVILA-RIOS *ET AL.*, 2020).

Apesar dos avanços na detecção das variantes minoritárias, seus desfechos clínicos ainda não estão estabelecidos na literatura. Alguns estudos mostram uma associação entre a presença das variantes minoritárias e a falha terapêutica, enquanto outros não mostram essa correlação (HALVAS *ET AL.*, 2010; STEKLER *ET AL.*, 2011; LI *ET AL.*, 2012; LI E KURITZKES, 2013; CHARPENTIER *ET AL.*, 2015; COZZI-LEPRI *ET AL.*, 2015; NISHIZAWA *ET AL.*, 2015; KYEYUNE *ET AL.*, 2016; STELLA-ASCARIZ *ET AL.*, 2017). Em contrapartida, já está estabelecido na literatura que a presença de variantes minoritárias com resistência à classe dos INNTRs aumenta o risco de falha terapêutica a essa classe (HALVAS *ET AL.*, 2010; LI *ET AL.*, 2012; COZZI-LEPRI *ET AL.*, 2015; NISHIZAWA *ET AL.*, 2015). Desse modo, esses resultados evidenciam a necessidade de vigilância das variantes minoritárias através de testes mais sensíveis de resistência genotípica, a fim de que seja compreendida a influência das mutações minoritárias no tratamento antirretroviral.

### **1.9. Infecção viral e apresentação ao sistema imune**

A susceptibilidade a infecções virais e a velocidade da progressão para a doença pode ser influenciada por fatores genéticos do hospedeiro. Atualmente é sabido que o sistema de antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês: *human*



*leukocyte antigen*) está relacionado com a magnitude da resposta imune a muitas doenças infecciosas, como aids, hepatite, malária, tuberculose, hanseníase, leishmaniose e esquistossomose (HUY *ET AL.*, 2011; RIBAS-SILVA *ET AL.*, 2013; SAKHNO *ET AL.*, 2015; SAUER *ET AL.*, 2016).

As células T fazem parte do sistema imune adaptativo e são responsáveis pela maior proporção, de 45% a 70%, das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês: *peripheral blood mononuclear cells*) (COST ACTION FA1005, 2015). Essas células monitoram constantemente o corpo humano à procura de sinais de células infectadas por patógenos ou sinais de células disfuncionais, como as células tumorais (JANEWAY *ET AL.*, 2001). Quando uma célula representa uma ameaça ao organismo, ela é rapidamente identificada e eliminada para que se mantenha a homeostase dos tecidos. Para que a eliminação ocorra, as células TCD8<sup>+</sup> imaturas reconhecem as células infectadas/disfuncionais, através de sua ligação com o sistema HLA-peptídeo, e são convertidas em células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (CTLs, do inglês: *cytotoxic T cells*) (HIVROZ *ET AL.*, 2012), que são as células T efetoras com função de matar a célula-alvo.

### **1.10. Sistema HLA**

O primeiro registro de HLA ocorreu em 1958. Naquele ano, o pesquisador francês Jean Dausset publicou um estudo sorológico sobre a presença de leucoaglutinantes em pacientes politransfundidos e nomeou o primeiro antígeno humano de MAC (DAUSSET, 1958), agora conhecido como HLA-A\*02. Atualmente, sabe-se que a principal função do sistema HLA é o reconhecimento de agentes estranhos e a apresentação de peptídeos na superfície celular para o reconhecimento pelo sistema imunológico. Dessa forma, o sistema HLA representa um papel importante na ativação da resposta imune através da distinção entre moléculas próprias e não-próprias, influenciando diretamente na rejeição de órgãos transplantados (CLAAS E DUQUESNOY, 2008), na terapia de transfusão (CHOO, 2007), na autoimunidade (FERNANDO *ET AL.*, 2008) e na resposta imunológica a agentes infecciosos como, por exemplo, o HIV (MARTIN E CARRINGTON, 2005; FELLAY *ET AL.*, 2007). Os genes do sistema HLA são divididos em classe I, classe II ou classe III, de acordo com a sua estrutura e função (Figura 1.11).

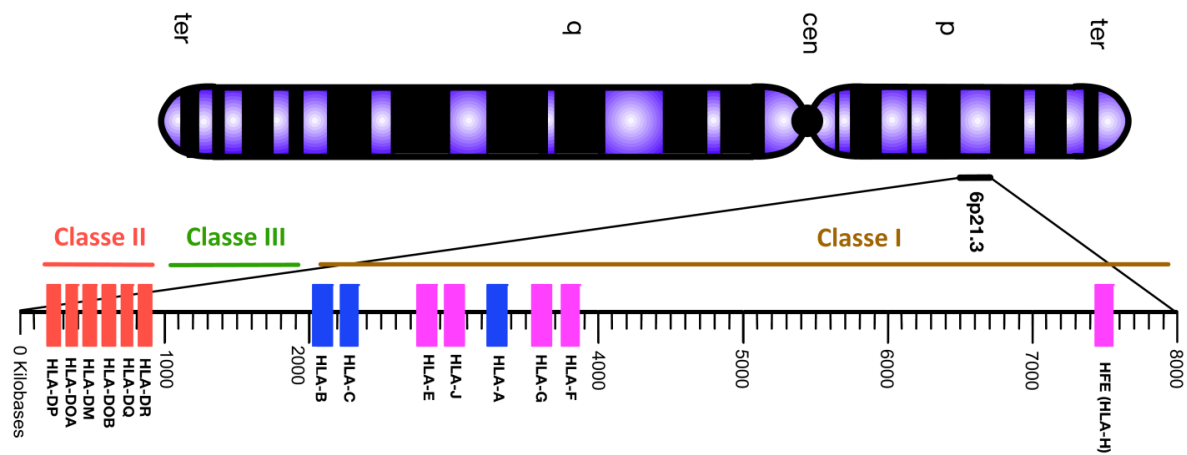


Figura 1.11: Mapa esquemático da região genômica do sistema HLA humano. O *cluster* está localizado na banda 6p21.3 do cromossomo 6. Os genes do HLA de classe I são divididos em clássicos e não-clássicos, diferenciados pelas cores azul e rosa, respectivamente. Ter: telômero; p: braço curto; cen: centrômero; q: braço longo. Retirado e traduzido de CRUX E ELAHI, 2017.

Os genes do HLA de classe I codificam dois tipos de moléculas, que são divididas em clássicas (classe Ia) ou não-clássicas (classe Ib) e são expressas em todas as células nucleadas. As moléculas clássicas são compostas pelos HLA-A, HLA-B e HLA-C e são caracterizadas pelo seu alto grau de polimorfismo e por sua ampla expressão tecidual. Já as moléculas não-clássicas são compostas pelos HLA-E, HLA-J, HLA-G, HLA-F e HLA-H e apresentam um menor grau de polimorfismo e expressão quando comparado com as moléculas clássicas. Além disso, as moléculas clássicas possuem função na apresentação de antígenos às células TCD8<sup>+</sup> para a eliminação de microrganismos intracelulares, enquanto as moléculas não-clássicas possuem função na modulação da atividade de células NK (do inglês *natural killer*) (O'CALLAGHAN E BELL, 1998; ALLARD *ET AL.*, 2014).

O HLA de classe II é composto por cinco genes, denominados HLA-DP, HLA-DM, HLA-DQ, HLA-DR e HLA-DO, e sua função se baseia na ativação de linfócitos T auxiliares CD4<sup>+</sup> para a eliminação de microrganismos extracelulares e no auxílio aos linfócitos B para a produção de anticorpos (KLEIN E SATO, 2000; ABBAS *ET AL.*, 2015). Ao contrário do HLA de classe I e II, o HLA de classe III não codifica antígenos de histocompatibilidade. Os genes de classe III atuam na codificação de moléculas inflamatórias, do sistema complemento, de proteínas de choque térmico e do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês: *tumor necrosis factor*), dentre outras (SARGENT *ET AL.*, 1989; MILNER E CAMPBELL, 1990; SHIINA *ET AL.*, 2004).

### 1.11. Polimorfismo e nomenclatura do sistema HLA

Os genes do HLA são os mais polimórficos do genoma (MUNGALL *ET AL.*, 2003; NORMAN *ET AL.*, 2017). Até março de 2021 haviam sido descritos 30.522 alelos de HLA, sendo que 21.903 faziam parte dos alelos de HLA de classe I e 8.136 dos HLAs de classe II. Entre os HLAs de classe I, o mais polimórfico é o HLA-B, com 7.967 alelos, seguido pelo HLA-A (6.766 alelos) e pelo HLA-C (6.620 alelos) (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, acessado em 03 de junho de 2021). As fendas de ligação encontradas nas moléculas de HLA de classe I e II determinam a especificidade da ligação ao peptídeo a ser apresentado. No HLA de classe I, os aminoácidos que compõem a fenda de ligação são os mais polimórficos, o que o capacita a se ligar a diferentes peptídeos. A estrutura da fenda de ligação é composta por subcavidades, conhecida como *pockets* (bolsos), que estão localizadas no assoalho da molécula (Figura 1.12). Então, o que confere o polimorfismo da molécula de HLA é, justamente, a variação de aminoácidos encontrada nos *pockets*. Normalmente, as moléculas de HLA de classe I possuem seis *pockets* (A - F), como mostrado na Figura 1.12. Os *pockets* das posições B e F servem como âncoras para os aminoácidos que se acomodam nele. Desse modo, esses dois *pockets* possuem uma influência direta no selecionamento do peptídeo que se ligará à molécula de HLA (MADDEN, 1995; KLEIN E SATO, 2000).

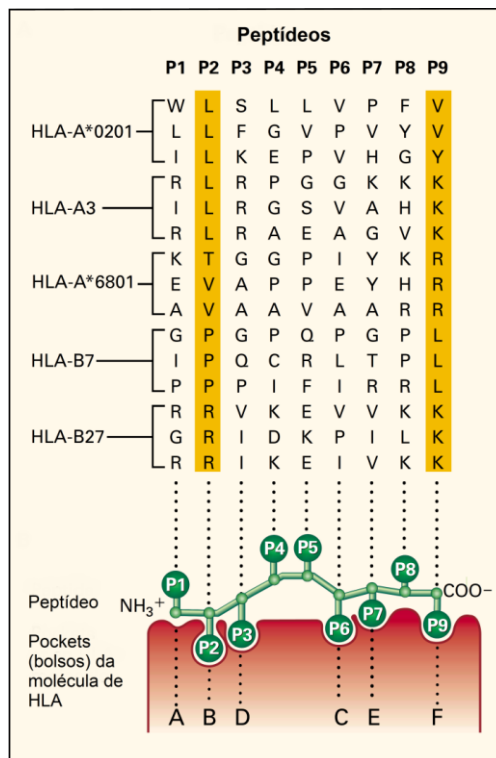


Figura 1.12: Figura esquemática representando a interação entre o peptídeo e a fenda de ligação das moléculas de HLA de classe I. As letras representam os aminoácidos: alanina (A); cisteína (C); ácido aspártico (D); ácido glutâmico (E); fenilalanina (F); glicina (G); histidina (H); isoleucina (I); lisina (K); leucina (L); prolina (P); glutamina (Q); arginina (R); serina (S); treonina (T); valina (V); triptofano (W); tirosina (Y). Retirado e traduzido de KLEIN E SATO, 2000.

Em vista da diversidade das moléculas de HLA, tornou-se necessária a padronização de sua nomenclatura. Para isso, em 1968, foi criado o *WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System* para que se tornasse o responsável pela padronização da nomenclatura do HLA. A nomenclatura de cada alelo de HLA é composta por um sistema de numeração (Figura 1.13). No início é utilizado o prefixo “HLA” seguido pelo locus e depois existem até quatro campos numéricos que são precedidos por um asterisco e separados por dois pontos. O primeiro campo (primeiro e segundo dígitos) representa o grupo alélico e o segundo campo (terceiro, quarto e quinto dígitos) representa os alelos específicos, servindo de base para a diferenciação a nível proteico. O segundo campo é numerado na ordem em que as sequências de DNA são descritas e, por ser o definidor da proteína, todos os alelos devem ser tipados a, pelo menos, quatro dígitos. (<http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, acessado em 03 de junho de 2021).

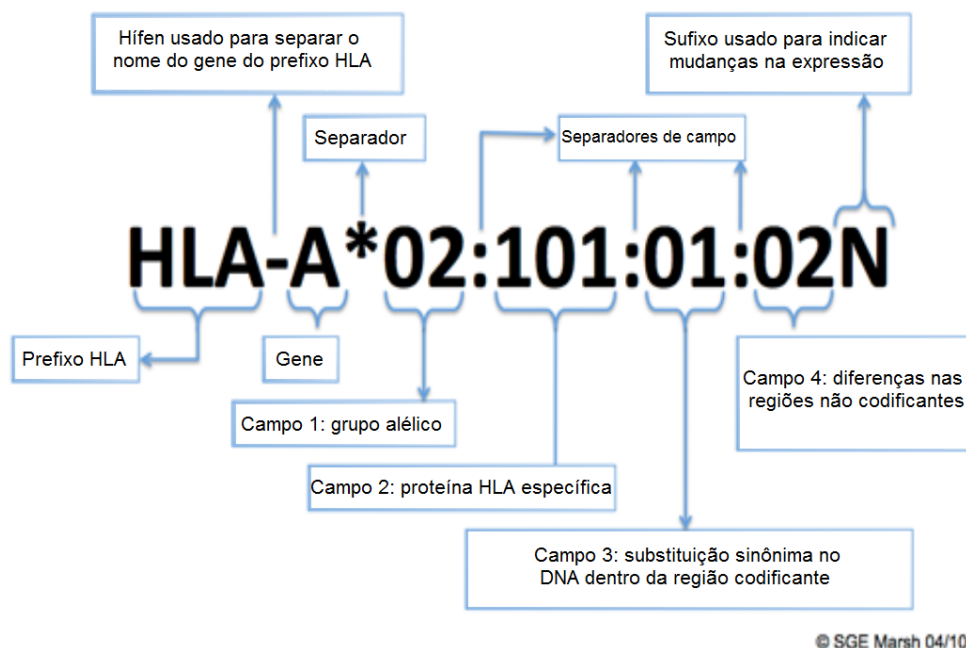


Figura 1.13: Nomenclatura do sistema HLA. Retirado e traduzido de <http://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html>, acessado em 03 de junho de 2021.

### 1.12. Processamento e apresentação de antígenos via HLA de classe I

Os antígenos são proteínas estranhas ao organismo que induzem respostas imunes específicas e, normalmente, são sequências proteicas longas. Dessa forma, é necessário que os antígenos sejam previamente processados para se transformarem em peptídeos (sequências proteicas curtas), o que possibilita a sua acomodação na fenda de ligação das moléculas de HLA. Os antígenos presentes no citoplasma celular são provenientes de vírus, bactérias, outros microorganismos intracelulares e proteínas defeituosas próprias, como as encontradas em células tumorais. Esses antígenos são processados, dão origem a peptídeos que se ligam ao HLA de classe I e são reconhecidos por células TCD8<sup>+</sup> (KLEIN E SATO, 2000; VYAS ET AL., 2008; ABBAS ET AL., 2015). O processamento e a apresentação de antígeno via HLA de classe I ocorre em nove etapas, como pode ser observado na Figura 1.14.

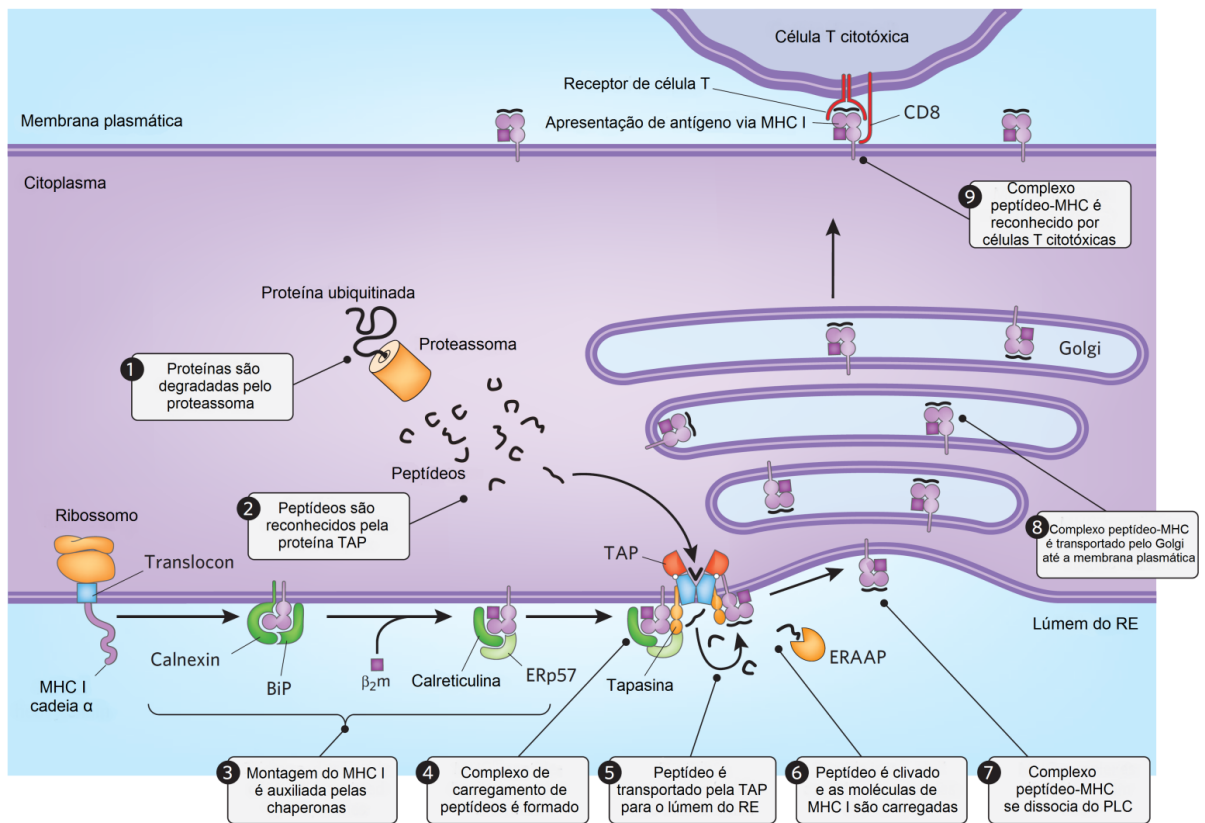


Figura 1.14: Etapas do processamento e apresentação de antígeno via HLA de classe I. RE: retículo endoplasmático; TAP: transportador associado ao processamento de antígenos; ERAAP: aminopeptidase associada ao processamento de antígenos. Retirado e traduzido de PARCEJ E TAMPE, 2010.

A primeira etapa do processamento necessita da sinalização proteica pelas ubiquitinas e da atividade enzimática dos proteassomas (Figura 1.14, 1). As ubiquitinas são proteínas que marcam as proteínas não desejadas para serem degradadas pelo proteassoma; já os proteassomas são grandes complexos enzimáticos multiproteicos que possuem atividade proteolítica (degradação de proteínas). Sendo assim, quando o antígeno está presente no citoplasma, ele é marcado pela ubiquitina, o que possibilita o seu reconhecimento pelo proteassoma. Depois do reconhecimento, a ubiquitina é removida e o antígeno é inserido no proteassoma, onde são degradados em pedaços curtos de proteínas (peptídeos), também conhecido como epítomos (KLEIN E SATO, 2000; SIJTS E KLOETZEL, 2011; ABBAS *ET AL.*, 2015).

As moléculas de HLA de classe I são sintetizadas no retículo endoplasmático (RE) e, após a síntese, elas são dobradas e estabilizadas por duas chaperonas, chamadas de calreticulina e ERp57 (Figura 1.14, 3). A proteína TAP (transportador associado ao processamento de antígenos) está localizada na membrana do retículo endoplasmático e ela reconhece e bombeia os peptídeos com comprimento de 8 a

16 aminoácidos para o lúmen do RE (Figura 1.14, 2 e 5) (PARCEJ E TAMPE, 2010). No lúmen, a TAP se associa à proteína tapasina, que possui afinidade pelas moléculas de HLA de classe I. A associação entre TAP, tapasina, HLA de classe I, ERp57 e calreticulina é chamada de complexo de carregamento de peptídeos (PLC, do inglês: *peptide-loading complex*) e sua função é garantir a efetividade da ligação do peptídeo ao HLA (figura 1.14, 4) (NEEFJES ET AL., 2011).

Os peptídeos presentes no lúmen precisam passar por uma segunda etapa de processamento, para que atinjam o tamanho apropriado para se ligar à molécula de HLA. Desse modo, eles são clivados no lúmen do RE pela aminopeptidase associada ao processamento de antígenos (ERAAP) (Figura 1.14, 6) (BLANCHARD ET AL., 2010). Depois de clivado, o peptídeo se acomoda na fenda de ligação do HLA de classe I, se dissocia do PLC e forma o complexo peptídeo-HLA (Figura 1.14, 6 e 7) (KLEIN E SATO, 2000; NEEFJES ET AL., 2011; ABBAS ET AL., 2015). Por fim, o complexo peptídeo-HLA atravessa a membrana do RE, é direcionado para o complexo de Golgi e, através de vesículas, é transportado para a membrana celular (Figura 1.14, 8). Na membrana, o complexo peptídeo-HLA é expresso na superfície celular e pode ser reconhecido por receptores de células TCD8<sup>+</sup> através da ligação do CD8 a regiões não polimórficas da molécula de HLA de classe I (Figura 1.14, 9) (KLEIN E SATO, 2000; NEEFJES ET AL., 2011; ABBAS ET AL., 2015).

### **1.13. Papel do HLA de classe I na infecção pelo HIV-1**

Na infecção pelo HIV, os HLAs estão relacionados com o curso clínico da aids, como um melhor resultado da resposta imunológica em pacientes conhecidos como controladores de elite e não-progressores a longo prazo, ou com a rápida progressão da doença, como em pacientes conhecidos como progressores rápidos (ELAHI ET AL., 2011). Os controladores de elite são pacientes que, na ausência de tratamento, possuem carga viral indetectável persistente e mantêm a contagem das células TCD4<sup>+</sup> normal (DEEKS E WALKER, 2007; SAKSENA ET AL., 2007). Os não-progressores a longo prazo são pacientes que estão infectados há mais de 10 anos e, nesse tempo, mesmo não utilizando a terapia antirretroviral, são capazes de manter baixos níveis da viremia plasmática e de apresentar uma lenta diminuição das células TCD4<sup>+</sup> (CASADO ET AL., 2010; ZAUNDERS E VAN BOCKEL, 2013). Os progressores rápidos são os pacientes que, quando não fazem uso do tratamento

antiviral, apresentam uma diminuição drástica das células TCD4<sup>+</sup> e progridem para a fase de aids por volta de três anos após a infecção (PANTALEO E FAUCI, 1996).

A influência do sistema HLA na infecção pelo HIV está relacionada com a alta variabilidade genética das moléculas de HLA, o que permite o reconhecimento de uma ampla variedade de antígenos e, conseqüentemente, a indução da resposta imune (TRACHTENBERG E ERLICH, 2001). Estudos indicam que pacientes heterozigotos para qualquer *locus* de HLA apresentam uma menor progressão para a aids, enquanto pacientes homozigotos apresentam uma progressão mais rápida, (CARRINGTON *ET AL.*, 1999; TANG *ET AL.*, 1999). Desse modo, a variabilidade de epítomos reconhecida pelas moléculas de HLA está diretamente relacionada com a efetividade da resposta imune do hospedeiro (CARRINGTON E O'BRIEN, 2003).

Entre os HLAs de classe I clássicos, o HLA-B é o gene mais polimórfico e parece exercer um efeito mais forte e consistente na modulação da progressão da infecção pelo HIV (INTERNATIONAL *ET AL.*, 2010; KOSMRLJ *ET AL.*, 2010). Estudos indicam que os alelos HLA-B\*27 e HLA-B\*57 estão amplamente presentes em indivíduos capazes de controlar a infecção pelo HIV na ausência de antirretrovirais e parecem possuir um papel importante na manutenção das células TCD4<sup>+</sup> e na redução da carga viral (MIGUELES *ET AL.*, 2000; HORTON *ET AL.*, 2006; FELLAY *ET AL.*, 2007; GAO *ET AL.*, 2010; CARRINGTON E WALKER, 2012; CENTER, 2017). Em contrapartida, outros estudos indicam que alguns alelos do HLA-B, como HLA-B\*08, HLA-B\*35, HLA-B\*53, HLA-B\*55 e HLA-B\*56, estão associados com um pior resultado da doença, como, por exemplo, a progressão para a fase de aids mais rápida (CARRINGTON E O'BRIEN, 2003; MUNKANTA *ET AL.*, 2005).

O HLA-A é o segundo mais polimórfico e também possui correlação com a evolução da infecção pelo HIV. No caso do HLA-A, os alelos A\*74:01, A\*32:01, A\*02:02, A\*02:05, A\*02:14 e A\*24:02 estão correlacionados a um efeito protetor à infecção do HIV e evolução da doença, e também estão associados a uma menor carga viral e risco de transmissão (MACDONALD *ET AL.*, 2000; FELLAY *ET AL.*, 2009; KOEHLER *ET AL.*, 2010). Em contraste, os alelos A\*36:01 e A\*23:01 parecem exercer um papel não protetivo, uma vez que estão relacionados a uma carga viral mais alta e a uma progressão para a aids mais rápida (CHEN *ET AL.*, 1997; TANG *ET AL.*, 2010). Já o HLA-C é o que possui uma menor diversidade na fenda de ligação ao peptídeo. Com isso, os HLAs –A e –B parecem ser mais específicos para a regulação das CTLs, enquanto o HLA-C parece ser mais específico para a regulação das células



NK (COSMA *ET AL.*, 1999; MATUCCI *ET AL.*, 2008; BLAIS *ET AL.*, 2011; APPS *ET AL.*, 2013; SERENA *ET AL.*, 2017).

#### **1.14. Novas estratégias contra o HIV-1**

O tratamento do HIV foi revolucionado com o advento da terapia antirretroviral combinada. Contudo, além de apresentar efeitos colaterais, exige uma boa adesão do paciente, com um comprometimento diário com a medicação ao longo da vida (WOOD *ET AL.*, 2003; COLLABORATION *ET AL.*, 2010). Pacientes em sucesso terapêutico também necessitam utilizar a terapia de forma crônica, uma vez que a sua interrupção pode resultar no rebote virológico e no desenvolvimento de mutações de resistência aos medicamentos (DAVEY *ET AL.*, 1999; GUPTA *ET AL.*, 2009; GREGSON *ET AL.*, 2016). Além disso, a infecção pelo HIV também é um problema de saúde pública mundial, que depende de um alto investimento a cada ano. Schackman e colaboradores (2015) estimaram que o custo, ao longo da vida, de pessoas que são infectadas com HIV aos 35 anos nos Estados Unidos é de 326.500 dólares e que o custo para pessoas não infectadas, mas com alto risco de infecção, é de 96.700 dólares. Diante desse cenário, novas estratégias de controle da infecção pelo HIV vêm sendo desenvolvidas. Atualmente, há três tipos principais de estratégias com esse objetivo: a vacina profilática, a cura esterilizante e a cura funcional.

##### **1.14.1. Vacina profilática e cura esterilizante**

O objetivo de uma vacina profilática contra o HIV é diminuir a disseminação do vírus ao prevenir novas infecções. Diversos estudos clínicos vêm testando uma vacina através de diferentes abordagens, como os ensaios clínicos STEP (HVTN 502), Phambili (HVTN 503), RV144, HVTN100, HVTN702; Imbokodo (HVTN705) e MOSAICO (HVTN706) (BUCHBINDER *ET AL.*, 2008; RERKS-NGARM *ET AL.*, 2009; GRAY *ET AL.*, 2011; BEKKER *ET AL.*, 2018; LAHER *ET AL.*, 2020; <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03060629>, acessado em 03 de junho de 2021; <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03964415>, acessado em 03 de junho de 2021). Atualmente, o estudo MOSAICO (HVTN706) é o mais avançado, estando na fase 3 de testes. Contudo, apesar dos avanços nas pesquisas das últimas décadas, ainda não foi possível o desenvolvimento de uma vacina eficaz, segura e durável.

A cura esterilizante tem como objetivo a eliminação dos vírus circulantes e dos reservatórios virais do organismo. Então, para que o paciente atinja a cura esterilizante, todas as suas células infectadas precisam ser eliminadas. O principal obstáculo para a cura esterilizante são as células de reservatório latentes, que são células infectadas que permanecem em estado de repouso por tempo indefinido, mas que são capazes de serem reativadas e promover a replicação do vírus (COHN *ET AL.*, 2020). Até o momento, há apenas dois casos de cura esterilizante no mundo, tendo o primeiro ocorrido em 2009 (o chamado “paciente de Berlim”) e o segundo em 2020 (o “paciente de Londres”) (HUTTER *ET AL.*, 2009; GUPTA *ET AL.*, 2020). Entretanto, essas curas só foram possíveis através do transplante de medula óssea para tratamento de linfomas nos pacientes, o que impossibilita a ampliação desse método para a população geral. Entre as estratégias de cura esterilizante, a mais estudada é a chamada *kick and kill* (ou *shock and kill*), que visa a reversão da latência para que essas células sejam eliminadas pelo sistema imune. Outras estratégias de cura esterilizante incluem a edição genética de células e a imunoterapia (LIU *ET AL.*, 2015; COHN *ET AL.*, 2020).

#### **1.14.2. Cura funcional**

Como dito acima, os reservatórios do HIV são o maior obstáculo para a cura esterilizante. Dessa forma, desenvolveram-se estratégias nas quais a eliminação de todas as células infectadas não seria necessária, mas onde o próprio sistema imune do hospedeiro seria capaz de controlar a infecção. Com isso, criou-se o conceito de cura funcional. A cura funcional tem como objetivo o controle da replicação viral, a níveis indetectáveis, pelo sistema imunológico do hospedeiro, sem a necessidade do uso diário de antirretrovirais. Os pacientes controladores de elite representam um modelo natural de como o sistema imune controla a infecção.

Diversas são as estratégias para o alcance da cura funcional. Uma delas é a de *block and lock*, que consiste no silenciamento/bloqueio do provírus nas células infectadas de forma permanente, impossibilitando o retorno da replicação viral na ausência do tratamento (LIU *ET AL.*, 2015; COHN *ET AL.*, 2020). Outra estratégia de cura funcional é a vacinação terapêutica. Diferentemente da vacina profilática, a vacina terapêutica não tem objetivo de prevenir a infecção ou de erradicar o vírus do organismo infectado, mas sim de impedir a progressão da doença ao induzir o controle da replicação viral pelo próprio sistema imune do hospedeiro, sem a

necessidade da utilização de antivirais. Entre as vantagens de uma vacina terapêutica, pode-se destacar a possibilidade de atraso ou bloqueio para a fase de aids e também a simplificação do tratamento, pois não demandaria o comprometimento diário com a medicação e, conseqüentemente, melhoraria a qualidade de vida do paciente. Além disso, a vacinação terapêutica também poderá proporcionar a redução da transmissão do vírus, uma vez que ocorrerá o bloqueio da replicação viral. Quando utilizada na fase aguda de infecção, também poderá impedir a formação ou diminuir o tamanho dos reservatórios virais (ENSOLI *ET AL.*, 2014).

Diversos estudos tentam desenvolver uma vacina terapêutica com diferentes abordagens, como exemplificado a seguir. A vacina VAC-3S foi desenvolvida para induzir uma resposta imune humoral contra a região gp41 do envelope viral, que é altamente conservada (VIEILLARD *ET AL.*, 2019). A vacina Vacc-4x consiste em quatro peptídeos sintéticos baseados na proteína p24 do HIV-1 (POLLARD *ET AL.*, 2014). A vacina PepTcell é baseada em epítomos de células T, que consistem em peptídeos sintéticos derivados de regiões conservadas de Vpr, Vif, Rev e Nef, com objetivo de induzir respostas efectoras de células T e B (BOFFITO *ET AL.*, 2013). A vacina GTU<sup>®</sup> Multi-HIVB é baseada em seis proteínas derivadas do subtipo B do HIV-1 (VARDAS *ET AL.*, 2012). A DermaVir é uma vacina de DNA que engloba 15 proteínas do HIV e é administrada através de adesivos cutâneos, sem a necessidade de agulhas (RODRIGUEZ *ET AL.*, 2013). A THV01 é uma vacina baseada em dois vetores lentivirais, englobando as proteínas Gag, Pol e Nef do subtipo B do HIV-1 (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02054286>, acessado em 03 de junho de 2021). Os estudos ISS T-001 (ENSOLI *ET AL.*, 2008), ISS T-002 (ENSOLI *ET AL.*, 2015) e ISS T-003 (ENSOLI *ET AL.*, 2016) desenvolveram vacinas terapêuticas baseadas na proteína regulatória Tat. Contudo, apesar dos avanços no conhecimento científico através dos diversos estudos com variadas abordagens, até o momento não foi possível o desenvolvimento de uma vacina terapêutica segura e eficaz.

Como mostrado no parágrafo anterior, a maioria dos estudos que tentam desenvolver uma vacina terapêutica é baseada em sequências de referências genéricas circulantes do HIV. Um estudo realizado por Papuchon e colaboradores (2013) mostrou que o desenvolvimento de uma vacina terapêutica baseada em epítomos genéricos pode não ser totalmente eficiente, uma vez que os epítomos reais ou são diferentes da referência utilizada ou são modificados ao serem arquivados. Além disso, os epítomos baseados em referências genéricas também podem não ser

adequados para a apresentação ao sistema imune, devido à grande variedade de antígenos e dos alelos de HLA de classe I que os restringem. Partindo do pressuposto que o provírus arquivado é o que será reativado, ou seja, que a origem da replicação viral na interrupção do tratamento é o provírus arquivado, Papuchon e colaboradores (2013) propuseram que os epítomos utilizados em vacinas terapêuticas devem ser selecionados a partir do DNA proviral sequenciado do paciente e que devem estar de acordo com a afinidade a seus alelos de HLA de classe I, criando o conceito de uma vacina terapêutica personalizada. Todavia, o desenvolvimento de vacinas personalizadas em larga escala representa um desafio industrial, visto que seria necessário a síntese de diversas sequências imunogênicas individuais. Diante desse cenário, o estudo Provir/Latitude 45 foi criado, onde o presente trabalho está inserido. O Provir/Latitude 45 é um estudo multicêntrico que engloba pacientes HIV+ em tratamento do Rio de Janeiro, Rio Grande, Bordeaux, Montreal, Lima e Baltimore, com o objetivo de identificar epítomos provirais conservados que são apresentados pelos alelos de HLA de classe I mais prevalentes, visando o desenvolvimento de uma sequência imunogênica mais universalmente utilizável para vacinas terapêuticas (TUMIOTTO *ET AL.*, 2019).

## 2. JUSTIFICATIVA

A expansão da utilização do tratamento antirretroviral resultou em diversos benefícios para milhões de pessoas que vivem com HIV. Mas, por outro lado, essa expansão também acarretou no aumento da prevalência de vírus resistentes aos antirretrovirais, o que representa um obstáculo para a continuidade do sucesso da terapia. Em vista disso, o presente estudo avaliou as mutações de resistência presentes nos provírus arquivados de pacientes que estão em sucesso terapêutico, uma casuística que ainda não é amplamente estudada na literatura. Além disso, o presente trabalho utilizou uma técnica de sequenciamento mais sensível na detecção de variantes, o sequenciamento de nova geração (NGS), que possibilita a detecção de mutações minoritárias, contribuindo para o entendimento da influência dessas variantes nos pacientes que se encontram em sucesso terapêutico. Assim como no mundo, o Brasil apresenta diferenças na distribuição dos subtipos do HIV entre os seus estados. Com isso, atribuído ao uso do NGS, realizamos uma metodologia de amplificação do genoma quase completo do HIV (NFLG), o que possibilita a identificação do subtipo viral fidedigno das amostras e, conseqüentemente, contribui para o enriquecimento dos dados epidemiológicos das cidades do Rio de Janeiro e Rio Grande e também para o enriquecimento de dados epidemiológicos a respeito da diversidade genética do HIV-1 no Brasil.

Apesar dos benefícios do tratamento antirretroviral, a sua utilização deve ser de forma crônica, o que pode representar um impacto negativo na vida de pessoas que vivem com HIV. Além disso, a terapia também apresenta efeitos colaterais, necessita de um alto investimento financeiro anual e sua utilização a longo prazo pode resultar no desenvolvimento de mutações de resistência aos medicamentos. Dessa forma, almeja-se o desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica. Em vista disso, o presente estudo propõe a identificação de epítomos provirais conservados que tenham alta afinidade aos alelos de HLA de classe I mais frequentes nos pacientes do Rio de Janeiro e de Rio Grande, visando a contribuição de informação para o estudo Provir/Latitude 45, que tem como objetivo o desenvolvimento de uma vacina terapêutica.

### **3. OBJETIVO**

Analisar a composição genética do provírus arquivado do HIV-1, através do sequenciamento de nova geração, em uma casuística de pacientes em sucesso terapêutico e determinação dos epítomos provirais conservados com alta afinidade aos alelos de HLA de classe I mais frequentes de pacientes do Rio de Janeiro (RJ) e Rio Grande (RS).

#### **3.1. Objetivos específicos**

- Determinação do genoma proviral quase completo do HIV-1, através do sequenciamento de nova geração, em uma coorte de 46 pacientes do Rio de Janeiro e 40 pacientes de Rio Grande, que estão submetidos ao esquema terapêutico de primeira linha e em sucesso terapêutico;
- Caracterização da diversidade genética do HIV-1 das cidades do Rio de Janeiro e de Rio Grande através da identificação dos subtipos virais puros e das formas recombinantes únicas e circulantes;
- Determinação da presença e frequência das mutações de resistência aos antirretrovirais utilizando uma técnica de sequenciamento mais sensível para a detecção de variantes minoritárias;
- Associação das mutações de resistência aos antirretrovirais encontradas com os dados de tratamento de cada paciente;
- Identificação de epítomos provirais conservados do HIV-1 que tenham alta afinidade aos alelos de HLA-A, -B e -C mais frequentes dos pacientes incluídos no estudo;
- Análise da afinidade dos epítomos selecionados aos alelos de HLA-A, -B e -C específicos dos pacientes.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. Colaborações**

O presente estudo faz parte de um projeto multicêntrico que tem como título “Vacinação terapêutica contra HIV/aids com base em epítomos virais arquivados e tipagem de HLA de classe I: um estudo básico no Brasil e na França para avaliar uma nova abordagem curativa”. As instituições brasileiras envolvidas nesse projeto e suas respectivas atribuições são: Hospital Federal de Ipanema (HI), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), ambos no Rio de Janeiro, RJ, e o Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior (HU-FURG), Rio Grande, RS, são responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes e pela coleta das amostras; o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, RJ é responsável pela amplificação, sequenciamento e análise dos genomas provirais arquivados do HIV e também pelo processamento e tipagem dos alelos de HLA-A, -B e -C e análise dos epítomos virais.

### **4.2. Casuística**

Oitenta e seis pacientes infectados pelo HIV-1, oriundos de duas cidades brasileiras (Rio de Janeiro – RJ e Rio Grande – RS), foram recrutados para esse estudo. Desses pacientes, 34 eram provenientes do Hospital Federal de Ipanema (HI), 12 eram provenientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), ambos no Rio de Janeiro, e 40 eram provenientes do Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior (HU-FURG), Rio Grande. O projeto do presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética do INCA (CAAE: 52862016.9.0000.5274), do HI (CAAE: 52862016.9.3002.5646), do HUCFF (56604816.2.0000.5257) e do HU-FURG (CAAE: 52862016.9.3001.5324).

Todos os pacientes são acompanhados regularmente pelos seus respectivos centros e aqueles que se adequavam aos critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo durante suas visitas regulares ao hospital. Os critérios para a inclusão de pacientes foram: possuir idade maior ou igual a 18 anos; estar sob esquema terapêutico de primeira linha ou na segunda linha de tratamento devido, exclusivamente, a alterações do esquema de tratamento recomendado pelo

Ministério da Saúde; estar em sucesso terapêutico (controle virológico com carga viral do HIV indetectável) durante pelo menos 12 meses e dispostos a participar do estudo assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os critérios para a exclusão de pacientes foram: ter histórico de falha terapêutica prévia e mudança do esquema terapêutico por intolerância ou má adesão. Um questionário contendo informações clínicas e epidemiológicas foi elaborado e preenchido a partir dos prontuários médicos dos pacientes durante seu recrutamento (Anexo 9.1).

Os pacientes que aceitaram participar do estudo tiveram seis ml do seu sangue total periférico coletado em um tubo *vaccuntainer* contendo EDTA que foi enviado ao INCA junto de seu questionário preenchido. Todas as amostras coletadas foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos para a separação do plasma e das células do sangue periférico. O material foi posteriormente transferido para tubos separados e armazenado em um freezer a -80°C (modelo 8694; Thermo Electron Corporation, Waltham, EUA).

#### **4.3. Extração do DNA genômico**

O DNA genômico das células do sangue periférico dos pacientes contém o DNA proviral, a sequência de interesse do estudo. Dessa forma, o kit *PureLink® Genomic DNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) foi utilizado para extrair o DNA genômico das amostras de sangue periférico coletadas, conforme descrito abaixo.

Primeiramente, em um tubo de 1,5 µl, 30 µl de proteinase K foram misturados a 300 µl da amostra de sangue descongelada e a mistura foi homogeneizada com a pipeta. Posteriormente, 300 µl de *PureLink Genomic Lysis – Binding Buffer* foram adicionados a esse tubo, a mistura também foi homogeneizada através de pipetagem, e o tubo foi incubado a 55°C por 12 minutos, invertendo-o a cada 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol 100%, o tubo foi vortexado por 10 segundos para sua homogeneização e foi brevemente centrifugado (centrifuga 5424; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Todo o material do tubo foi transferido para a coluna de extração, que continha uma membrana de sílica seletiva, que foi centrifugada a 10.000 g por 1 minuto a temperatura ambiente. O centrifugado foi descartado e duas etapas de lavagem foram iniciadas. Na primeira lavagem foram adicionados 450 µl do tampão *Wash Buffer 1*, o tubo foi centrifugado a 10.000 g por 1 minuto e o tubo de coleta foi descartado; na segunda lavagem,



foram adicionados 450 µl do tampão *Wash Buffer 2*, o tubo foi centrifugado a velocidade máxima por 3 minutos e novamente o tubo de coleta foi descartado. A coluna foi colocada em um tubo de 1,5 µl e 100 µl do tampão de eluição *PureLink Genomic Elution Buffer*, previamente aquecido a 70°C, foram adicionados próximo à membrana da coluna de extração. Por fim, a coluna foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto e o líquido centrifugado foi novamente colocado na coluna, passando por um segundo ciclo de centrifugação a velocidade máxima por 2 minutos, finalizando a extração. Os DNAs genômicos extraídos foram armazenados em um freezer a -20°C (modelo CVU26E; Consul, São Bernardo do Campo, Brasil).

#### **4.4. Quantificação do DNA genômico extraído**

O produto da extração de DNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) para averiguar sua concentração e qualidade. Para isso, 1 µl do produto extraído foi mensurado no aparelho em duplicata e a média dessas medições, em ng/µl, foi estabelecida como a concentração da amostra. Para a qualidade foi considerada a razão 260/280 nm; amostras com valores próximos a 2,0 foram consideradas puras.

#### **4.5. Amplificação do DNA proviral**

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês: *Polymerase Chain Reaction*) foi utilizada para a amplificação do genoma proviral quase completo do HIV. Devido à dificuldade de amplificação das amostras, diversas estratégias foram desenvolvidas para um melhor resultado de amplificação (Figura 4.1). A primeira combinação de iniciadores utilizada foi baseada na metodologia proposta por SANABANI *ET AL.*, 2006, que divide o genoma proviral quase completo em cinco fragmentos sobrepostos (A, BI, BII, C e D), com cada fragmento tendo aproximadamente 2000 pares de bases. A segunda combinação utilizada foi proposta por ODE *ET AL.*, 2015, que divide o genoma quase completo em quatro fragmentos sobrepostos (A, B, C e D) e cada um deles possui aproximadamente 3000 pares de bases. A última combinação utilizada foi proposta por BANIN *ET AL.*, 2019, que divide o genoma quase completo em dois fragmentos sobrepostos (HG1b e HG2), com cada um tendo aproximadamente 5000 pares de bases. Como todos os

fragmentos são sobrepostos, as diferentes estratégias puderam ser combinadas para que se conseguisse a amplificação do genoma proviral quase completo.

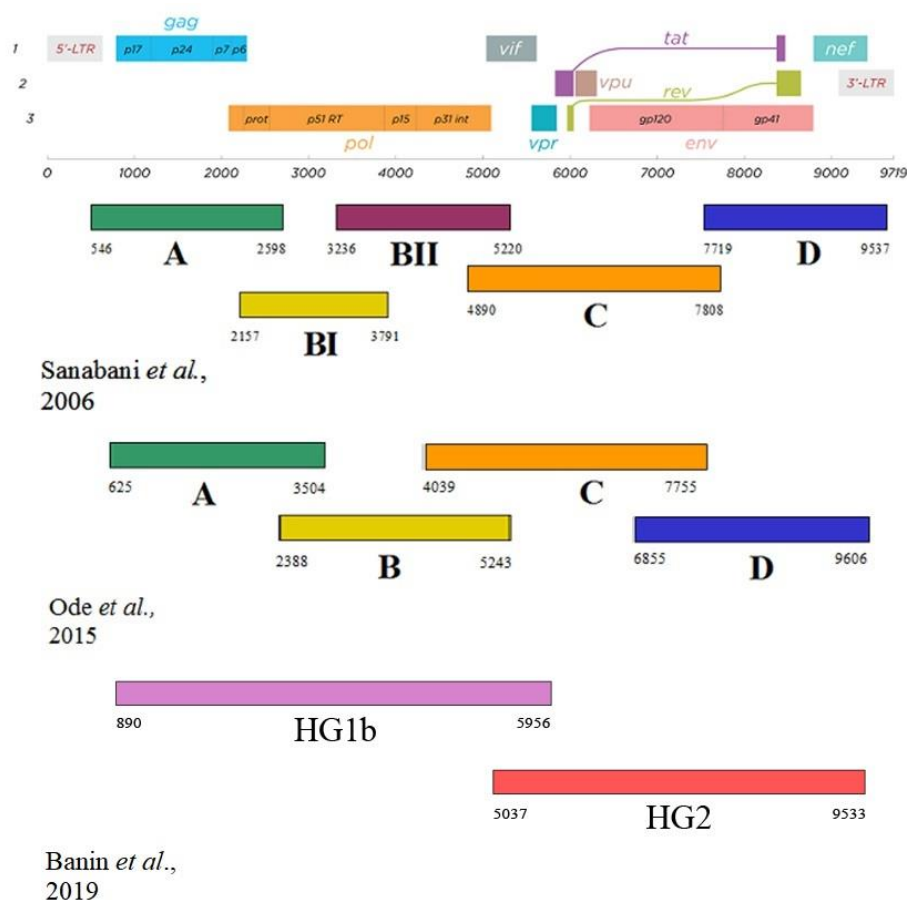


Figura 4.1: Genoma completo do HIV e as diferentes estratégias de amplificação. As estratégias se basearam na amplificação de cinco, quatro ou dois fragmentos sobrepostos cobrindo o genoma proviral quase completo do HIV. Coordenadas nucleotídicas em relação à sequência-referência HXB2.

As reações de PCR foram realizadas em um fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil) e foram calculadas para um volume final de 25 µl que continha: 2,5 µl de tampão da enzima Taq; 1 µl de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) a 50 mM; 0,25 µl de iniciador senso a 25 pmol/µl; 0,25 µl de iniciador antissenso a 25 pmol/µl; 0,2 µl de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* a 5 U/µl; 0,2 µl do mix de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTP) a 25 mM; 1,25 µl de dimetilsulfóxido (DMSO); 5 µl de DNA (350 ng/µl) e o restante preenchido por água ultrapura até o volume final de 25 µl. Foram feitos controles negativos, em todas as reações realizadas, que continham apenas os reagentes (sem o DNA) para ser possível identificar a ocorrência de contaminação. Além disso, todas as reações foram

realizadas em duplicata para que os erros de incorporação de nucleotídeos que pudessem ocorrer durante a amplificação fossem minimizados.

A enzima utilizada na reação de PCR, a *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity*, é uma enzima de alta fidelidade, pois possui atividade de revisão 3' → 5', o que é importante para a acurácia no resultado do sequenciamento. Além disso, o DMSO utilizado funciona como um aditivo da reação. Ele diminui o ponto de fusão (*melting point*) dos iniciadores, facilitando seu anelamento, através da ligação ao DNA e mudança de sua conformação, o que auxilia na desnaturação de regiões ricas em GC.

Foi realizada uma PCR aninhada (*nested PCR*) em todas as reações. Essa estratégia visa o aumento da quantidade de produto amplificado. Para isso, o produto gerado na primeira reação de PCR era utilizado na PCR aninhada junto com um par de iniciadores internos ao primeiro par, possibilitando a amplificação de regiões contidas nos fragmentos já amplificados anteriormente. Os reagentes utilizados na PCR aninhada foram os mesmos utilizados na primeira reação, com exceção dos iniciadores (Tabela 4.1), e a única diferença na ciclagem foram as temperaturas médias de anelamento específicas de cada par de iniciadores.

Tabela 4.1: Iniciadores utilizados na primeira e segunda reação de PCR para a amplificação do genoma quase completo do HIV. A localização dos iniciadores (coordenadas nucleotídicas) está em relação à sequência-referência HXB2.

Região	Iniciadores	Reação	Temperatura	Orientação	Sequência	Localização
<i>gag</i> , <i>pol</i> (frag A)	SC-AOS <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>	55,4°C	Senso	AGA TCT GAG CCT GGG AGC TCT CTG G	521 – 554
	SC-AOA <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	TTT ATG GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA GCT TCA AGT	2711 – 2740
	SC-ANS <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>	56,4°C	Senso	AGT GTG TGC CCG TCT G CTT TTG GGC	546 – 570
	SC-ANA <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	CAT CCA TTC CTG	2590 – 2610
<i>pol</i> (frag B)	SC-BOS <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>	51,8°C	Senso	GCT AAT TTT TTA GGG AAG ATC TGG CCT T AAA TCA CTA	2080 – 2107
	IN-B02R <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	GCC ATT GCT CTC CA AGC CCC ACC	4284 – 4306
	SC-BNS <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>	61°C	Senso	AGA AGA GAG CTT	2157 – 2177

Região	Iniciadores	Reação	Temperatura	Orientação	Sequência	Localização
	IN-B01R <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	CCA CTC AGG AAT CCA GGT GG	3772 – 3791
<i>pol, vif</i> (frag BII)	IN-B2OS <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>	50,8°C	Senso	CTC ARG ACT TYT GGG AAG TTC	2800 – 2820
	SC-BOA <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	TCT CCT GTA TGC AGA CCC CAA TAT GT	5242 – 5267
	IN-B01S <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>	50,8°C	Senso	GAT GGG TTA TGA ACT CCA TCC TG	3772 – 3791
	C-BNA <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	CCC TAG TGG GAT GTG TAC TTC TGA ACT TA	5192 – 5220
<i>pol, vif, vpr, tat, rev, vpu, env</i> (frag C)	SC-COS <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>	56°C	Senso	TAC AGT GCA GGG GAA AGA ATA ATA GAC ATA	4809 – 4841
	SC-COA <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	ATA TGT CTG GCC TGT ACC GTC AGC G	7831 – 7852
	SC-CNS <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>	56°C	Senso	CAA AAT TTT CGG GTT TAT TAC AGG GAC A	4890 – 4917
	SC-CNA <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CC	7786 – 7808
<i>env, tat, rev, nef</i> (frag D)	SC-DOS <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>	55,4°C	Senso	TTG AAC CAY TAG GAG TAG CAC CCA C	7696 – 7720
	SC-DOA <sup>1</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	AGA GAG ACC CAG TAC AGG CAA AAG C	9523 – 9548
	SC-DNS <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>	61°C	Senso	ACC AAG GCA AAG AGA AGA GTG GTG	7719 – 7742
	SC-DNA <sup>1</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	GTA CAG GCA AAA AGC AGC TGC TTA TAT G	9510 – 9537
<i>gag, pol</i> (frag A)	1ODEAF2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>	59°C	Senso	ATC TCT AGC AGT GGC GCC CGA ACA G	625-649
	1ODEAR2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	GCT ATT AAG TCT TTT GAT GGG TCA TA	3529-3504
	2ODEAF2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>	60°C	Senso	CTC TCT CGA CGC AGG ACT CGG CTT G	681-705
	2ODEAR2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	TAC TTC TGT TAG TGC TTT GGT TCC	3425-3402
<i>pol, vif</i> (frag B)	1ODEBF2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>	56°C	Senso	ATG ATA GGG GGA ATT GGA GGT TT	2388-2410
	1ODEBR2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	CCT GTA TGC AGA CCC CAA TAT G	5264-5243
	2ODEBF2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>	56°C	Senso	GAC CTA CAC CTG TCA ACA TAA TTG G	2485-2509

Região	Iniciadores	Reação	Temperatura	Orientação	Sequência	Localização
	2ODEBR2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	CCT AGT GGG ATG TGT ACT TCT GAA CTT A	5219-5192
<i>pol, vif, vpr, vpu, tat, ver, env (frag C)</i>	1ODECF2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>	56°C	Senso	CAG ACT CAC AAT ATG CAT TAG G	4039-4060
	1ODECR2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	GCC CAT AGT GCT TCC TGC TGC TCC CAA GAA CC	7786-7755
	2ODECF2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>	55°C	Senso	CTG GCA TGG GTA CCA GCA CAC AA	4146-4168
	2ODECR2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	TAT ATA ATT CAC TTC TCC AAT TGT C	7677-7653
<i>env, tat, ver, nef (frag D)</i>	1ODEDF2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>	56°C	Senso	GAG CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT	6855-6878
	1ODEDR2 <sup>2</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	CAC TCA AGG CAA GCT TTA TTG AGG C	9630-9606
	2ODEDF2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>	60°C	Senso	TTA TTG TGC CCC AGC TGG TTT TGC	6872-6895
	2ODEDR2 <sup>2</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	GGT CTA ACC AGA GAG ACC CAG TAC AG	9556-9531
<i>gag, pol, vif,vpr, vpu (frag HG1b)</i>	Gag3_For <sup>3</sup>	1 <sup>a</sup>	58°C	Senso	GAG AGA TGG GTG CGA GAG C	785-803
	Vpu2_Rev <sup>3</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	CCG CTT CTT CCT GCC ATA GGA	5985-5966
	Gag4_For <sup>3</sup>	2 <sup>a</sup>	57°C	Senso	TAG TAT GGG CAA GCA GGG A	890-908
	Vpu3_Rev <sup>3</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	TCC TGC CAT AGG AGA TGC CTA AG	5978-5956
<i>vif, vpr, vpu, env, nef (frag HG2)</i>	Vif2_For <sup>3</sup>	1 <sup>a</sup>	53°C	Senso	TGG AAA GGT GAA GGG GCA GTA	4956-4976
	OFM19 <sup>3</sup>	1 <sup>a</sup>		Antissenso	GCA CTC AAG GCA AGC TTT ATT GAG GCT TA	9632-9604
	Vif3_For <sup>3</sup>	2 <sup>a</sup>	53°C	Senso	GAT TAT GGA AAA CAG ATG GCA GGT	5037-5060
	HIV_9555_Rev <sup>3</sup>	2 <sup>a</sup>		Antissenso	TCT ACC TAG AGA GAC CCA GTA CA	9555-9533

<sup>1</sup>SANABANI ET AL., 2006; <sup>2</sup>ODE ET AL., 2015; <sup>3</sup>BANIN ET AL., 2019.

As reações de PCR foram feitas no termociclador Veriti™ 96-well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) ou no termociclador ProFlex™ 3x32-well PCR System (Thermo Fisher Scientific). A ciclagem para as reações foi

de: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, seguida pela temperatura média de anelamento específica de cada par de iniciadores (Tabela 4.1) por 30 segundos e 68°C por minuto a cada mil pares de bases de DNA sintetizados e, por fim, a reação permaneceu a 68°C por 5 minutos e depois a 8°C por tempo indefinido para a conservação da reação. As reações prontas foram armazenadas na geladeira (modelo Duplex DC50; Electrolux, Estocolmo, Suécia) a 4°C até passarem pelas etapas de eletroforese e purificação.

#### **4.6. Eletroforese em gel de agarose**

O resultado da amplificação foi observado através da eletroforese em gel de agarose a 1%. Para isso, foi utilizado um gel de *UltraPure™ Agarose* (Thermo Fisher Scientific) a 1% em uma solução tampão de NaOH 1x (solução estoque a 20x: ácido bórico a 0,9 M e NaOH a 0,2 M; ambos da Merck, Darmstadt, Alemanha). Assim, foram misturados 5 µl do produto da PCR com 1 µl do corante *GelRed® Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Fremont, EUA) e para estimar o tamanho foram misturados 3 µl de peso molecular de *1 kb Plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific) a 1 µl do *GelRed*. Após a eletroforese, o gel de agarose foi fotografado em um transiluminador de luz ultravioleta (Bio-Rad, Tóquio, Japão) utilizando o programa *Kodak Molecular Imaging Software* (East Kodak Company, Nova Iorque, EUA).

#### **4.7. Purificação dos produtos de PCR**

Os produtos de PCR positivos passaram pela etapa de purificação com o kit *AccuPrep® PCR Purification Kit* (Bioneer, Daejeon, Coreia do Sul) seguindo o protocolo do fabricante.

Inicialmente, as duplicatas das reações de PCR foram reunidas em um mesmo tubo e foram adicionados cinco volumes do *Buffer 1* a um volume do produto do PCR, ou seja, foram misturados 200 µl do *Buffer 1* a 40 µl da PCR. Essa mistura foi transferida para a coluna de purificação, que possui uma membrana de sílica para reter o DNA, que foi centrifugada (centrifuga Hettich – Mikro 120; Tuttlingen, Alemanha) a 13.000 rpm por 1 minuto e o líquido no tubo de coleta foi descartado. Em seguida, foram adicionados à coluna 500 µl do *Buffer 2* para iniciar a etapa de lavagem. A coluna foi centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto, o líquido no tubo de coleta foi descartado e novamente foram adicionados à coluna 500 µl do *Buffer 2*. A

coluna foi novamente centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto, o líquido no tubo de coleta foi descartado e, para passar por uma etapa adicional de secagem, foi centrifugada a 13.000 rpm por mais 1 minuto. Por fim, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 µl e próximo à membrana foram adicionados 32 µl do *Buffer 3* para que o DNA se desprendesse da mesma. A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e, finalmente, foi centrifugada a 13.000 rpm por 1 minuto. Após isso, o purificado ficou armazenado em um freezer a -20°C (modelo CVU26E, Consul).

#### **4.8. Eletroforese e quantificação das amostras purificadas**

Após a purificação, a amostra foi analisada em um gel de agarose a 1% utilizando-se 2 µl do produto purificado corado com 1 µl de *GelRed*. Através da fotografia obtida pelo transiluminador de luz ultravioleta pôde-se verificar o tamanho e a integridade do resultado da purificação. Os purificados íntegros foram quantificados em duplicata no aparelho espectrofotômetro NanoDrop para averiguar sua concentração e foram armazenados em um freezer -20°C (modelo CVU26E, Consul).

#### **4.9. Bibliotecas genômicas**

Para a construção das bibliotecas genômicas, as amostras purificadas tiveram que ser diluídas para que todos os fragmentos (referentes à amplificação) tivessem a mesma concentração de DNA, 0,4 ng/µl. A diluição de DNA foi realizada com água ultrapura (*Ultrapure™ DNase/RNase-Free Distilled Water*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). Após isso, os diferentes fragmentos de uma mesma amostra foram reunidos em um mesmo tubo, para que o resultado final fosse uma biblioteca por paciente. O *Kit Nextera XT DNA Sample Preparation* (Illumina, San Diego, EUA) foi utilizado na construção das bibliotecas de acordo com o protocolo do fabricante com algumas modificações. Esse procedimento ocorreu em três etapas e todas elas foram realizadas em uma placa de sequenciamento de 96 poços.

Na primeira etapa foram misturados 5 µl do *Tagment DNA Buffer* (TD) com 2,5 µl do DNA a 0,4 ng/µl e 2,5 µl do *Amplicon Tagment Mix* (ATM). A placa de sequenciamento foi centrifugada (centrífuga 5804R; Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 280 x g por 1 minuto e depois foi colocada em um termociclador

(Veriti™ 96-well Thermal Cycler modelo 9902; Thermo Fisher Scientific) a 55°C por 5 minutos. Ao término da ciclagem, a placa foi imediatamente retirada do termociclador, foram adicionados 2,5 µl de *Neutralize Tagment Buffer* (NT), e a placa foi novamente centrifugada a 280 x g por 1 minuto e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Nessa primeira etapa, os transposons fragmentam o DNA em regiões aleatórias e, ao mesmo tempo, adicionam sequências identificadoras (*tags*) em suas extremidades. Essas sequências identificadoras são sequências terminais com 14 pares de bases que funcionam como adaptadores para a inserção dos índices na segunda etapa. Para que os transposons sejam neutralizados e interrompam a fragmentação do DNA, o reagente *Neutralize Tagment Buffer* deve ser adicionado imediatamente ao término da ciclagem no termociclador (Figura 4.2, A e B).

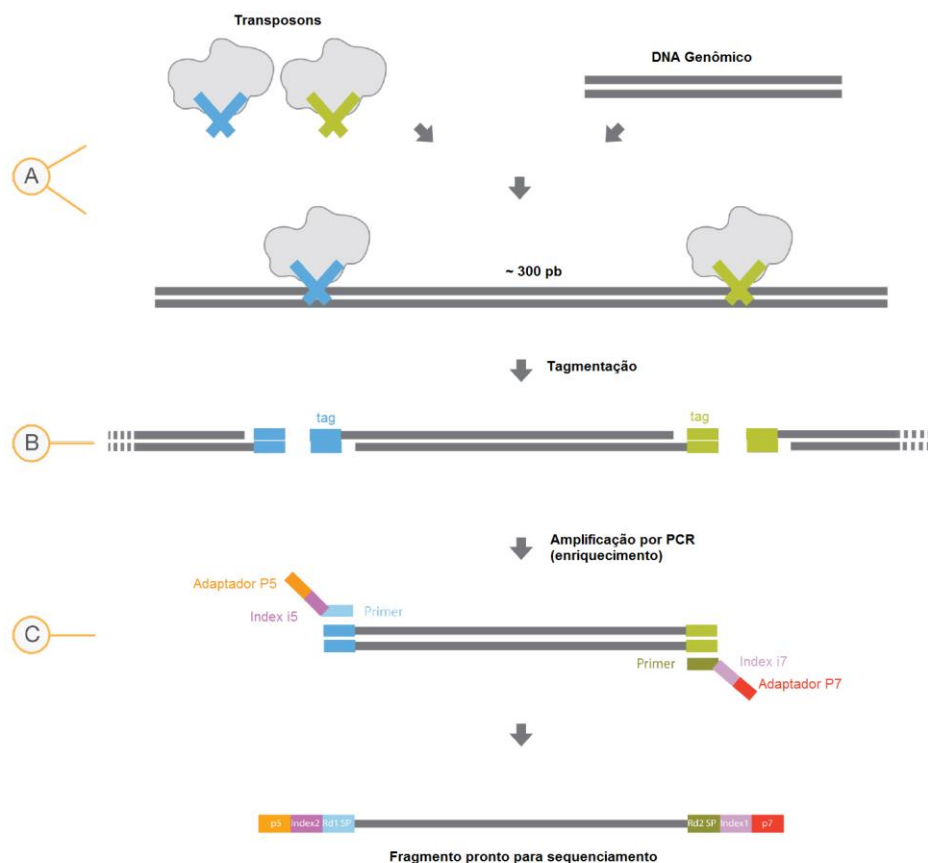


Figura 4.2: Etapas da construção da biblioteca genômica. O kit *Nextera XT DNA Sample Preparation* foi utilizado na montagem das bibliotecas, que posteriormente foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq. Retirado e modificado de *Nextera XT DNA Library Prep – Reference Guide*, disponível em [https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/samplepreps\\_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf](https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera-xt/nextera-xt-library-prep-reference-guide-15031942-05.pdf), acessado em 03 de junho de 2021.



Na segunda etapa, foram adicionados às amostras 2,5 µl do índice i5, 2,5 µl do índice i7 e 7,5 µl do *Nextera PCR Master Mix* (NPM). A placa de sequenciamento foi centrifugada a 280 x g por 1 minuto e colocada no termociclador para a ciclagem de PCR, que consistia em: 1 ciclo de 72°C por 3 minutos e 95°C por 30 segundos; 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; 1 ciclo de 72°C por 5 minutos e 10°C por tempo indefinido para a conservação da reação. Nessa segunda etapa, a amplificação por PCR proporciona o enriquecimento do DNA que foi fragmentado na etapa anterior e, além disso, também são adicionados às extremidades das sequências um par de índices (i5 e i7) (figura 4.2, C). Os índices são identificadores que distinguem uma amostra da outra, uma vez que eles permitem o reconhecimento dos fragmentos de DNA de uma mesma amostra. Além disso, eles também possuem adaptadores (p5 e p7) que são necessários à etapa de clusterização no momento do sequenciamento.

Na terceira etapa, 10µl (0,4x) de *AMPure XP beads* (Agencourt Bioscience Corporation, Beverly, EUA) foram adicionados a 25 µl do produto de PCR da etapa anterior e o material foi misturado por pipetagem até que a solução ficasse homogênea. Esse reagente possui microesferas magnéticas (*beads*) que se ligam aos maiores fragmentos de DNA. A placa de sequenciamento permaneceu por 5 minutos incubada a temperatura ambiente, e foi posteriormente colocada sobre a estante magnética por dois minutos para que as microesferas magnéticas, presas aos grandes fragmentos de DNA, migrassem para a parede do poço. Assim, 30 µl do sobrenadante foram transferidos para outro poço que continha 18 µl (0,6x) de *AMPure XP beads*. Os poços foram novamente pipetados para homogeneização; a placa foi depois incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, foi colocada na estante magnética por dois minutos e todo o sobrenadante (contendo os menores fragmentos de DNA) foi descartado. Sendo assim, o início dessa terceira etapa visa a remoção dos maiores e menores fragmentos de DNA, restando apenas os fragmentos de tamanho intermediário. Após a seleção do tamanho dos fragmentos de DNA, ocorre a etapa de purificação. Para isso, foram realizadas duas lavagens com 200 µl de etanol Merck (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 80% e, então, as amostras ficaram secando por 15 minutos a temperatura ambiente na estante magnética. Em seguida, a placa foi retirada da estante e foram adicionados 25 µl de *Resuspension Buffer* (RSB) em cada poço. O RSB tem afinidade pelas microesferas magnéticas; dessa forma, ele tem a capacidade de desprender o DNA que estava retido nessas esferas. Por fim, a placa foi colocada novamente na estante

magnética, esperou-se 2 minutos e 23 µl do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 0,6 µl. Os tubos resultantes, um por paciente, foram armazenados em um freezer a -20°C (modelo CVU26E; Consul, São Bernardo do Campo, Brasil).

#### **4.10. Eletroforese e quantificação das bibliotecas**

As bibliotecas passaram por uma análise em gel de agarose a 1%. Para isso, 2 µl da biblioteca foram corados com 1 µl de *GelRed*. Pela fotografia do gel de agarose em transiluminador de luz ultravioleta, foi possível estimar o tamanho médio dos fragmentos de DNA. Esse tamanho médio variou de 500 a 800 pb.

Após a estimativa de tamanho, as bibliotecas foram quantificadas no fluorímetro *Qubit 3* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Para isso, uma solução de trabalho teve que ser criada para a quantificação. Para a criação da solução de trabalho, o *dsDNA HS Reagente* foi diluído em *dsDNA HS Buffer* a uma concentração de 1:200 e 199 µl do *master mix* foram corados com 1 µl de corante por cada amostra. Após isso, 190 µl da solução de trabalho foram misturados com 10 µl do *standard* para a criação dos dois padrões utilizados e 198 µl da solução de trabalho foram misturados com 2 µl da biblioteca para a sua quantificação. Levando em consideração a concentração de cada biblioteca e a estimativa do tamanho médio dos fragmentos de DNA, as bibliotecas foram reunidas em um *pool* final e diluídas em tampão Tris (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) para que sua concentração final ficasse a 2 nM.

#### **4.11. Sequenciamento de Nova Geração**

Antes do sequenciamento, o *pool* final construído na etapa anterior foi desnaturado e diluído até que sua concentração ficasse a 13 pM. Para isso, 3 µl do *PhiX Control v3 Library* a 1 nM foram adicionados a 50 µl do *pool* final a 2 nM. O *PhiX Control v3 Library* (Illumina, San Diego, EUA) é uma biblioteca derivada do bacteriófago PhiX que possui todos os seus parâmetros conhecidos, sendo assim utilizada como uma biblioteca controle para averiguar se houve sucesso no sequenciamento. Em seguida, 10 µl desse *pool* (*PhiX* + *pool* final) foram misturados com 10 µl de NaOH a 0,1N diluído anteriormente (45 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl NaOH). Essa solução foi vortexada e centrifugada (centrífuga 5424; Eppendorf) brevemente e permaneceu incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, para que ocorresse a

desnaturação do DNA. Depois, 980 µl de *Hybridization Buffer* (HT1) foram adicionados à solução, resultando em um *pool* final com concentração de 19 pM. Posteriormente, 410 µl do *pool* final a 19 pM e 190 µl do HT1 foram transferidos para um novo tubo, resultando em um *pool* final com concentração de 13 pM. O tubo foi vortexado e centrifugado brevemente e 600 µl do *pool* final foram colocados no cartucho de sequenciamento.

Com o *pool* final desnaturado e diluído a 13 pM, o cartucho de sequenciamento foi inserido na plataforma Illumina MiSeq e a etapa de sequenciamento foi iniciada. O kit utilizado foi o *MiSeq v2* (Illumina, San Diego, EUA) e o protocolo aplicado foi o *paired end 2x251*, que consiste no sequenciamento de 251 nucleotídeos da extremidade senso do fragmento de DNA e no sequenciamento de 251 nucleotídeos da extremidade antissenso.

No sequenciador Illumina MiSeq ocorrem duas etapas, a clusterização e o sequenciamento por síntese. A etapa inicial, a clusterização, se baseia na produção de múltiplas cópias da sequência original de DNA. A lâmina (*flowcell*) utilizada no sequenciamento possui canais com dois tipos de pequenas sequências que são complementares aos adaptadores (p5 e p7) colocados nas extremidades dos fragmentos de DNA no momento da construção das bibliotecas genômicas (Figura 4.2). Sendo assim, a primeira etapa consiste na ligação dos adaptadores à sua sequência complementar na superfície da lâmina. A partir dessa ligação, a DNA polimerase é capaz de criar uma cópia dos fragmentos de DNA, resultando em um DNA de dupla fita. Esse DNA dupla fita é desnaturado e a extremidade livre da fita simples também se liga à sua sequência complementar na superfície da lâmina, criando uma ponte. A DNA polimerase novamente cria um novo fragmento, a ponte é desnaturada resultando em dois fragmentos simples e esses dois fragmentos criam novas pontes para serem copiadas. Esse processo se repete por várias vezes e simultaneamente para milhões de *clusters*. Após a amplificação das pontes, todos os fragmentos antissensos são desprendidos da lâmina.

A segunda etapa, o sequenciamento por síntese, se baseia na extensão do DNA para a criação das *reads* (sequências resultantes do sequenciamento). Para isso, cada oligonucleotídeo adicionado pela DNA polimerase é fluorescente e possui sua terminação hidroxila (OH) bloqueada para que cada base seja adicionada por vez. Além disso, cada uma das quatro bases nucleotídicas possui fluorescência diferente, possibilitando a sua diferenciação. Dessa forma, uma luz é emitida e a lâmina é escaneada a cada base adicionada, resultando em diversas imagens. A

partir dessas imagens é possível determinar a posição correta dos nucleotídeos. Depois de cada imagem gerada, a lâmina é lavada e outro oligonucleotídeo é adicionado, repetindo todo o processo. Com isso, centenas de milhões de *clusters* são sequenciados resultando em centenas de milhões de *reads*.

#### 4.12. Análise das *reads*

As *reads* provenientes do sequenciamento são disponibilizadas online no formato FASTQ. Dessa forma, todos os arquivos oriundos do sequenciamento foram baixados e exportados para o programa Geneious versão 9.1.8 (Biomatters Limited, Auckland, Nova Zelândia). A ferramenta *Sequence - Set Paired Reads*, disponível no Geneious, é capaz de reunir *reads* com orientações diferentes em um mesmo arquivo. Dessa forma, como cada amostra possuía dois arquivos (um senso e um antissenso), essa ferramenta foi utilizada para que as amostras fossem pareadas e para que fosse criado apenas um arquivo por amostra.

Uma sequência-referência do subtipo B do HIV-1 (HXB2, número de acesso no *GenBank* NC\_001802) havia sido previamente anotada no programa Geneious. Nela estavam especificadas as posições dos genes codificantes, dos peptídeos maduros, dos fragmentos delimitados pelos iniciadores, das mutações de resistência, entre outras anotações (Figura 4.3). Sendo assim, cada amostra foi alinhada à essa sequência-referência através da ferramenta *Align/Assemble – Map to Reference*. Nesse momento, foi configurada uma iteração de dez vezes (*iterate up to 10 times*). Na primeira iteração, as *reads* são alinhadas com a sequência-referência formando o primeiro consenso; nas iterações subsequentes, as *reads* são alinhadas ao consenso da iteração anterior. Esse processo ocorre por dez vezes para que a referência utilizada não tenha uma grande influência no consenso final da amostra. Além disso, também foi configurada uma filtragem das extremidades das sequências (*trim before mapping – trim sequences*) de modo que a probabilidade de erro por base nucleotídica fosse de até 0,001. Outros parâmetros também selecionados no alinhamento foram: permitir o tamanho máximo de *gaps* (regiões não preenchidas por nucleotídeos) de 15pb e de 15% por *read*; *word length* foi definido como 14 bases; máximo de 25% de trocas por *read*; identidade mínima de sobreposição de 80%; *index word length* de 12; ambiguidade máxima de 16 bases; e a seleção das opções “*accurately map reads with errors to repeat regions*” e “*search more thoroughly for poor matching reads*”. Por fim, todas as amostras foram

inspecionadas visualmente a fim de avaliar se o alinhamento estava correto, examinar regiões com baixa cobertura (<1000pb) e examinar a presença de deleções, inserções e *stop codons* precoces.

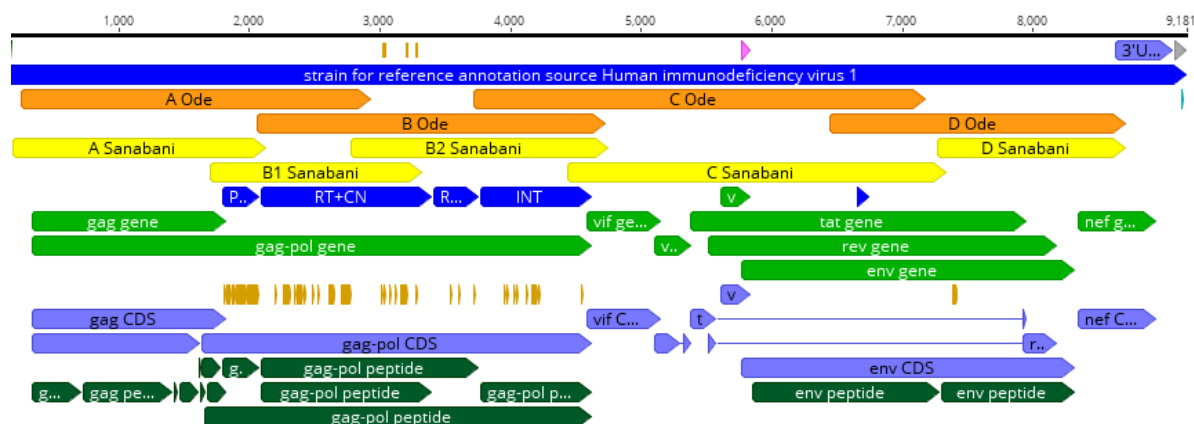


Figura 4.3: Sequência-referência anotada utilizada no alinhamento das amostras. Há anotações sobre as posições dos fragmentos sobrepostos, as regiões do genoma do HIV, os genes codificantes, as mutações de resistência e os peptídeos maduros. Todas as posições são em relação à sequência-referência HXB2 do HIV-1 (número de acesso no *GenBank* NC\_001802).

#### 4.13. Análise das mutações de resistência aos antirretrovirais

A sequência-referência anotada possuía informações sobre as posições das mutações de resistência aos antirretrovirais. Dessa forma, após o alinhamento com a referência, foi possível avaliar a presença e frequência dessas mutações. A ferramenta *Annotate & Predict – Find Variations/SNPs*, disponível no Geneious, foi utilizada para identificar as trocas nucleotídicas, em relação à referência, existentes na amostra. As variantes que possuem frequência maior que 20% na população viral são comumente detectadas pela técnica de Sanger (GIBSON *ET AL.*, 2017; MACHNOWSKA *ET AL.*, 2019; TELELE *ET AL.*, 2019; ZHAO *ET AL.*, 2020). Sendo assim, durante a identificação das trocas nucleotídicas em relação a referência, a cobertura mínima foi definida como 50 bases e a frequência mínima de variante foi definida como 0,01. Com isso, as variantes com frequência entre 1% e 20% na população viral foram consideradas variantes minoritárias. Além disso, a opção “*analyze effect of polymorphisms on translations*” também foi selecionada. Depois da identificação das variantes, a ferramenta *Annotate & Predict - Compare Annotations* foi utilizada para a criação de uma tabela que continha a interseção entre as variantes da amostra e as posições das mutações de resistência anotadas na referência.

A base de dados do *Stanford University - HIV Drug Resistance Database*, disponível através do site <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations>, permite a submissão de mutações presentes nas regiões da transcriptase reversa, protease e integrase e, em troca, disponibiliza os níveis de resistência das mutações aos antirretrovirais mais comumente usados. Dessa forma, o conjunto de mutações de resistência encontrado em cada paciente foi submetido nessa base de dados (um paciente por vez) para avaliar se essas mutações seriam principais ou acessórias e, no caso de principais, a qual(is) medicamento(s) elas conferiam resistência.

A base de dados utilizada não disponibiliza informações sobre as mutações de resistência presentes na região C-terminal da transcriptase reversa (regiões da RNase H e Conexão). Dessa forma, a resistência associada a essas mutações foi avaliada manualmente de forma que abrangesse os registros na literatura (BREHM *ET AL.*, 2007; SANTOS *ET AL.*, 2008; DELVIKS-FRANKENBERRY *ET AL.*, 2009; DAU *ET AL.*, 2010; DELVIKS-FRANKENBERRY *ET AL.*, 2010; GUPTA *ET AL.*, 2011; LENGROBER *ET AL.*, 2011; PAREDES *ET AL.*, 2011). As mutações analisadas nas regiões RNase H e Conexão estão compiladas no Anexo 9.2.

As mutações de resistência à droga transmitida (TDRM, do inglês: *transmitted drug resistance mutations*) foram definidas de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (BENNETT *ET AL.*, 2009). Pacientes que apresentaram TDRMs e que não faziam uso de medicamento da classe de antirretroviral a qual essas mutações causavam resistência foram consideradas TDRMs genuínas. Por outro lado, nos casos dos pacientes que apresentaram TDRMs e que faziam uso de medicamento da classe de antirretroviral a qual essas mutações causavam resistência, as mutações não foram consideradas TDRMs genuínas, pois a presença dessas mutações podia ter sido causada por pressões seletivas da medicação utilizada pelo paciente.

As mutações de resistência encontradas, suas respectivas frequências e os dados dos antirretrovirais utilizados por cada paciente foram exportados para o programa Excel. Em seguida, todos os pacientes que apresentaram mutações de resistência tiveram seus esquemas terapêuticos verificados para averiguar a possibilidade de seus esquemas serem prejudicados pelo seu conjunto de mutações.

#### **4.14. Análises filogenéticas**

As sequências-consensos de cada amostra foram extraídas utilizando-se a ferramenta *Tools – Generate Consensus Sequence*, disponível no Geneious. Naquele momento foi definido que as bases deveriam ter, ao menos, 75% de correspondência com as *reads* (*Threshold: 75%*) e que a sua cobertura mínima deveria ser de 100 bases. Em seguida, a ferramenta *Sequence – Group Sequences into a List* foi utilizada para reunir todos os consensos em uma lista que continha as sequências-referência de cada subtipo puro do grupo M e uma sequência-referência do grupo O (utilizada como *outgroup*) do HIV-1. Depois, essa nova lista criada passou por um múltiplo alinhamento (*Align/Assemble – Multiple Align*), utilizando o *Geneious Alignment*, do tipo alinhamento global com espaços terminais livres e 65% de similaridade. Posteriormente, o alinhamento disponibilizado pelo Geneious foi submetido ao programa Model Generator para definir o melhor modelo de substituição nucleotídica. Depois disso, o alinhamento foi utilizado no programa PhyML versão 3.0 para que uma árvore filogenética de máxima verossimilhança fosse construída com os parâmetros fornecidos pelo programa Model Generator, permitindo a determinação dos subtipos virais de cada amostra por agrupamento com as sequências-referência dos subtipos específicos.

Para averiguar a presença de recombinação, todos os consensos foram analisados individualmente no programa SimPlot versão 3.5.1 através da ferramenta *BootScan*. Entretanto, antes da predição de recombinação, as sequências-consensos tiveram que ser refinadas. Para isso, as bases iniciais e finais de cada sequência-consenso foram excluídas no programa BioEdit, de modo que todos os consensos tivessem o mesmo tamanho das sequências referências, dessa maneira a imagem resultante do programa SimPlot seria menos poluída. Então, para averiguar a presença de recombinantes, a amostra de interesse foi selecionada junto com referências dos subtipos puros B, C e F1 do grupo M do HIV-1 (circulantes no Brasil) e, além disso, os parâmetros a seguir foram utilizados: janela = 400 pb; passos = 40 pb; T/t = 2.0; gapstrip = on; réplicas = 100; modelo de substituição nucleotídica = F84; método = máxima verossimilhança.

#### **4.15. Análises de predição de epítomos de células T**

A ferramenta disponibilizada pelo banco de dados do IEDB (do inglês: *Immune Epitope Database Analysis Resource*) foi utilizada na predição de epítomos

de células T (versão 2.24). Ela pode ser acessada através do site <http://tools.iedb.org/mhci/>. Essa ferramenta analisa a sequência de aminoácidos submetida e determina a sua capacidade de se ligar a uma molécula de HLA de classe I específica. A determinação da capacidade de ligação se dá através de valores de *percentil rank*, sendo assim, quanto menor for o *percentil rank*, maior a afinidade da ligação epítipo-HLA. Para determinar o valor do *percentil rank*, o algoritmo do IEDB compara o IC<sub>50</sub> do epítipo submetido com aqueles de um grande conjunto de peptídeos selecionados aleatoriamente da base de dados *SWISS-PROT*. Nas recomendações do IEDB é dito que, para os HLAs de classe I, o ponto de corte para a seleção de bons ligantes é *percentil rank* ≤ 1% (<https://help.iedb.org/hc/en-us/articles/114094151811>, acessado em 05 de junho de 2021). Dessa forma, todos os epítopos considerados de alta afinidade nas análises de predição, descritas adiante, possuem *percentil rank* menor ou igual a 1%.

Para essa etapa, a análise de predição foi dividida em duas seções, que estão descritas abaixo como 4.15.1 e 4.15.2. Todas essas análises foram realizadas através das sequências consensos traduzidas das amostras. Para isso, os consensos gerados anteriormente foram traduzidos no programa Geneious e as regiões virais correspondentes aos genes *gag*, *pol*, *vif* e *nef* foram extraídas no formato FASTA.

#### **4.15.1. Predição de epítopos de células T**

O primeiro ponto da predição teve a finalidade de determinar quais são os epítopos provirais conservados do HIV que tenham alta afinidade aos alelos de HLA-A, -B e -C mais frequentes da população do estudo. Para isso, os alelos mais frequentes de cada HLA (-A, -B e -C) foram selecionados e colocados na ferramenta de predição junto com as sequências consensos traduzidas de cada gene viral (*gag*, *pol*, *vif* e *nef*).

A Dra. Isabel Prellwitz tipou as amostras utilizadas nesse estudo durante o seu Doutorado. Para essa etapa, a Dra. Isabel Prellwitz amplificou os genes de HLA-A, B e C separadamente através de PCR, englobando as regiões promotoras e os éxons 1 ao 7. Os produtos de PCR foram sequenciados na plataforma Illumina MiSeq e, em seguida, os alelos foram tipados no software HLA Twin (Omixon, Budapeste, Hungria). Desse modo, a partir de sua Tese, foi possível selecionar, no mínimo, os seis alelos mais frequentes de cada localidade estudada. Sendo assim,



os alelos mais frequentes nas 46 amostras do RJ foram: HLA-A\*02:01, HLA-A\*30:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*15:03, HLA-B\*44:03, HLA-C\*04:01 e HLA-C\*07:02; já os alelos mais frequentes nas 40 amostras do RS foram: HLA-A\*01:01, HLA-A\*02:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*08:01, HLA-B\*14:02, HLA-B\*51:01, HLA-C\*04:01 e HLA-C\*07:02.

A submissão na ferramenta de predição foi dividida por genes e por origem das amostras, ou seja, inicialmente foram submetidos todos os consensos das amostras do RJ que possuíam o gene *gag*, junto de seus alelos mais frequentes. Depois disso, foram submetidos, também junto de seus alelos mais frequentes, todos os consensos das amostras do RS que possuíam o gene *gag*. Sendo assim, essa etapa foi realizada para todas as outras regiões: RJ-*pol*, RS-*pol*, RJ-*vif*, RS-*vif*, RJ-*nef* e RS-*nef*. O método de predição utilizado foi o método recomendado pela ferramenta, chamado de *IEDB recommended 2020.09 (NetMHCpan EL 4.1)*.

Os epítomos que possuíam *percentil rank* de 0,01% até 1% foram selecionados e, em conjunto com as informações referentes aos HLAs, aos epítomos e às amostras, foi possível destacar todos os epítomos duplicados e assim selecionar os epítomos conservados que estavam presentes em mais de 95% das amostras analisadas.

#### **4.15.2. Afinidade dos epítomos mais frequentes aos HLAs –A, –B e –C de cada paciente**

Na etapa anterior, a afinidade da ligação epítomo-HLA foi predita apenas para os HLAs mais frequentes de cada localidade. Sendo assim, esta segunda análise teve por objetivo avaliar se os epítomos selecionados no primeiro ponto também possuíam alta afinidade aos alelos específicos de cada paciente. Para isso, os mesmos parâmetros da primeira etapa foram utilizados na ferramenta de predição. Contudo, ao invés de submeter os alelos mais frequentes da região, foram submetidos os alelos individuais e, ao invés de submeter os consensos das amostras, foram submetidos apenas os epítomos selecionados na primeira análise. Ou seja, o epítomo mais frequente do RJ-*gag* foi colocado na ferramenta de predição junto com os alelos específicos de cada amostra do RJ. O arquivo resultante da predição foi analisado no software Excel, onde foram considerados epítomos com alta afinidade apenas aqueles que apresentaram *percentil rank*  $\leq 1\%$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Casuística

No total, 86 pacientes foram incluídos no estudo, sendo 46 pacientes do Rio de Janeiro - RJ e 40 pacientes de Rio Grande - RS. Dos 46 pacientes do Rio de Janeiro, 34 eram provenientes do Hospital Federal de Ipanema (HI) e 12 do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF). Em relação aos pacientes de Rio Grande, todos (n = 40) eram provenientes do Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior (HU-FURG). Durante a coleta das amostras, um questionário foi preenchido a partir dos dados contidos nos prontuários médicos dos pacientes (Anexo 9.1). Esses dados foram compilados e estão disponíveis na tabela abaixo (Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo. Os pacientes eram provenientes do Hospital Federal de Ipanema (HI), Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) e Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior (HU-FURG).

<b>Características</b>	<b>HI (n = 34)</b>	<b>HUCFF (n = 12)</b>	<b>HU-FURG (n = 40)</b>
Homens (%)	26 (76,5%)	8 (66,7%)	15 (37,5%)
Mediana da idade (anos) (IQR <sub>50</sub> )	37 (30,5 – 45)	43,5 (41 - 52)	43 (35 – 49,5)
Mediana do tempo de diagnóstico para HIV+ até a coleta (anos) (IQR <sub>50</sub> )	4,4 (3,6 – 6,4) <sup>1</sup>	13,3 (7,7 – 14,8)	4,8 (2,4 – 10,6)
Mediana do tempo de tratamento (anos) (IQR <sub>50</sub> )	3,1 (2,4 – 4,1)	9,3 (4,6 – 11,4)	3,8 (2,2 – 4,7)
Mediana do tempo para o início do tratamento (anos) (IQR <sub>50</sub> )	1,1 (0,6 – 2,8) <sup>2</sup>	1,7 (0,1 – 5,3)	0,9 (0,2 – 3,2)
Mediana da contagem de células TCD4 (cél/mm <sup>3</sup> ) (IQR <sub>50</sub> )	762,5 (653 – 862,75)	780 (702 – 1038,8)	780,5 (680,75 – 938,5)
Mediana da contagem de células TCD8 (cél/mm <sup>3</sup> ) (IQR <sub>50</sub> )	729 (548,25 – 980)	930 (888,5 – 1228,5) <sup>5</sup>	848 (750,5 – 1053)

Mediana da contagem de células TCD4 antes do tratamento (cél/mm <sup>3</sup> ) (IQR <sub>50</sub> )	369,5 (330 – 443) <sup>3</sup>	233 (171 – 262) <sup>6</sup>	561 (489 – 646) <sup>8</sup>
Mediana da carga viral antes do tratamento (cópias/ml) (IQR <sub>50</sub> )	22.619 (2.372 – 52.452) <sup>4</sup>	37.059 (8.329 – 176.095) <sup>7</sup>	7.127 (3.830,3 – 20.693) <sup>9</sup>

### Via de transmissão

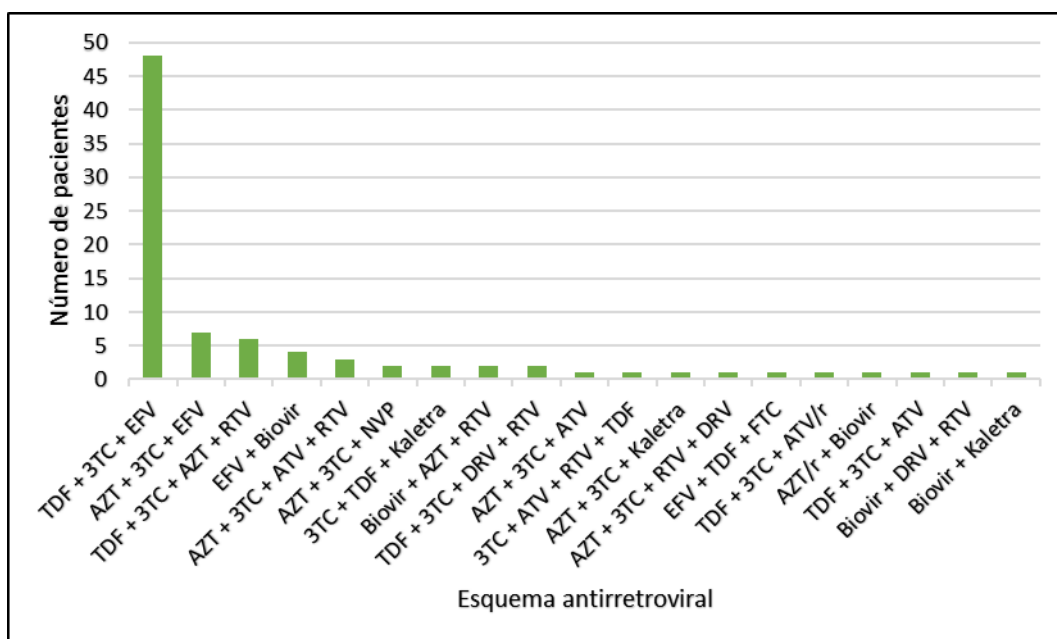
Sexual (não especificado) (%)	16 (47%)	4 (33,3%)	34 (85%)
Sexual (heterossexual) (%)	4 (11,8%)	1 (8,4%)	1 (2,5%)
Sexual (homossexual) (%)	7 (20,6%)	3 (25%)	2 (5%)
Sexual (bissexual) (%)	0	0	1 (2,5%)
Usuário de drogas injetáveis (%)	0	0	2 (5%)
Não relatado (%)	7 (20,6%)	4 (33,3%)	0

<sup>1</sup>Dados baseados em 33 pacientes; <sup>2</sup>Dados baseados em 32 pacientes; <sup>3</sup>Dados baseados em 22 pacientes; <sup>4</sup>Dados baseados em 25 pacientes; <sup>5</sup>Dados baseados em 11 pacientes; <sup>6</sup>Dados baseados em 9 pacientes; <sup>7</sup>Dados baseados em 7 pacientes; <sup>8</sup>Dados baseados em 21 pacientes; <sup>9</sup>Dados baseados em 12 pacientes; IQR<sub>50</sub>: variação interquartil.

A partir da tabela acima é possível observar que a maior parte dos pacientes do HI (76,5%) e do HUCFF (66,7%) são do sexo masculino, enquanto esse mesmo padrão não é observado nos pacientes do HU-FURG, onde apenas 37,5% dos pacientes são homens. Além disso, até o momento da coleta, os pacientes do HI (4,4 anos) e os pacientes do HU-FURG (4,8 anos) tinham uma mediana do tempo de diagnóstico da infecção por HIV menores do que os pacientes do HUCFF (13,3 anos) e, conseqüentemente, os pacientes desses dois primeiros hospitais também tinham uma mediana do tempo de tratamento menor do que a mediana dos pacientes do HUCFF (HI – 3,1 anos; HU-FURG – 3,8 anos; HUCFF – 9,3 anos).

Em relação ao tratamento antirretroviral, 19 combinações diferentes de esquema terapêutico foram utilizadas pelos 86 pacientes incluídos no estudo (Gráfico 5.1). Pode-se observar que dentre essas 19 combinações, a que possui maior predomínio é a composta por tenofovir, lamivudina e efavirenz (TDF+3TC+EFV), sendo responsável por 55,8% (n = 48) da casuística do estudo. Esse esquema é utilizado por 61,8% (n = 21) dos pacientes do HI, por 33,3% (n = 4) dos pacientes do HUCFF e por 57,5% (n = 23) dos pacientes do HU-FURG.

Gráfico 5.1: Esquemas terapêuticos utilizados pelos pacientes incluídos no estudo.



TDF: tenofovir; 3TC: lamivudina; EFV: efavirenz; AZT: zidovudina; RTV: ritonavir; Biovir: lamivudina+zidovudina; ATV: atazanavir; NVP: nevirapine; Kaletra: lopinavir+ritonavir; DRV: darunavir; FTC: Emtricitabina; ATV/r: atazanavir/ritonavir; AZT/r: zidovudina/ritonavir.

## 5.2. Análise molecular

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar diferentes fragmentos do vírus, de modo que, após o sequenciamento, fosse possível juntá-los e montar o genoma quase completo. Para isso, utilizamos três diferentes estratégias de amplificação que puderam ser combinadas (vide tópico 4.5). A tabela do Anexo 9.3 possui informações detalhadas sobre os fragmentos sequenciados de cada amostra, seu número de *reads* produzidas, o número de *reads* que foram alinhados à sequência-referência HXB2 e a média da cobertura.

Todas as amostras incluídas no estudo foram sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq com sucesso. Das 86 amostras, 69 (80,2%) tiveram o genoma proviral quase completo sequenciado. Em relação a cada hospital, o HI teve 29 (85,3%; 29/34) amostras completas, o HUCFF teve 12 (100%; 12/12) e o HU-FURG teve 28 (70%; 28/40). Com o programa Geneious (v 9.1.8), foi possível determinar a quantidade total de *reads* em cada amostra, a quantidade de *reads* alinhados e a cobertura. Desse modo, para os pacientes do HI, obteve-se uma mediana de *reads* de 908.892 (IQR<sub>50</sub> 634.613,5 – 1.255.944), uma mediana de *reads* alinhados de 799.266 (IQR<sub>50</sub> 547.457,5 – 1.072.501) e uma mediana de cobertura de 11.926

(IQR<sub>50</sub> 6.709,8 – 17.199,575). Para os pacientes do HUCFF, a mediana de *reads* foi de 959.137 (IQR<sub>50</sub> 759.291,5 – 1.268.563,5), a mediana de *reads* alinhados foi de 905.799 (IQR<sub>50</sub> 711.767 – 1.226.588,5) e a mediana de cobertura foi de 13.203 (IQR<sub>50</sub> 10.254,95 – 21.336,575). Por fim, para os pacientes do HU-FURG, a mediana de *reads* foi de 1.181.661 (IQR<sub>50</sub> 664.149 – 1.596.369,5), a mediana de *reads* alinhados foi de 1.118.060 (IQR<sub>50</sub> 535.041,25 – 1.411.124,5) e a mediana de cobertura foi de 15.467 (IQR<sub>50</sub> 11.222,275 – 18.375,625).

### **5.3. Diversidade genética**

Para a criação da árvore filogenética foram utilizadas apenas as sequências consensos das 69 amostras que tiveram o genoma proviral quase completo finalizado. As sequências consensos dessas amostras foram alinhadas no programa Geneious, e esse alinhamento foi utilizado no programa PhyML para a criação de uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (Figura 5.1). A partir da figura, pode-se observar que a maioria das amostras do Rio de Janeiro (HI e HUCFF) estão agrupadas com as sequências-referência do subtipo B, enquanto a maior parte das amostras de Rio Grande (FURG) estão agrupadas com as sequências-referência do subtipo C.

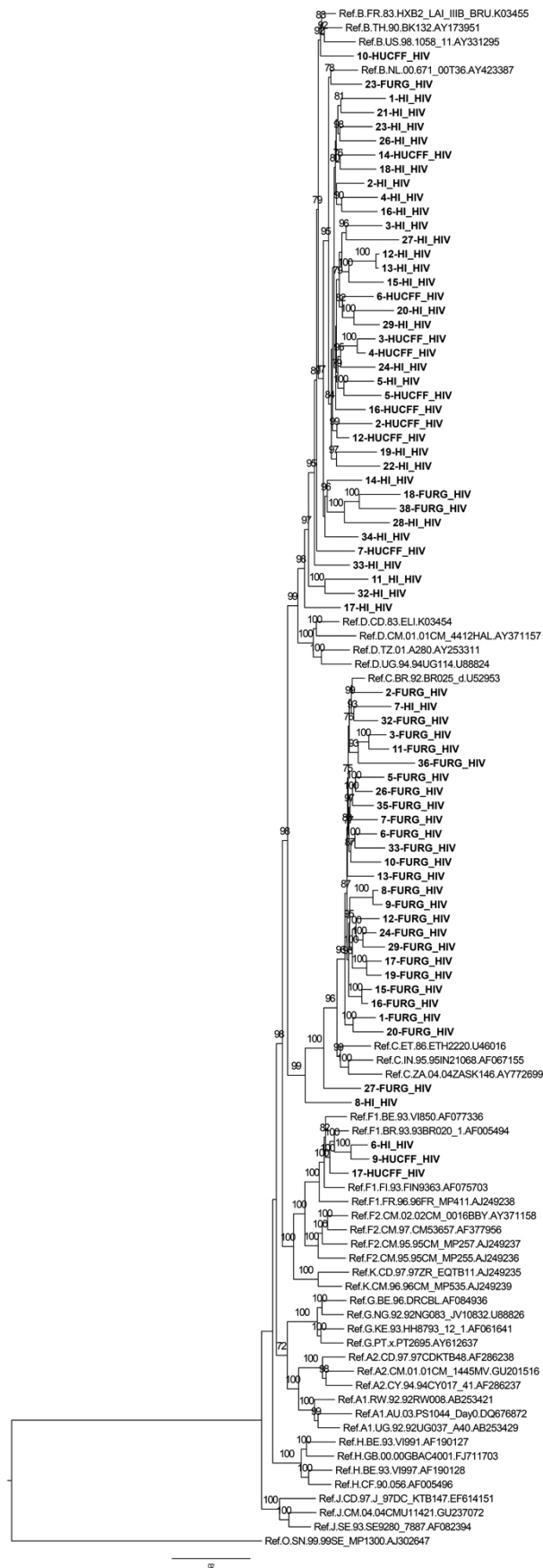


Figura 5.1: Árvore filogenética de máxima verossimilhança contendo todas as 69 amostras que possuem o genoma proviral quase completo do HIV-1. As amostras do estudo estão representadas em negrito. HI: Hospital Federal de Ipanema; HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; FURG: Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior.

Depois da construção da árvore filogenética, as 86 amostras incluídas no estudo (sequências parciais e sequências completas) passaram por uma análise no programa SimPlot, onde foi possível averiguar a presença de recombinações, com a caracterização de potenciais formas recombinantes únicas (URF) e formas recombinantes circulantes (CRF), além da confirmação dos subtipos puros. A Tabela 5.2 mostra o resultado dessa análise. No Rio de Janeiro, foi visto que 78,3% (36/46) das amostras pertencem ao subtipo B, 4,3% (2/46) pertencem ao subtipo F1, 2,2% (1/46) pertencem ao subtipo C e 15,2% (7/46) são formas recombinantes. Entre os recombinantes, 10,9% (5/46) foram classificadas como URF\_BF1 e 4,3% (2/46) como URF\_BC. Já em Rio Grande, 67,5% (27/40) das amostras são do subtipo C, 7,5% (3/40) são do subtipo B e 25% (10/40) são formas recombinantes (URF\_BF1 (10%; 4/40), URF\_BC (7,5%; 3/40), URF\_BCF1 (5%; 2/40), URF\_CF1 (2,5%; 1/40)).

Tabela 5.2: Subtipos puros e recombinantes do HIV -1 resultantes da análise realizada no programa SimPlot com todas as 86 amostras incluídas no estudo (sequências parciais e sequências completas).

<b>Amostra</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Subtipo</b>
1-HI*	B	21-HI	B	9-HUCFF	F1
2-HI	B	22-HI	B	10-HUCFF	B
3-HI	B	23-HI	B	12-HUCFF	B
4-HI	B	24-HI	B	14-HUCFF	B
5-HI	B	25-HI	B	16-HUCFF	B
6-HI	F1	26-HI	B	17-HUCFF	BF1
7-HI	BC	27-HI	B	1-FURG	C
8-HI	BC	28-HI	BF1	2-FURG	C
9-HI	C	29-HI	B	3-FURG	BC
10-HI	B	30-HI	B	4-FURG	C
11-HI	BF1	31-HI	B	5-FURG	CF1
12-HI	B	32-HI	BF1	6-FURG	C
13-HI	B	33-HI	B	7-FURG	C
14-HI	B	34-HI	B	8-FURG	C
15-HI	B	2-HUCFF	B	9-FURG	C
16-HI	B	3-HUCFF	B	10-FURG	C
17-HI	BF1	4-HUCFF	B	11-FURG	BC
18-HI	B	5-HUCFF	B	12-FURG	C
19-HI	B	6-HUCFF	B	13-FURG	C
20-HI	B	7-HUCFF	B	14-FURG	BF1

<b>Amostra</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Subtipo</b>	<b>Amostra</b>	<b>Subtipo</b>
<b>15-FURG</b>	C	<b>24-FURG</b>	C	<b>33-FURG</b>	C
<b>16-FURG</b>	C	25-FURG	C	34-FURG	BF1
<b>17-FURG</b>	C	<b>26-FURG</b>	C	<b>35-FURG</b>	C
<b>18-FURG</b>	BF1	<b>27-FURG</b>	BCF1	<b>36-FURG</b>	BC
<b>19-FURG</b>	C	28-FURG	C	37-FURG	C
<b>20-FURG</b>	BCF1	<b>29-FURG</b>	C	<b>38-FURG</b>	BF1
21-FURG	C	30-FURG	B	39-FURG	C
22-FURG	B	31-FURG	C	40-FURG	C
<b>23-FURG</b>	B	<b>32-FURG</b>	C		

\*Os genomas quase completos estão representados em negrito. HI: Hospital Federal de Ipanema; HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; FURG: Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior.

#### **5.4. Mutações de resistência aos antirretrovirais**

Todas as 86 amostras incluídas no estudo puderam ser analisadas no programa Geneious para avaliar a presença e frequência das mutações de resistência aos antirretrovirais. Na literatura, quatro regiões genômicas são conhecidas por abrigar essas mutações de resistência: protease, transcriptase reversa, integrase e envelope. Todas as 86 amostras tiveram, pelo menos, uma dessas regiões analisada, e 72 (83,7%) delas tiveram todas as quatro regiões analisadas (Tabela 5.3). No total, foram encontradas 168 mutações distribuídas entre 63 (73,3%) amostras. Algumas amostras, como a 3-HI, não possuíam nenhuma mutação capaz de conferir resistência aos antirretrovirais, enquanto outras, como a 24-FURG, possuíam até nove mutações ao longo do genoma. Das 168 mutações encontradas, 48 (28,6%) estavam presentes na região protease, 103 (61,3%) na transcriptase reversa, 14 (8,3%) na integrase e 3 (1,8%) no envelope. Das 86 amostras, 75 tiveram a região protease analisada e 30,7% (n = 23) delas possuíam mutações. Em relação as outras regiões, 66,2% (51/77) das amostras com a transcriptase reversa analisada, 17,1% (13/76) da integrase e 3,5% (3/86) do envelope também apresentaram mutações. As frequências das mutações na população viral intra-paciente variaram de 1% (mutação A62V na amostra 18-HI) até 100% (mutação L210W na amostra 21-HI). Sendo assim, entre as 168 mutações, 63 (37,5%) possuíam frequência acima de 20% e 105 (62,5%) possuíam frequência abaixo de 20%.



Tabela 5.3: Mutações de resistência aos antirretrovirais encontradas ao longo do genoma das 86 amostras incluídas no estudo e o esquema terapêutico de cada paciente.

Amostra	Mutações Protease (cobertura; frequência)	Mutações Transcriptase Reversa (cobertura; frequência)	Mutações Integrase (cobertura; frequência)	Mutações Envelope (cobertura; frequência)	TARV
1-HI*	-	<u>M184V (11.919; 2%)</u>	<i>S147G (8.890; 1,1%)</i>	-	AZT+ <u>3TC</u> +NVP
2-HI	-	-	<i>R263K (2.197; 6,2%)</i>	-	AZT+3TC+EFV
3-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
4-HI	-	<u>V106A (11.530;7,5%)</u>	<i>Y143H (10.115; 5,1%)</i>	-	TDF+3TC+ <u>EFV</u>
5-HI	I47V (3.572; 10,4%)	-	-	-	AZT+3TC+ATV
6-HI	-	<u>M230I (2.451; 2,4%); A400T (9.357; 99,7%)</u>	-	-	<u>AZI</u> +3TC+ATV+RTV
7-HI	-	-	-	-	AZT+3TC+ATV+RTV
8-HI	-	<u>E399D (29.840; 99,9%)</u>	<i>Y143C (20.940; 3,4%)</i>	-	TDF+3TC+ <u>EFV</u>
9-HI	ND	ND	ND	-	3TC+ATV+RTV+TDF
10-HI	<i>N88D (885; 3,1%)</i>	<u>E399D (19.267; 99,9%)</u>	-	-	AZT+3TC+ <u>EFV</u>
11-HI	-	<u>V106A (13.084;1,6%)</u>	-	-	TDF+3TC+ <u>EFV</u>
12-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
13-HI	-	E138K (4.899; 1,3%)	-	V38A (2.148; 3%)	TDF+3TC+EFV
14-HI	K43T (7.074; 23,8%)	-	<i>R263K (5.086; 3,9%)</i>	-	AZT+3TC+Kaletra
15-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
16-HI	D30N (4.574;49,3%); M46I (4.378; 45,6%); G73S (3.730; 52,3%)	-	-	-	AZT+3TC+DRV+RTV
17-HI	-	<u>M41L (3.070; 30,3%)</u>	-	-	<u>AZI</u> +3TC+ATV+RTV
18-HI	-	A62V (4.116; 1%)	-	-	TDF+3TC+EFV
19-HI	-	-	-	-	AZT+3TC+EFV
20-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
21-HI	-	<u>L210W (12.417; 100%)</u>	-	-	<u>TDF</u> + <u>EFV</u> +FTC
22-HI	-	<u>M184I (138; 1,4%); E138K (4.930; 99,7%); Y188C (137; 1,5%); M230I (134; 6,7%)</u>	-	-	<u>TDF</u> + <u>3TC</u> +EFV
23-HI	<i>G73S (7.025; 14%)</i>	-	-	-	TDF+3TC+EFV
24-HI	D30N (22.873; 1,8%)	<i>E138K (9.464; 19,5%); G190E (12.611; 19,7%); M230I (13.363; 24,5%)</i>	-	-	TDF+3TC+Kaletra
25-HI	ND	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV
26-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
27-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
28-HI	-	<u>M41L (10.629; 99,9%); D67N (11.647; 41%); K70R (11.974; 41,8%); E138K (21.929; 2,9%); T215Y (25.935; 13,7%); E399D (17.790; 93,2%); E399G (17.800; 1,1%)</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+ <u>EFV</u>
29-HI	-	-	<i>T66I (7.445; 3,1%)</i>	-	TDF+3TC+EFV
30-HI	<i>M46I (23.993; 4,6%)</i>	<u>M184I (17.371; 29,8%); M230I (13.757; 35,1%)</u>	ND	-	TDF+ <u>3TC</u> +EFV
31-HI	-	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV
32-HI	-	<u>V179D (7.097; 99,4%); M184V (7.007; 8%)</u>	-	-	<u>TDF</u> + <u>3TC</u> +EFV

Amostra	Mutações Protease (cobertura; frequência)	Mutações Transcriptase Reversa (cobertura; frequência)	Mutações Integrase (cobertura; frequência)	Mutações Envelope (cobertura; frequência)	TARV
33-HI	-	<u>M230I (41.923; 31,2%)</u>	<i>R263K (28.906; 1,3%)</i>	-	TDF+3TC+ <u>EFV</u>
34-HI	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
2-HUCFF	-	M41L (6.511; 99,7%); <u>M184I (10.197; 15,2%);</u> M230I (9.335; 16%)	-	-	TDF+ <u>3TC</u> +EFV
3-HUCFF	-	-	-	-	AZT+3TC+EFV
4-HUCFF	-	H221Y (10.635; 1%)	-	-	AZT+3TC+NVP
5-HUCFF	D30N (61.952;6,3%); <u>M46I (56.388; 4,7%);</u> <u>N88S (39.215; 3,7%)</u>	E138K (75.200;6,1%)	-	-	TDF+3TC+ <u>ATV/r</u>
6-HUCFF	G73S (14.964; 43,3%)	-	T97A (4.597; 1,7%)	-	AZT+3TC+EFV
7-HUCFF	-	-	T97A (14.479; 1,3%)	-	AZT+3TC+EFV
9-HUCFF	M46I (1.766; 38,6%); I54T (1,708; 1,3%)	<u>M184I (6.622; 20,1%)</u>	-	-	<u>Biovir</u> +AZT/r
10-HUCFF	-	L74I (3.930; 99,9%)	-	-	TDF+3TC+EFV
12-HUCFF	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
14-HUCFF	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
16-HUCFF	-	G190E (36.629; 2,5%); <u>A400T (23.543; 99,4%)</u>	-	-	<u>AZT</u> +3TC+EFV
17-HUCFF	-	V106I (2.676; 98,8%); <u>A400T (10.440; 99,8%)</u>	-	-	<u>Biovir</u> +EFV
1-FURG	-	<u>E138G (1.114; 1,4%)</u>	-	-	TDF+3TC+ <u>EFV</u>
2-FURG	-	<u>K65R (5970; 1,5%);</u> <u>V108I (12.966;13,4%)</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+ <u>EFV</u>
3-FURG	-	<u>K65R (10.620; 3,3%)</u>	-	-	<u>Biovir</u> +EFV
4-FURG	ND	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV
5-FURG	-	M230I (42.573; 11,1%); <u>M184I (41.987;8,2%);</u> <u>K65R (24.510; 1%)</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+AZT+RTV
6-FURG	-	<i>K103N (5.055; 83%)</i>	-	-	TDF+3TC+AZT+RTV
7-FURG	-	<u>K65R (7.540; 1,4%);</u> <u>K70R (9.300; 1,3%);</u> E138G (13.270;1,1%)	-	-	<u>TDF</u> +3TC+DRV+RTV
8-FURG	-	-	-	V38A (5.731; 1,1%)	TDF+3TC+ATV
9-FURG	G73S (17.194; 59,4%)	<u>K65R (19.710; 1,1%);</u> <u>E138G (40.340; 4,1);</u> <u>M184I (42.297; 37,2%);</u> <u>M230I (42.181; 15,8%)</u>	-	-	<u>Biovir</u> +EFV
10-FURG	<i>I47V (11.041; 2,5%);</i> <i>I50V (11.085; 2,1%)</i>	<u>K65R (24.531; 7,7%)</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+EFV
11-FURG	<i>I50V (6.894; 3,6%);</i> <i>G73S (6.473; 7,5%)</i>	<u>K65R (31.051; 1,1%);</u> <u>M184I (42.485;1,7%);</u> <u>G190E (43.152; 4,8%);</u> M230I (41.000; 1,4%) <u>K65R (5.325; 1,5%);</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+EFV
12-FURG	<i>M46I (13.226; 4,4%);</i> <i>G73S (11.848; 9,7%)</i>	<u>M184I (7.887;26,7%);</u> M230I (4.572; 10,20%); <u>E399D (2.226;50,6%)</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+EFV
13-FURG	<i>D30N (8.715; 3,8%);</i> <i>M46I (7.239; 1,1%);</i> <i>G73S (6.281; 3,4%);</i> <i>V82A (6.605; 1,1%)</i>	<u>M184I (7.459; 8,0%);</u> M230I (10.073; 13,3%)	<i>R263K (9.060; 2,1%)</i>	-	TDF+ <u>3TC</u> +EFV
14-FURG	ND	<u>K219E (7.557; 1%);</u> <u>E312Q (6.615; 99,8%);</u> <u>G335D (6.956; 25%);</u> <u>A400T (6.734; 99,4%)</u> <u>K65R (20.028; 1,7%);</u>	-	-	<u>Biovir</u> + <u>AZT</u> +RTV
15-FURG	<i>D30N (9.350; 30,1%)</i>	E138G (27.150; 1,9%); <u>G190E (31.009; 14,9%)</u>	-	-	<u>TDF</u> +3TC+EFV
16-FURG	<i>D30N (11.835; 3,2%)</i>	-	-	-	TDF+3TC+EFV

Amostra	Mutações Protease (cobertura; frequência)	Mutações Transcriptase Reversa (cobertura; frequência)	Mutações Integrase (cobertura; frequência)	Mutações Envelope (cobertura; frequência)	TARV
17-FURG	-	-	-	-	Biovir+Kaletra
18-FURG	-	<u>K70R (2.935; 1,4%)</u>	-	-	<u>TDF+3TC+EFV</u>
19-FURG	-	<u>M184I (42.311;2,4%);</u> <u>M230I (48.500; 2,2%)</u>	-	-	TDF+ <u>3TC</u> +EFV
20-FURG	-	<u>E138K (24.619; 3,8%);</u> <u>M184I (17.078;1,8%);</u> <u>M230I (25.708; 2,9%)</u>	-	-	TDF+ <u>3TC</u> + <u>EFV</u>
21-FURG	ND	-	-	-	TDF+3TC+EFV
22-FURG	ND	M230I (104.611; 2,1%)	-	-	TDF+3TC+EFV
23-FURG	-	T69ins (1.967; 20,0%); <u>E399D (26.336; 99,1%)</u>	-	-	Biovir+ <u>EFV</u>
24-FURG	<u>L10V (6.395; 99,6%);</u> D30N (3.068; 50,70%); <u>M46I (2.061; 41%);</u> I50V (1.612; 12,3%); G73S (2.161; 27,6%)	V75I (2.557; 5,4%); <u>E138K (2.481; 44,6%);</u> M230I (7.300;31,8%); <u>A400T (6.742; 99,4%)</u>	-	-	TDF+3TC+ <u>AZI</u> + <u>RTV</u>
25-FURG	ND	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV
26-FURG	-	-	<i>R263K (28.400; 1,2%)</i>	-	Biovir+DRV+RTV
27-FURG	-	<i>E138A (45.929; 99,9%);</i> <u>M184I (41.558; 29,1%);</u> M230I (45.500; 25,5%)	-	Q39R (9.120; 10,8%)	TDF+ <u>3TC</u> +AZT+RTV
28-FURG	ND	ND	ND	-	TDF+3TC+AZT+RTV
29-FURG	-	F77L (24.423; 1,1%); <u>M184I (41.671; 4,9%)</u>	-	-	TDF+ <u>3TC</u> +EFV
30-FURG	<i>D30N (478; 98,5%);</i> <i>M46I (264; 100%);</i> <i>I47V (263; 1,9%);</i> <i>G48M (258; 1,9%);</i> <i>G73S (285; 1,1%);</i> <i>V82A (1.304; 1,8%)</i>	E138K (25.065;1,4%)	<i>E138K (21.260; 53,2%);</i> <i>G140S (21.100; 2,9%)</i>	-	TDF+3TC+EFV
31-FURG	<i>M46I (1.602; 99,8%);</i> <i>G73S (4.897; 99,7%)</i>	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV
32-FURG	-	<u>M184I (35.187; 28,7%)</u>	-	-	TDF+ <u>3TC</u> +DRV+RTV
33-FURG	-	<u>K65R (18.883; 1,0%)</u>	-	-	<u>TDF+3TC</u> +EFV
34-FURG	ND	<u>M184I (19.379; 99,9%);</u> M230I (21.191; 99,9%); <u>A400T (27.020; 99,7%)</u>	-	-	TDF+ <u>3TC</u> + <u>AZI</u> +RTV
35-FURG	<u>M46I (10.115; 25,2%);</u> G73S (9.706; 20,7%)	F77L (41.376; 1,3%); M230I (76.605; 4,8%)	T97A (50.702; 1,1%)	-	TDF+3TC+ <u>Kaletra</u>
36-FURG	-	-	-	-	TDF+3TC+EFV
37-FURG	D30N (9.806;31,7%); G73S (7.936; 23,4%)	M230I (14.104; 34,5%)	-	-	TDF+3TC+EFV
38-FURG	D30N (24.413;5,5%); M46I (20.461; 4%); G73S (13.865; 2,3%)	<u>M184I (26.914;2,0%);</u> <u>A400T (22.517; 99,6%)</u>	-	-	Biovir+ <u>AZI</u> +RTV
39-FURG	ND	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV
40-FURG	ND	ND	ND	-	TDF+3TC+EFV

\*Os genomas quase completos estão representados em negrito. Mutações sublinhadas: mutações capazes de conferir algum grau de resistência ao esquema terapêutico utilizado pelo paciente. Antirretrovirais sublinhados: medicamentos que podem ser prejudicados pelas mutações sublinhadas. Mutações em itálico: TDRMs (mutações de resistência à droga transmitida). HI: Hospital Federal de Ipanema; HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; FURG: Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior; TARV: tratamento antirretroviral; -: não foram encontradas mutações; ND: região não disponível; AZT: zidovudina; 3TC: lamivudina; NVP: nevirapine; EFV: efavirenz; TDF: tenofovir; ATV: atazanavir; ATV/r: atazanavir/ritonavir; LPV/r: lopinavir/ritonavir; FPV/r:

fosamprenavir/ritonavir; AZT/r: zidovudina/ritonavir; Biovir: lamivudina+zidovudina; RTV: ritonavir; DRV: darunavir; kaletra: lopinavir+ritonavir.

As 168 mutações encontradas foram submetidas à base de dados Stanford (disponível em: <https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations/>) para averiguar a quais medicamentos elas poderiam causar resistência. O resultado dessa análise foi comparado com o esquema terapêutico do paciente para avaliar se seu tratamento poderia ser prejudicado. Foi observado que, entre as 168 mutações, 68 (40,5%) eram capazes de conferir algum grau de resistência a, pelo menos, um medicamento utilizado pelos pacientes. Na Tabela 5.3, essas mutações capazes de interferir no tratamento do paciente e os medicamentos que podem ser prejudicados estão sublinhados. Essas 68 mutações estavam distribuídas entre 42 (48,8%; 42/86) pacientes e 38 (55,9%; 38/68) delas possuíam frequência menor que 20%.

Em relação a cada localidade, no Rio de Janeiro (hospitais HI e HUCFF) foram encontradas 66 mutações distribuídas entre 31 (31/46; 67,4%) pacientes, sendo que 39 (59,1%) mutações tinham frequência menor que 20%. Entre as 66, 23 (34,8%) mutações podiam influenciar o esquema terapêutico de 17 pacientes. Já em Rio Grande (hospital HU-FURG), entre as 40 amostras analisadas, foram encontradas 102 mutações em 32 (80%) amostras. Dessas 102 mutações, 66 (64,7%) possuíam frequência menor que 20% e 44 (43,1%) podiam conferir algum grau de resistência ao tratamento de 24 pacientes.

As mutações em itálico na Tabela 5.3 são as mutações de resistência à droga transmitida (TDRM, do inglês: *transmitted drug resistance mutations*). Desse modo, das 168 mutações encontradas em todos os pacientes do estudo, 41 (24,4%) eram TDRMs e estavam presentes em 25 (29,1%; 25/86) pacientes. Entre as 41 TDRMs, 30 (73,2%) tinham frequência abaixo de 20%. Alguns pacientes, como o 6-HUCFF, apresentaram apenas uma TDRM, enquanto outros, como o 30-FURG, apresentaram até oito TDRMs. No Rio de Janeiro, foram encontradas 13 (19,7%; 13/66) TDRMs distribuídas em 12 (26,1%; 12/46) pacientes. Já em Rio Grande, foram encontradas 28 (27,4%; 28/102) TDRMs em 13 (32,5%; 13/40) pacientes. Das 13 TDRMs encontradas no RJ, 12 (92,3%) possuíam frequência abaixo de 20%, enquanto em Rio Grande, das 28 TDRMs encontradas, 18 (64,3%) tinham frequência abaixo de 20%.

## 5.5. Predição de epítomos de células T

As regiões genômicas que codificam as proteínas virais Gag, Pol, Vif e Nef das 86 amostras incluídas no estudo foram extraídas do programa Geneious e utilizadas na ferramenta de predição de epítomos de células T do IEDB, disponível em <http://tools.iedb.org/mhci/>.

### 5.5.1. Predição de epítomos de células T e sua afinidade aos alelos mais frequentes da casuística do estudo

Inicialmente, a primeira análise de predição teve o objetivo de determinar quais eram os epítomos que possuíam alta afinidade aos alelos de HLA –A, –B e –C mais frequentes da casuística do estudo e que estavam presentes em pelo menos 95% das amostras analisadas. Como explicado na metodologia (vide tópico 4.15.1), os alelos mais frequentes no Rio de Janeiro foram HLA-A\*02:01, HLA-A\*30:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*15:03, HLA-B\*44:03, HLA-C\*04:01 e HLA-C\*07:02 e os alelos mais frequentes em Rio Grande foram HLA-A\*01:01, HLA-A\*02:01, HLA-B\*07:02, HLA-B\*08:01, HLA-B\*14:02, HLA-B\*51:01, HLA-C\*04:01 e HLA-C\*07:02. O resultado dessa predição pode ser observado na Tabela 5.4.

Para a região viral de Gag das amostras do RJ, 43 amostras foram analisadas e a ferramenta de predição encontrou 685 epítomos com alta afinidade (*percentil rank* até 1%). Entre os 685 epítomos, o mais frequente era o RTLNAWVKV, que estava presente em 100% das amostras. Para a região viral de Pol do RJ, 39 amostras foram analisadas e foram encontrados 1306 epítomos com alta afinidade. Entre os 1306 epítomos, 13 estavam presentes nas 39 amostras (100%). Com isso, foram selecionados apenas os epítomos que possuíam um maior número de predições, sendo 117 predições para o epítopo HQKEPPFLW e 78 predições para os epítomos KHQKEPPFL, TQDFWEVQL e VLDVGDAYF. Já para a região viral de Pol de RS, 27 amostras foram analisadas e 874 epítomos com alta afinidade foram encontrados. Desses, 8 epítomos estavam presentes em todas as amostras (100%). Novamente foram selecionados os epítomos que apresentaram maiores números de predições, sendo eles os epítomos KHQKEPPFL, TQDFWEVQL e VLDVGDAYF, os três com 81 predições.

Tabela 5.4: Epítomos selecionados a partir da predição de epítomos de células T aos alelos de HLA mais frequentes da população do estudo. Os epítomos são referentes às regiões genômicas virais de Gag e Pol das amostras do Rio de Janeiro-RJ e Rio Grande-RS.

Região	Nº de amostras analisadas	Nº de epítomos com alta afinidade <sup>1</sup>	Epítomo mais frequente <sup>2</sup> (frequência; n)	Posição relativa ao HXB2
Gag-RJ	43	685	RTLNAWVKV (100%; 43)	150-158
Pol-RJ	39	1306	HQKEPPFLW (100%; 39)	374-382
			KHQKEPPFL (100%; 39)	373-381
			TQDFWEVQL (100%; 39)	237-245
			VLDVGDAYF (100%; 39)	261-269
Pol-RS	27	874	KHQKEPPFL (100%; 27)	373-381
			TQDFWEVQL (100%; 27)	237-245
			VLDVGDAYF (100%; 27)	261-269

<sup>1</sup>Percentil rank até 1%; <sup>2</sup>Presente em mais de 95% das amostras analisadas; RJ: Rio de Janeiro – RJ; RS: Rio Grande – RS.

Em relação as outras regiões genômicas, foram encontrados 774 epítomos com alta afinidade em Vif-RJ, 477 em Nef-RJ, 398 em Gag-RS, 386 em Vif-RS e 312 em Nef-RS (Tabela 5.5). Contudo, todos esses epítomos estavam presentes em menos de 95% das amostras analisadas e, por isso, não foram selecionados para a análise seguinte.

Tabela 5.5: Predição de epítomos de células T aos alelos de HLA mais frequentes da população do estudo. Os epítomos referentes às regiões genômicas virais Vif-RJ, Nef-RJ, Gag-RS, Vif-RS e Nef-RS não foram selecionados por não estarem presentes em, no mínimo, 95% das amostras analisadas.

Região	Nº de amostras analisadas	Nº de epítomos com alta afinidade <sup>1</sup>
Vif-RJ	45	774
Nef-RJ	44	477
Gag-RS	23	398
Vif-RS	40	386
Nef-RS	32	312

<sup>1</sup>Percentil rank até 1%; RJ: Rio de Janeiro – RJ; RS: Rio Grande – RS.

### 5.5.2. Afinidade dos epítomos selecionados aos alelos específicos dos pacientes

Para a segunda etapa da predição, os epítomos selecionados na etapa anterior foram submetidos à ferramenta de predição para avaliar se ele também apresentava alta afinidade aos seis alelos específicos (dois HLA-A, dois HLA-B e dois HLA-C) de cada uma das amostras do estudo. Os epítomos selecionados nas amostras do RJ foram os RTLNAWVKV (Gag), HQKEPPFLW (Pol), KHQKEPPFL (Pol), TQDFWEVQL (Pol) e VLDVGDAYF (Pol). Já os epítomos selecionados nas amostras de RS foram os KHQKEPPFL (Pol), TQDFWEVQL (Pol) e VLDVGDAYF (Pol).

Quarenta e seis amostras do RJ foram incluídas no estudo. Contudo, não havia informação sobre a tipagem de HLA de duas amostras. Desse modo, as análises de predição aos alelos específicos foram realizadas para 44 amostras do RJ. Pode-se observar na Tabela 5.6 que, para o epítopo RTLNAWVKV (Gag-RJ), nenhuma amostra apresentou alta afinidade a três alelos ou mais. Para o epítopo HQKEPPFLW (Pol-RJ), 22 amostras apresentaram alta afinidade a, no mínimo, três alelos. Para os epítomos KHQKEPPFL (Pol-RJ), TQDFWEVQL (Pol-RJ) e VLDVGDAYF (Pol-RJ), duas, nove e cinco amostras, respectivamente, apresentaram alta afinidade a, pelo menos, três alelos específicos.

Tabela 5.6: Predição da afinidade dos epítomos selecionados aos seis alelos de HLA específicos das 44 amostras do Rio de Janeiro.

Epítomos	Quantidade de amostras que possuem alelos com alta afinidade <sup>1</sup>						
	6 alelos	5 alelos	4 alelos	3 alelos	2 alelos	1 alelo	0 alelos
RTLNAWVKV_Gag-RJ	0	0	0	0	1	10	33
HQKEPPFLW_Pol-RJ	0	3	7	12	8	10	4
KHQKEPPFL_Pol-RJ	0	0	0	2	13	14	15
TQDFWEVQL_Pol-RJ	0	1	1	7	13	14	8
VLDVGDAYF_Pol-RJ	0	0	0	5	13	16	10

<sup>1</sup>Percentil rank até 1%; RJ: Rio de Janeiro – RJ.

Para Rio Grande, todas as 40 amostras possuíam informação sobre sua tipagem. Sendo assim, todas as amostras foram utilizadas na análise de predição de afinidade aos alelos específicos. Pode-se observar na Tabela 5.7 que três amostras apresentaram três alelos com alta afinidade ao epítopo KHQKEPPFL (Pol-RS). Já

para os epítomos TQDFWEVQL (Pol-RS) e VLDVGDAYF (Pol-RS), nove e três amostras, respectivamente, apresentaram, no mínimo, três alelos específicos com alta afinidade.

Tabela 5.7: Predição da afinidade dos epítomos selecionados aos seis alelos de HLA específicos das 40 amostras de Rio Grande.

Epítomos	Quantidade de amostras que possuem alelos com alta afinidade <sup>1</sup>						
	6 alelos	5 alelos	4 alelos	3 alelos	2 alelos	1 alelo	0 alelos
KHQKEPPFL_Pol-RS	0	0	0	3	9	20	8
TQDFWEVQL_Pol-RS	0	0	0	9	13	11	7
VLDVGDAYF_Pol-RS	0	0	1	2	12	19	6

<sup>1</sup>Percentil rank até 1%; RS: Rio Grande – RS.



## 6. DISCUSSÃO

Apesar dos benefícios da utilização do tratamento antirretroviral, a sua expansão acarretou no aumento de vírus resistentes aos antirretrovirais. Além disso, o tratamento necessita de um alto investimento financeiro anual, deve ser utilizado de forma crônica e pode apresentar efeitos colaterais. Pensando nisso, o nosso estudo identificou as mutações de resistência aos antirretrovirais, inclusive as mutações minoritárias, presentes nos provírus arquivados de pacientes que possuem carga viral indetectável (sucesso terapêutico) e, através de uma metodologia de amplificação do genoma proviral quase completo, também determinamos o subtipo viral das amostras. Além disso, identificamos os epítomos provirais que possuem alta afinidade aos alelos de HLA de classe I mais frequentes nos pacientes incluídos no estudo, de duas localidades brasileiras diferentes, de modo que novas estratégias de combate ao HIV possam ser desenvolvidas, como essa prova de conceito para o desenvolvimento de uma vacina terapêutica.

De acordo com o último relatório da UNAIDS (2020), 36 milhões de pessoas acima de 15 anos viviam com HIV no ano de 2019 no mundo, sendo que mais da metade (19 milhões; 53%) dessas pessoas eram mulheres. Diferente do cenário mundial, o Brasil mostrou uma razão de homem e mulher infectados por HIV de 2,6 (M:F) em 2019, ou seja, 26 homens para cada 10 mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Seguindo as estimativas da UNAIDS, o nosso estudo também não apresenta uma diferença expressiva no predomínio de sexo, pois 57% (49/86) dos pacientes incluídos no estudo são do sexo masculino. Contudo, ao analisar as duas regiões do estudo separadamente, pôde-se observar que 73,9% (34/46) dos pacientes do Rio de Janeiro eram homens, enquanto apenas 37,5% (15/40) dos pacientes de Rio Grande eram do sexo masculino. Desse modo, o presente estudo não apresenta as estimativas nacionais pelo fato de Rio Grande ter apresentado uma predominância do sexo feminino (62,5%; 25/40). Ao observar as estimativas do estado do Rio Grande do Sul é visto que, até o ano de 2013, a razão de sexos era de 7 casos em homens para cada 10 mulheres. A partir de 2013 esse cenário começou a mudar e, em 2018, a razão de sexos era de 1,5 (M:F) (GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 2020). Os pacientes do HU-FURG foram incluídos no estudo no ano de 2017 e sua mediana de tempo de diagnóstico, no momento de sua inclusão, era de 4,8 anos (IQR<sub>50</sub> 2,4 – 10,6). Dessa forma, o predomínio do sexo feminino nessa região pode ser atribuído ao tempo de diagnóstico dos pacientes.

Uma das estratégias no combate ao HIV é o tratamento como prevenção (TasP, do inglês: *treatment as prevention*), que tem a finalidade de iniciar o tratamento o mais rapidamente possível após o diagnóstico do indivíduo. Desse modo, espera-se que o intervalo entre o diagnóstico e o início do tratamento seja cada vez menor. Essa relação de menor intervalo entre o diagnóstico e início do tratamento pode ser observada nos pacientes incluídos no nosso estudo. Os pacientes do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) possuem uma mediana de tempo de diagnóstico de 13,3 anos, valor maior que os apresentados pelos pacientes do Hospital Federal de Ipanema (HI) e do Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior (HU-FURG), que possuem um diagnóstico mais recente, com mediana de tempo de 4,4 e 4,8 anos, respectivamente. Conseqüentemente, a mediana para o início do tratamento dos pacientes do HUCFF (1,7 anos) é maior do que a mediana encontrada nos pacientes do HI (1,1 anos) e do HU-FURG (0,9 anos). Desse modo, é visto que os pacientes que tiveram acesso ao tratamento mais rápido são aqueles que possuem diagnóstico mais recente. Estudos mostram que o início precoce do tratamento é benéfico para o paciente, uma vez que diminui a morbidade, mortalidade, progressão para a aids e o risco de transmissão pela via sexual (GULICK *ET AL.*, 1997; HAMMER *ET AL.*, 1997; PALELLA *ET AL.*, 1998; HIRSCH *ET AL.*, 2008; THE LANCET, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019B).

Uma grande parcela dos pacientes incluídos no estudo relatou que a via de transmissão para a infecção foi a sexual (84,9%; 73/86). Estimativas brasileiras também mostram um predomínio da transmissão pela via sexual tanto para homens (79,3%) quanto para mulheres (87,3%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Em relação ao esquema terapêutico, 19 combinações diferentes de antirretrovirais são utilizadas pelos pacientes. Contudo, pode-se observar que a combinação predominante (55,8%; 48/86) é a composta por tenofovir, lamivudina e efavirenz (TDF+3TC+EFV). Até o ano de 2016, essa combinação era a primeira linha de tratamento recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Entretanto, a partir de 2017, o Ministério da Saúde passou a recomendar que a primeira linha de tratamento fosse composta por tenofovir, lamivudina e dolutegravir (TDF+3TC+DTG) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Essa substituição de EFV para DTG se dá pelas vantagens apresentadas pelo DTG, como alta barreira genética, administração em dose única diária e poucos eventos adversos (CAHN *ET AL.*, 2013; RAFFI *ET AL.*, 2013; CASTAGNA *ET AL.*, 2014). Sendo assim, o tempo de tratamento (medianas de 3,1 (HI), 9,3 (HUCFF) e 3,8 (HU-FURG)

anos) dos pacientes da nossa casuística corrobora a recomendação vigente na época. Como nenhum paciente iniciou o tratamento depois de 2017, nenhum deles utiliza o esquema recomendado atualmente, que é composto por TDF+3TC+DTG.

O grupo M do HIV-1 é o responsável pela epidemia de HIV e apresenta diferentes padrões de distribuição de seus subtipos pelo mundo. Hemelaar e colaboradores (2019) mostraram que, entre 2010 a 2015, o subtipo predominante no mundo era o C (46,6%), seguido pelo subtipo B (12,1%) e pelo subtipo A (10,2%). Em contrapartida, ao observar apenas a América Latina, é visto que o subtipo B é predominante. Estudos mostram que o Brasil segue o mesmo padrão da América Latina e apresenta um predomínio do subtipo B na maioria de suas regiões, seguido pela ascensão dos subtipos não-B, como F1, C e recombinantes (BRIGIDO *ET AL.*, 2005; PEDROSO *ET AL.*, 2007; CARDOSO *ET AL.*, 2009; MACHADO *ET AL.*, 2009; MONTEIRO-CUNHA *ET AL.*, 2011). Entretanto, a região Sul do Brasil apresenta um padrão diferente, sendo o subtipo C o predominante, seguido pelo subtipo B e pelos recombinantes (CARDOSO *ET AL.*, 2009; DIAS *ET AL.*, 2009; MACHADO *ET AL.*, 2009; PASSAES *ET AL.*, 2009). Como era esperado, a maior parte das nossas amostras do Rio de Janeiro (região Sudeste) pertencem ao subtipo B (78,3%; 36/46), enquanto a maior parte das amostras de Rio Grande (região Sul) pertencem ao subtipo C (67,5%; 27/40). Das 86 amostras incluídas no estudo, 17 (19,8%) eram formas recombinantes únicas (URF). Nenhuma forma recombinante circulante (CRF) foi encontrada. As formas recombinantes predominantes foram URF\_BF1 (10,5%; 9/17), seguido por URF\_BC (4,6%; 4/17). Vale ressaltar que encontramos duas amostras que são o resultado de recombinação entre três subtipos, sendo elas URF\_BCF1 (2,3%).

Quase 20% das amostras incluídas no nosso estudo foram classificadas como formas recombinantes entre, pelo menos, dois subtipos. Outros estudos mostraram uma prevalência menor de recombinação, que varia de 1,8% a 11,63% (DE LUCA *ET AL.*, 2013; VENNER *ET AL.*, 2016; RODGERS *ET AL.*, 2017; SAHBANDAR *ET AL.*, 2017; OMONDI *ET AL.*, 2019; LEAL *ET AL.*, 2020). Contudo, todos esses estudos citados não utilizam uma metodologia de sequenciamento do genoma quase completo (NFLG). Eles realizam a determinação do subtipo viral a partir do genoma parcial, muitas vezes apenas utilizando as sequências de *gag*, *pol* ou *env*. O estudo brasileiro realizado por LEAL *ET AL.*, 2020 determinou o subtipo de 633 amostras utilizando somente a região genômica viral *pol*, tendo encontrado apenas 66 (10,4%) recombinantes. A utilização do sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitou

um aumento exponencial na quantidade de informação genética em um menor período de tempo, com um menor custo por sequência e também permitiu o sequenciamento paralelo de diferentes regiões-alvo, o que facilitou a obtenção do genoma completo das amostras. Desse modo, associado ao uso do NGS, nosso estudo utilizou uma metodologia de amplificação do genoma proviral quase completo, o que pode explicar o motivo de termos encontrado uma maior prevalência de recombinantes.

As amostras 17-HI e 20-FURG passaram duas vezes pela etapa de sequenciamento. Na primeira vez, a amostra 17-HI teve seus fragmentos A e D sequenciados (gene *gag* e gene *env* parcial) e a amostra 20-FURG teve os fragmentos B e C sequenciados (gene *pol* e gene *env* parcial). De acordo com esse primeiro sequenciamento, a amostra 17-HI foi classificada como subtipo B e a amostra 20-FURG como URF\_BC. Contudo, ao conseguir amplificar os demais fragmentos dessas amostras (B e C da 17-HI; A e D da 20-FURG), elas foram novamente sequenciadas e passaram a ter o genoma proviral quase completo. Com isso, a análise de subtipagem foi realizada novamente, agora com todas as regiões genômicas virais, e constatou-se que, na verdade, o subtipo da amostra 17-HI é um recombinante URF\_BF1 e o subtipo da amostra 20-FURG é uma recombinação entre três subtipos, URF\_BCF1. Desse modo, evidencia-se a importância desse tipo de metodologia, que permite uma classificação fidedigna do subtipo viral.

O nosso estudo também avaliou a presença e frequência das mutações de resistência aos antirretrovirais nos provírus arquivados das 86 amostras incluídas no estudo. A procura de mutações de resistência no DNA proviral arquivado é de suma importância para a literatura, visto que a maioria dos estudos apenas avaliam as mutações encontradas nos vírus circulantes presentes no plasma sanguíneo (DUDLEY *ET AL.*, 2014; ADAWAYE *ET AL.*, 2017; CHEHADEH *ET AL.*, 2017; EPAULARD *ET AL.*, 2017; SAHBANDAR *ET AL.*, 2017; DAT *ET AL.*, 2018; WILHELMSON *ET AL.*, 2018; TAKOU *ET AL.*, 2019; FOKAM *ET AL.*, 2020; LEAL *ET AL.*, 2020). Um estudo realizado por ZACCARELLI *ET AL.*, 2016 identificou as mutações de resistência aos antirretrovirais presentes nas PBMCs e as comparou com as mutações encontradas nos testes de resistência genotípica de plasma sanguíneo desses mesmos pacientes. Os autores mostraram que, em 20,1% das amostras, as mutações de resistência foram detectadas apenas nas PBMCs e não nos testes de resistência genotípica de plasma realizados anteriormente, indicando que mais atenção deve ser dedicada às mutações presentes no reservatório proviral. Além disso, o nosso estudo possui uma

casuística composta por pacientes que estão em sucesso terapêutico. O monitoramento de mutações de resistência em populações que possuem a carga viral indetectável também é importante, uma vez que normalmente essas mutações só são pesquisadas em um cenário de falha terapêutica (DUDLEY *ET AL.*, 2014; KARADE *ET AL.*, 2016; KYEYUNE *ET AL.*, 2016; ADAWAYE *ET AL.*, 2017; TAKOU *ET AL.*, 2019; GUPTA-WRIGHT *ET AL.*, 2020; PATIL *ET AL.*, 2020). Um estudo realizado por Corado e colaboradores (2017) no Brasil mostrou que 63% dos pacientes com carga viral indetectável carregavam mutações de resistência, evidenciando a importância do monitoramento dessas mutações em pacientes que estão em sucesso terapêutico.

As regiões genômicas protease, transcriptase reversa, integrase e envelope são conhecidas por abrigarem as mutações de resistência aos antirretrovirais. Das 86 amostras incluídas no estudo, 72 (83,7%) tiveram todas essas regiões analisadas, enquanto as outras 14 amostras tiveram, pelo menos, uma dessas quatro regiões analisadas. Dessas 14 amostras, sete tiveram uma região analisada, duas tiveram duas regiões analisadas e cinco amostras tiveram três regiões analisadas. No total, 168 mutações capazes de conferir resistência a algum medicamento foram encontradas em 63 (73,3%) amostras. Para essa análise foi delimitada a frequência mínima de 1% na detecção de variantes de nucleotídeos, uma vez que frequências abaixo de 1% podiam estar relacionadas com erros durante o sequenciamento.

Os testes padrões de resistência genotípica são realizados através do sequenciamento de Sanger (GIBSON *ET AL.*, 2017; MACHNOWSKA *ET AL.*, 2019; TELELE *ET AL.*, 2019; ZHAO *ET AL.*, 2020). Esse sequenciamento é capaz de detectar apenas as variantes que possuem frequência acima de 20% na população viral. Por outro lado, o NGS, por possuir uma maior sensibilidade, consegue detectar uma faixa maior de variantes. Sendo assim, o NGS também é capaz de detectar as variantes minoritárias, que são aquelas que possuem frequência abaixo de 20% na população viral. Um estudo realizado por ARIAS *ET AL.*, 2018 comparou as metodologias de Sanger e NGS na detecção de mutação de resistência aos antirretrovirais e observou que as duas técnicas possuem uma alta correlação na detecção das variantes com frequência acima de 20%. Contudo, apenas a técnica de NGS foi capaz de detectar as variantes minoritárias. Outro estudo, realizado por PARKIN *ET AL.*, 2020, comparou as sequências resultantes do sequenciamento de Sanger com as sequências resultantes do NGS. Cabe destacar que a plataforma de NGS utilizada por Parkin e colaboradores (2020) foi a MiSeq da Illumina, que é a mesma

utilizada no nosso estudo. Os autores observaram que as duas metodologias apresentavam uma excelente concordância quando se utilizava o limite de detecção de variante de 20%. Entretanto, ao diminuir esse limite para 15%, 10% e 5%, diferenças significativas foram encontradas. Outros estudos também realizaram comparações e concluíram que a técnica de NGS é mais sensível, mais eficaz e possui um custo mais baixo por sequência do que a técnica de Sanger (PALMER *ET AL.*, 2005; MOHAMED *ET AL.*, 2014; TZOU *ET AL.*, 2018; AVILA-RIOS *ET AL.*, 2020). Dessa forma, a alta quantidade de mutações minoritárias (62,5%; 105/168) encontrada em nosso estudo está relacionada com a sensibilidade da técnica de sequenciamento que utilizamos.

Em relação à classe de antirretroviral que as mutações eram capazes de conferir resistência, foi visto uma dominância de mutações que poderiam conferir resistência à classe dos inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (INTR) (28%; 47/168), dos inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (INNTR) (27,4%; 46/168) e dos inibidores de protease (IP) (22%; 37/168). O esquema terapêutico utilizado pela maior parte dos pacientes no estudo (55,8%; 48/86) era composto por tenofovir, lamivudina e efavirenz, que fazem parte das classes INTR, INTR e INNTR, respectivamente. Além disso, 24 (27,9%) pacientes faziam uso de medicamentos da classe dos IPs. Dessa forma, a predominância de mutações de resistência a essas classes pode estar relacionada com as pressões seletivas provocadas pelas medicações utilizadas pelos pacientes.

Dezoito amostras (1-HI, 22-HI, 30-HI, 32-HI, 2-HUCFF, 9-HUCFF, 5-FURG, 9-FURG, 11-FURG, 12-FURG, 13-FURG, 19-FURG, 20-FURG, 27-FURG, 29-FURG, 32-FURG, 34-FURG e 38-FURG) apresentaram a mutação M184I/V. Essa mutação é capaz de conferir alto nível de resistência ao medicamento 3TC e todos esses pacientes utilizavam essa medicação. Contudo, essa mutação possuía frequência acima de 20% apenas em sete pacientes (variação de 20,1% a 99,9%). Além disso, cinco pacientes (2-FURG, 7-FURG, 10-FURG, 15-FURG, 33-FURG) apresentaram a mutação K65R, que é capaz de conferir alto nível de resistência ao TDF, medicamento utilizado por esses pacientes. Nesse caso, todas essas mutações eram minoritárias (variação de 1% a 7,7%). A mutação G190E (alto nível de resistência ao EFV) foi encontrada nas amostras 11-FURG e 15-FURG e a mutação N88S (alto nível de resistência ao ATV/r) foi encontrada na amostra 5-HUCFF. Esses três pacientes utilizavam a medicação que a mutação podia causar resistência e, nos três casos, essas mutações também eram minoritárias (variação

de 3,7% a 14,9%). As outras mutações encontradas no nosso estudo eram capazes de causar resistência intermediária ou baixa ou apenas reduzir a susceptibilidade ao antirretroviral.

As amostras 28-HI e 9-FURG possuíam cinco e quatro mutações que eram capazes de interferir no seu tratamento, respectivamente. Das cinco mutações encontradas no paciente 28-HI, quatro eram TAMs (mutações dos análogos da timidina, do inglês: *thymidine analog mutations*) e, em conjunto, podiam diminuir a susceptibilidade ao TDF. Três TAMs possuíam frequência maior que 20% (D67N – 41%; K70R – 41,8%; M41L – 99,9%), enquanto uma TAM era minoritária (T215Y – 13,7%). A quinta mutação encontrada na amostra 28-HI era a E399D (frequência 93,2%), que é capaz de reduzir a susceptibilidade ao EFV. O paciente 28-HI faz uso das medicações TDF e EFV. Em relação ao paciente 9-FURG, das quatro mutações encontradas, apenas uma possuía frequência maior que 20% (frequência 37,2%), as outras tiveram uma variação de 1,1% a 15,8%. Essas mutações podem causar baixo nível de resistência ao EFV, resistência intermediária ao AZT e alto nível de resistência ao 3TC e, esses três medicamentos, compõem o esquema terapêutico do paciente 9-FURG (AZT+3TC+EFV).

Apesar das variadas mutações encontradas e seus variados graus de resistência, todos os pacientes estavam em sucesso terapêutico no momento da sua inclusão no estudo. O estudo de Dalmat e colaboradores (2018) observou que, apesar das mutações de resistência encontradas, todas as falhas virológicas na sua coorte estavam relacionadas com a baixa adesão ao tratamento. Durante o recrutamento dos nossos pacientes, todos relataram boa adesão, o que pode estar associado com a alta taxa de sucesso terapêutico que possuímos. Além disso, o esquema terapêutico dos pacientes é composto por três antirretrovirais. Logo, mesmo que haja alguma resistência a um determinado medicamento, as outras duas drogas continuam sendo capazes de controlar a replicação viral, contribuindo para a continuidade do sucesso do tratamento.

Devido a técnica de sequenciamento utilizada, um pouco mais da metade das mutações que podem interferir no tratamento dos nossos pacientes são mutações minoritárias (55,9%; 38/68). Estudos indicam que a presença de variantes minoritárias com resistência à classe dos INNTRs aumenta o risco de falha terapêutica a essa classe (HALVAS *ET AL.*, 2010; LI *ET AL.*, 2012; COZZI-LEPRI *ET AL.*, 2015; NISHIZAWA *ET AL.*, 2015). Em contrapartida, os impactos que as mutações minoritárias podem causar às outras classes de antirretrovirais ainda é incerto.

Alguns estudos indicam que as mutações minoritárias estão relacionadas com a falha terapêutica, enquanto outros estudos não mostram essa correlação (HALVAS *ET AL.*, 2010; STEKLER *ET AL.*, 2011; LI *ET AL.*, 2012; LI E KURITZKES, 2013; CHARPENTIER *ET AL.*, 2015; COZZI-LEPRI *ET AL.*, 2015; NISHIZAWA *ET AL.*, 2015; KYEYUNE *ET AL.*, 2016; STELLA-ASCARIZ *ET AL.*, 2017).

As mutações encontradas em pacientes que foram infectados por um vírus já resistente a algum antirretroviral são chamadas de mutações de resistência à droga transmitida (TDRM). Das 168 mutações encontradas na nossa casuística, 41 (24,4%) eram TDRMs e estavam presentes em 25 (29,1%; 25/86) pacientes. Estudos mostram uma prevalência menor de TDRMs, com variação de 13,5% a 19,2% (PANICHSILLAPAKIT *ET AL.*, 2016; FERREIRA *ET AL.*, 2017; RHEE *ET AL.*, 2019; TANAKA *ET AL.*, 2019). Um estudo realizado por Moscona e colaboradores (2017) comparou as metodologias de NGS e Sanger na detecção de TDRMs e observou que, através do NGS, foi possível detectar TDRMs em 31,3% dos pacientes, enquanto através do Sanger foi possível detectá-las em apenas 8,8% pacientes. Das 41 TDRMs encontradas no nosso estudo, 30 (73,2%) tinham frequência abaixo de 20%. Desse modo, a maior prevalência de TDRMs encontrada no nosso estudo está relacionada à técnica de NGS utilizada.

Muitos estudos que tentam desenvolver uma vacina terapêutica utilizam epítopos genéricos baseados em sequências-referência do HIV (VARDAS *ET AL.*, 2012; BOFFITO *ET AL.*, 2013; RODRIGUEZ *ET AL.*, 2013; ENSOLI *ET AL.*, 2016). Contudo, em um cenário de sucesso terapêutico, a origem da replicação viral durante a interrupção do tratamento é muito provavelmente o provírus arquivado. Com isso, foi pensado que os epítopos provirais poderiam ser diferentes dos epítopos genéricos baseados em sequências-referência. Estudos mostraram que os epítopos genéricos são diferentes dos epítopos arquivados e possuem um efeito vacinal menos eficiente, propondo que os epítopos utilizados em vacinas terapêuticas deveriam ser determinados a partir do DNA proviral integrado e ter alta afinidade aos alelos de HLA dos próprios pacientes (PAPUCHON *ET AL.*, 2013; PAPUCHON *ET AL.*, 2014). Entretanto, o desenvolvimento de vacinas terapêuticas personalizadas representa uma dificuldade do ponto de vista de escalonamento industrial, uma vez que diversas sequências imunogênicas individuais deveriam ser criadas. Frente a esse contexto, o projeto Provir/Latitude 45 foi criado, tendo o objetivo de determinar os epítopos provirais de HIV conservados apresentados pelos alelos de HLAs de classe I mais frequentes em pacientes com sucesso de tratamento, visando o



desenvolvimento de uma sequência imunogênica mais universalmente utilizável (TUMIOTTO *ET AL.*, 2019). O presente estudo faz parte do projeto Provir/Latitude 45, e um de nossos objetivos é a identificação de epítomos provirais conservados que tenham alta afinidade aos alelos de HLA de classe I clássicos mais frequentes em duas cidades brasileiras, Rio de Janeiro – RJ e Rio Grande – RS.

Para a determinação dos epítomos provirais, quatro regiões genômicas do HIV foram analisadas, *gag*, *pol*, *vif* e *nef*. Essas regiões são conhecidas por desencadear respostas das células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> e por serem regiões conservadas (MOTHE *ET AL.*, 2011; BOFFITO *ET AL.*, 2013). Além disso, com base nas recomendações do IEDB, nós utilizamos o ponto de corte de *percentil rank*  $\leq 1\%$  para distinguir os epítomos com alta afinidade (<https://help.iedb.org/hc/en-us/articles/114094151811>, acessado em 05 de junho de 2021). Desse modo, no nosso estudo, os epítomos considerados de alta afinidade aos alelos de HLA possuem *percentil rank* menor ou igual a 1%.

Nós avaliamos as quatro regiões genômicas virais e encontramos oito epítomos que mostraram alta afinidade aos HLAs mais frequentes da nossa casuística e que estavam presentes em mais de 95% das amostras analisadas, sendo cinco epítomos do Rio de Janeiro e três de Rio Grande. Os epítomos selecionados nos pacientes do Rio de Janeiro e suas respectivas regiões genômicas são: RTLNAWVKV (*gag*), HQKEPPFLW (*pol*), KHQKEPPFL (*pol*), TQDFWEVQL (*pol*) e VLDVGDAYF (*pol*). Já os epítomos selecionados nos pacientes de Rio Grande são: KHQKEPPFL (*pol*), TQDFWEVQL (*pol*) e VLDVGDAYF (*pol*). Vale ressaltar que os epítomos KHQKEPPFL (*pol*), TQDFWEVQL (*pol*) e VLDVGDAYF (*pol*) foram selecionados tanto no Rio de Janeiro quanto em Rio Grande. Apesar de terem sido encontrados epítomos com alta afinidade nas outras regiões genômicas (*vif*-RJ, *nef*-RJ, *gag*-RS, *vif*-RS e *nef*-RS), eles não foram selecionados porque estavam presentes em menos de 95% das amostras analisadas. Outro ponto interessante a respeito dos epítomos selecionados, é a sobreposição entre os epítomos HQKEPPFLW e KHQKEPPFL da região *pol* das amostras do Rio de Janeiro, que possuem a posição relativa ao HXB2 374-382 e 373-381, respectivamente.

Ao verificar se os oito epítomos selecionados possuíam alta afinidade aos seis alelos de HLA específicos de cada amostra incluída no estudo, nós observamos que 33 amostras não tiveram nenhum alelo que apresentasse alta afinidade ao epítomo RTLNAWVKV (*gag*-RJ); dez e uma amostra apresentaram um e dois alelos,

respectivamente, com alta afinidade ao epítopo RTLNAWVKV (*gag*-RJ). Para os outros epítopos do RJ, 22 amostras apresentaram pelo menos três alelos com alta afinidade ao epítopo HQKEPPFLW (*pol*-RJ), e duas, nove e cinco amostras apresentaram, no mínimo, três alelos com alta afinidade aos epítopos KHQKEPPFL (*pol*-RJ), TQDFWEVQL (*pol*-RJ) e VLDVGDAYF (*pol*-RJ), respectivamente. Quanto aos epítopos do RS, três, nove e três amostras possuíam pelo menos três alelos com alta afinidade aos epítopos KHQKEPPFL (*pol*-RS), TQDFWEVQL (*pol*-RS) e VLDVGDAYF (*pol*-RS), respectivamente.

Os alelos de HLA específicos de 33 amostras do RJ não apresentaram alta afinidade ao epítopo RTLNAWVKV (*gag*). Contudo, ao verificar a afinidade dos alelos dessas 33 amostras aos outros epítopos selecionados, foi visto que essas amostras apresentavam pelo menos um alelo específico com alta afinidade a outro epítopo selecionado no RJ. Por exemplo, os seis alelos específicos da amostra 14-HUCFF não apresentaram alta afinidade ao epítopo RTLNAWVKV (*gag*). Porém, três alelos específicos dessa mesma amostra apresentaram alta afinidade ao epítopo HQKEPPFLW (*pol*). Além disso, dois, cinco e dois alelos específicos da amostra 14-HUCFF também apresentaram alta afinidade aos epítopos KHQKEPPFL (*pol*), TQDFWEVQL (*pol*) e VLDVGDAYF\_(*pol*), respectivamente. Esse padrão se repetiu para os alelos de todas as outras amostras que não apresentaram alta afinidade a algum epítopo. Ao realizar essa mesma análise nas amostras do RS, foi visto que os seis alelos específicos de apenas uma amostra (39-FURG) não apresentaram afinidade a nenhum epítopo selecionado nessa região. Já as outras amostras apresentaram pelo menos um alelo com alta afinidade a algum epítopo selecionado no RS, como é o caso da amostra 35-FURG. Os seis alelos específicos da amostra 35-FURG não apresentaram alta afinidade ao epítopo KHQKEPPFL (*pol*). Por outro lado, dois alelos dessa amostra apresentaram alta afinidade ao epítopo TQDFWEVQL\_(*pol*) e dois alelos também apresentaram alta afinidade ao epítopo VLDVGDAYF\_(*pol*). Dessa forma, evidencia-se a importância do desenvolvimento de vacinas que contenham mais de um epítopo, de modo que seja possível obter ligações epítopo-HLA com alta afinidade.

A base de dados do *Los Alamos Immunology Database* (disponível em [https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/ctl\\_search.html](https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/ctl_search.html)) fornece uma lista de epítopos de CTLs do HIV já definidos. Ao pesquisar os nossos epítopos nessa base de dados, quando selecionamos a opção “*results exactly match query sequence*”, vimos que os epítopos RTLNAWVKV e HQKEPPFLW já estão descritos, enquanto

nenhum resultado foi encontrado para os epítomos KHQKEPPFL, TQDFWEVQL e VLDVGDAYF. Em contrapartida, quando selecionamos a opção “*results contain query sequence*”, aparecem resultados de epítomos que contém a sequência de aminoácidos KHQKEPPFL e VLDVGDAYF; já para o epítomo TQDFWEVQL, nenhum resultado foi encontrado novamente.

Uma preocupação na determinação de epítomos provenientes dos provírus arquivados é a variabilidade dos epítomos provirais observada em diferentes reservatórios, uma vez que diferentes compartimentos poderiam apresentar diferentes epítomos. O tecido linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês: *gut-associated lymphoid tissue*) é considerado um dos principais reservatórios do HIV (CHUN *ET AL.*, 2008; ESTES *ET AL.*, 2017). Pensando nisso, um estudo realizado por Recordon-Pinson e colaboradores (2021) comparou o DNA proviral no sangue com o DNA proviral no GALT. Esse estudo observou que o provírus no GALT é muito semelhante ao provírus encontrado no sangue, indicando que os resultados encontrados para os provírus do sangue podem ser extrapolados para os outros reservatórios virais. Outro problema ao determinarmos epítomos a partir do provírus arquivado é que não diferenciamos os provírus não infecciosos dos provírus competentes para a replicação. No entanto, um estudo realizado por Pollack e colaboradores (2017) mostrou que os provírus defeituosos podem ser expressos e também podem produzir proteínas virais que são reconhecidas pelos linfócitos T citotóxicos.

Entre as limitações encontradas no nosso estudo, podemos destacar a quantidade de pacientes recrutados. Por avaliarmos uma população mais restrita e por possuímos critérios de inclusão mais rígidos, não conseguimos construir uma grande casuística. Outro fator limitante foi a dificuldade de amplificação das diferentes regiões genômicas virais por PCR. Essa dificuldade pode ser atribuída ao fato de amplificarmos os provírus arquivados de amostras que possuem carga viral indetectável. Além disso, todas as nossas reações de PCR são feitas em duplicata, o que limita a quantidade de regiões virais elegíveis para o sequenciamento, já que às vezes apenas conseguíamos uma reação positiva. Diante desse cenário, sugerimos que outros estudos, utilizando nossa metodologia e base teórica, sejam desenvolvidos com o objetivo de confirmar e complementar os nossos resultados.

O nosso estudo se destaca por analisar o provírus arquivado de pacientes que possuem carga viral indetectável, uma casuística ainda pouco abordada na literatura e muito importante para compreender os empecilhos envolvidos na

continuação do sucesso do tratamento. Ao utilizar uma metodologia de amplificação do genoma proviral quase completo, nós conseguimos determinar o subtipo viral fidedigno, contribuindo para o enriquecimento dos dados epidemiológicos brasileiros. Além disso, atribuído ao uso do NGS, conseguimos determinar as mutações minoritárias que são capazes de conferir resistência aos antirretrovirais, o que contribui para o entendimento da influência dessas variantes nos pacientes que se encontram em sucesso terapêutico e na sustentabilidade de tal tratamento. Por fim, a determinação dos epítomos provirais com alta afinidade aos alelos de HLA de classe I mais frequentes do Rio de Janeiro e Rio Grande contribui para o avanço de estudos que almejam desenvolver vacinas terapêuticas contra o HIV-1, onde não seria necessária a utilização diária dos medicamentos antirretrovirais, o que, conseqüentemente, melhoraria a qualidade de vida das pessoas que vivem com HIV.

## 7. CONCLUSÕES

- A partir das diferentes estratégias de amplificação por PCR, foi possível determinar o genoma proviral quase completo (NFLG) de 69/86 (80,2%) amostras provenientes do Rio de Janeiro - RJ (n = 46) e de Rio Grande - RS (n = 40);
- Como era esperado nas duas regiões brasileiras do estudo, encontramos uma predominância do subtipo B no RJ (78,3%; 36/46) e uma predominância do subtipo C no RS (67,5%; 27/40). Além disso, encontramos uma alta prevalência de subtipos recombinantes (19,8%; 17/86);
- As 86 amostras incluídas no estudo foram utilizadas na detecção de mutações de resistência aos antirretrovirais, o que nos possibilitou encontrar 168 mutações em 63 (73,3%) amostras. No entanto, a maior parte dessas mutações (62,5%; 105/168) eram variantes minoritárias. Também encontramos uma alta prevalência de TDRMs (mutações de resistência à droga transmitida) (24,4%; 41/168);
- Entre as 168 mutações de resistência encontradas, 68 (40,5%) eram capazes de conferir algum grau de resistência a, pelo menos, um medicamento utilizado por 42 pacientes. Apesar da presença dessas mutações, todos os pacientes estavam em sucesso terapêutico (carga viral indetectável) e todos relataram boa adesão ao tratamento, o que pode estar associado à alta taxa de sucesso terapêutico no nosso estudo;
- Os nossos achados referentes à presença e frequência das mutações de resistência ressaltam a relevância de testes mais sensíveis na determinação de variantes, uma vez que o surgimento de vírus resistentes aos medicamentos pode representar um obstáculo para a continuidade do sucesso do tratamento;
- Em um cenário de interrupção do tratamento em pacientes com carga viral indetectável, a origem da replicação viral será provavelmente o provírus arquivado. Dessa forma, foram selecionados cinco epítopos provirais das regiões genômicas *gag* e *pol* das amostras do Rio de Janeiro e três epítopos provirais da região genômica *pol* das amostras de Rio Grande, que possuíam alta afinidade aos alelos de HLA –A, –B e –C mais frequentes da casuística e que estavam presentes em pelo menos 95% dos pacientes do RJ e RS;

- Os epítomos selecionados foram RTLNAWVKV (*gag*-RJ), HQKEPPFLW\_(*pol*-RJ), KHQKEPPFL\_(*pol*-RJ), TQDFWEVQL\_(*pol*-RJ), VLDVGDAYF\_(*pol*-RJ), KHQKEPPFL\_(*pol*-RS), TQDFWEVQL\_(*pol*-RS) e VLDVGDAYF\_(*pol*-RS).
- A análise de predição aos alelos específicos mostrou que, apesar de algumas amostras não possuírem alelos com alta afinidade a determinados epítomos, elas apresentavam, ao menos, um alelo com alta afinidade a outro epítomo selecionado;
- Os nossos resultados referentes à predição de epítomos de células T contribuirão para o avanço de estudos no desenvolvimento de vacinas terapêuticas baseadas em epítomos de provírus arquivados com alta afinidade aos alelos de HLA.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. *ET AL.* **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: 2015.

ABDOOL KARIM, Q. *ET AL.* **Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women**. 2010. *Science*. 329 (5996): 1168-1174.

ADAWAYE, C. *ET AL.* **Virological response, HIV-1 drug resistance mutations and genetic diversity among patients on first-line antiretroviral therapy in N'Djamena, Chad: findings from a cross-sectional study**. 2017. *BMC research notes*. 10 (1): 589.

ALLARD, M. *ET AL.* **Soluble HLA-I/peptide monomers mediate antigen-specific CD8 T cell activation through passive peptide exchange with cell-bound HLA-I molecules**. 2014. *Journal of immunology*. 192 (11): 5090-5097.

APPS, R. *ET AL.* **Influence of HLA-C expression level on HIV control**. 2013. *Science*. 340 (6128): 87-91.

ARIAS, A. *ET AL.* **Sanger and Next Generation Sequencing Approaches to Evaluate HIV-1 Virus in Blood Compartments**. 2018. *International journal of environmental research and public health*. 15 (8):

AUVERT, B. *ET AL.* **Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: the ANRS 1265 Trial**. 2005. *PLoS medicine*. 2 (11): e298.

AVILA-RIOS, S. *ET AL.* **Next-Generation Sequencing for HIV Drug Resistance Testing: Laboratory, Clinical, and Implementation Considerations**. 2020. *Viruses*. 12 (6):

BACHMANN, N. *ET AL.* **Importance of routine viral load monitoring: higher levels of resistance at ART failure in Uganda and Lesotho compared with Switzerland**. 2019. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 74 (2): 468-472.

BANIN, A. N. *ET AL.* **Development of a Versatile, Near Full Genome Amplification and Sequencing Approach for a Broad Variety of HIV-1 Group M Variants**. 2019. *Viruses*. 11 (4):

BARRE-SINOSSI, F. *ET AL.* **Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)**. 1983. *Science*. 220 (4599): 868-871.

BAVINTON, B. R. *ET AL.* **Viral suppression and HIV transmission in serodiscordant male couples: an international, prospective, observational, cohort study**. 2018. *The Lancet HIV*. 5 (8): e438-e447.

BEKKER, L.-G. *ET AL.* **Subtype C ALVAC-HIV and bivalent subtype C gp120/MF59 HIV-1 vaccine in low-risk, HIV-uninfected, South African adults: a phase 1/2 trial**. 2018. *The Lancet HIV*. 5 (7): e366-e378.

- BENNETT, D. E. *ET AL.* **Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update.** 2009. *PloS one.* 4 (3): e4724.
- BLAIS, M. E. *ET AL.* **HLA-C as a mediator of natural killer and T-cell activation: spectator or key player?** 2011. *Immunology.* 133 (1): 1-7.
- BLANCHARD, N. *ET AL.* **Endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing defines the composition and structure of MHC class I peptide repertoire in normal and virus-infected cells.** 2010. *Journal of immunology.* 184 (6): 3033-3042.
- BOFFITO, M. *ET AL.* **Safety, immunogenicity and efficacy assessment of HIV immunotherapy in a multi-centre, double-blind, randomised, Placebo-controlled Phase Ib human trial.** 2013. *Vaccine.* 31 (48): 5680-5686.
- BOWERMAN, B. *ET AL.* **A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA.** 1989. *Genes & development.* 3 (4): 469-478.
- BREHM, J. H. *ET AL.* **Selection of mutations in the connection and RNase H domains of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase that increase resistance to 3'-azido-3'-dideoxythymidine.** 2007. *Journal of virology.* 81 (15): 7852-7859.
- BRENCHLEY, J. M. *ET AL.* **CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.** 2004. *The Journal of experimental medicine.* 200 (6): 749-759.
- BRIGIDO, L. F. *ET AL.* **Molecular characteristics of HIV type 1 circulating in Sao Paulo, Brazil.** 2005. *AIDS research and human retroviruses.* 21 (7): 673-682.
- BUCHBINDER, S. P. *ET AL.* **Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial.** 2008. *The Lancet.* 372 (9653): 1881-1893.
- CAHN, P. *ET AL.* **Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study.** 2013. *The Lancet.* 382 (9893): 700-708.
- CARDOSO, L. P. *ET AL.* **HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil.** 2009. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 46 (2): 134-139.
- CARRINGTON, M. *ET AL.* **HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage.** 1999. *Science.* 283 (5408): 1748-1752.
- CARRINGTON, M. E O'BRIEN, S. J. **The influence of HLA genotype on AIDS.** 2003. *Annual review of medicine.* 54 535-551.
- CARRINGTON, M. E WALKER, B. D. **Immunogenetics of spontaneous control of HIV.** 2012. *Annual review of medicine.* 63 131-145.



- CASADO, C. *ET AL.* **Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression.** 2010. PloS one. 5 (6): e11079.
- CASTAGNA, A. *ET AL.* **Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study.** 2014. The Journal of infectious diseases. 210 (3): 354-362.
- CENTER, R. J. **Memory B Cells, the HLA-B\*57 Allele and Natural Control of HIV Infection.** 2017. EBioMedicine. 21 47-48.
- CENTERS FOR DISEASE, C. E PREVENTION. **Revised surveillance case definition for HIV infection--United States, 2014.** 2014. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports. 63 (RR-03): 1-10.
- CHARPENTIER, C. *ET AL.* **Highly frequent HIV-1 minority resistant variants at baseline of the ANRS 139 TRIO trial had a limited impact on virological response.** 2015. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 70 (7): 2090-2096.
- CHEHADEH, W. *ET AL.* **Resistance-Associated Mutations and Polymorphisms among Integrase Inhibitor-Naive HIV-1 Patients in Kuwait.** 2017. Intervirology. 60 (4): 131-137.
- CHEN, Y. *ET AL.* **Influence of HLA alleles on the rate of progression of vertically transmitted HIV infection in children: association of several HLA-DR13 alleles with long-term survivorship and the potential association of HLA-A\*2301 with rapid progression to AIDS. Long-Term Survivor Study.** 1997. Human immunology. 55 (2): 154-162.
- CHOO, S. Y. **The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications.** 2007. Yonsei medical journal. 48 (1): 11-23.
- CHUN, T. W. *ET AL.* **Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy.** 2008. The Journal of infectious diseases. 197 (5): 714-720.
- CLAAS, F. H. E DUQUESNOY, R. J. **The polymorphic alloimmune response in clinical transplantation.** 2008. Current opinion in immunology. 20 (5): 566-567.
- COFFIN, J. *ET AL.* **Human immunodeficiency viruses.** 1986a. Science. 232 (4751): 697.
- COFFIN, J. *ET AL.* **What to call the AIDS virus?** 1986b. Nature. 321 (6065): 10.
- COFFIN, J. E SWANSTROM, R. **HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells.** 2013. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 3 (1): a012526.
- COFFIN, J. M. *ET AL.* **Retroviruses.** New York: 1997.
- COHEN, M. S. *ET AL.* **Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission.** 2016. The New England journal of medicine. 375 (9): 830-839.

- COHEN, M. S. *ET AL.* **Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy.** 2011. The New England journal of medicine. 365 (6): 493-505.
- COHN, L. B. *ET AL.* **The Biology of the HIV-1 Latent Reservoir and Implications for Cure Strategies.** 2020. Cell host & microbe. 27 (4): 519-530.
- COLLABORATION, H.-C. *ET AL.* **The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals.** 2010. Aids. 24 (1): 123-137.
- CONNOR, E. M. *ET AL.* **Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group.** 1994. The New England journal of medicine. 331 (18): 1173-1180.
- CORADO, A. L. *ET AL.* **HIV-1 genetic diversity and antiretroviral drug resistance among individuals from Roraima state, northern Brazil.** 2017. PloS one. 12 (3): e0173894.
- COSMA, A. *ET AL.* **Enhanced HIV infectivity and changes in GP120 conformation associated with viral incorporation of human leucocyte antigen class I molecules.** 1999. Aids. 13 (15): 2033-2042.
- COST ACTION FA1005. **The Impact of Food Bio-Actives on Gut Health: In Vitro and Ex Vivo Models.** Cham (CH): 2015.
- COWAN, M. J. *ET AL.* **Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome.** 1984. Pediatrics. 73 (3): 382-386.
- COZZI-LEPRI, A. *ET AL.* **Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing.** 2015. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 70 (3): 930-940.
- CRUX, N. B. E ELAHI, S. **Human Leukocyte Antigen (HLA) and Immune Regulation: How Do Classical and Non-Classical HLA Alleles Modulate Immune Response to Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus Infections?** 2017. Frontiers in immunology. 8 832.
- D'ARC, M. *ET AL.* **Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas.** 2015. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 112 (11): E1343-1352.
- DALGLEISH, A. G. *ET AL.* **The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.** 1984. Nature. 312 (5996): 763-767.
- DALMAT, R. R. *ET AL.* **Limited Marginal Utility of Deep Sequencing for HIV Drug Resistance Testing in the Age of Integrase Inhibitors.** 2018. Journal of clinical microbiology. 56 (12):
- DAT, V. Q. *ET AL.* **Viral load suppression and acquired HIV drug resistance in adults receiving antiretroviral therapy in Viet Nam: results from a nationally representative survey.** 2018. Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR. 9 (3): 16-24.

DAU, B. *ET AL.* **Connection domain mutations in treatment-experienced patients in the OPTIMA trial.** 2010. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 54 (2): 160-166.

DAUSSET, J. [**Iso-leuko-antibodies**]. 1958. Acta haematologica. 20 (1-4): 156-166.

DAVEY, R. T., JR. *ET AL.* **HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression.** 1999. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96 (26): 15109-15114.

DE GOEDE, A. L. *ET AL.* **Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part I: Epidemiology and pathogenesis of HIV infection.** 2015a. Annales pharmaceutiques francaises. 73 (2): 87-99.

DE GOEDE, A. L. *ET AL.* **Understanding HIV infection for the design of a therapeutic vaccine. Part II: Vaccination strategies for HIV.** 2015b. Annales pharmaceutiques francaises. 73 (3): 169-179.

DE LUCA, A. *ET AL.* **Declining prevalence of HIV-1 drug resistance in antiretroviral treatment-exposed individuals in Western Europe.** 2013. The Journal of infectious diseases. 207 (8): 1216-1220.

DEEKS, S. G. E WALKER, B. D. **Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy.** 2007. Immunity. 27 (3): 406-416.

DELAUGERRE, C. *ET AL.* **HIV-1 group N: travelling beyond Cameroon.** 2011. The Lancet. 378 (9806): 1894.

DELVIKS-FRANKENBERRY, K. A. *ET AL.* **Subtype-specific differences in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase connection subdomain of CRF01\_AE are associated with higher levels of resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine.** 2009. Journal of virology. 83 (17): 8502-8513.

DELVIKS-FRANKENBERRY, K. A. *ET AL.* **The "Connection" Between HIV Drug Resistance and RNase H.** 2010. Viruses. 2 (7): 1476-1503.

DES JARLAIS, D. C. *ET AL.* **Risk Reduction for the Acquired Immunodeficiency Syndrome Among Intravenous Drug Users.** 1986. Journal of Urology. 136 (5): 1161-1162.

DIAS, C. F. *ET AL.* **High prevalence and association of HIV-1 non-B subtype with specific sexual transmission risk among antiretroviral naive patients in Porto Alegre, RS, Brazil.** 2009. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 51 (4): 191-196.

DUDLEY, D. M. *ET AL.* **Cross-clade simultaneous HIV drug resistance genotyping for reverse transcriptase, protease, and integrase inhibitor mutations by Illumina MiSeq.** 2014. Retrovirology. 11 122.

- ELAHI, S. *ET AL.* **Protective HIV-specific CD8+ T cells evade Treg cell suppression.** 2011. *Nature medicine.* 17 (8): 989-995.
- ENSOLI, B. *ET AL.* **Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention.** 2014. *Frontiers in immunology.* 5 417.
- ENSOLI, B. *ET AL.* **The therapeutic phase I trial of the recombinant native HIV-1 Tat protein.** 2008. *Aids.* 22 (16): 2207-2209.
- ENSOLI, B. *ET AL.* **HIV-Tat immunization induces cross-clade neutralizing antibodies and CD4(+) T cell increases in antiretroviral-treated South African volunteers: a randomized phase II clinical trial.** 2016. *Retrovirology.* 13 (1): 34.
- ENSOLI, F. *ET AL.* **HIV-1 Tat immunization restores immune homeostasis and attacks the HAART-resistant blood HIV DNA: results of a randomized phase II exploratory clinical trial.** 2015. *Retrovirology.* 12 33.
- EPAULARD, O. *ET AL.* **Ultradeep sequencing of B and non-B HIV-1 subtypes: Viral diversity and drug resistance mutations before and after one month of antiretroviral therapy in naive patients.** 2017. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 95 13-19.
- ESTES, J. D. *ET AL.* **Defining total-body AIDS-virus burden with implications for curative strategies.** 2017. *Nature medicine.* 23 (11): 1271-1276.
- FELLAY, J. *ET AL.* **Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans.** 2009. *PLoS genetics.* 5 (12): e1000791.
- FELLAY, J. *ET AL.* **A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1.** 2007. *Science.* 317 (5840): 944-947.
- FENG, Y. *ET AL.* **HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.** 1996. *Science.* 272 (5263): 872-877.
- FERNANDO, M. M. *ET AL.* **Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis.** 2008. *PLoS genetics.* 4 (4): e1000024.
- FERREIRA, A. C. G. *ET AL.* **Transmitted drug resistance in patients with acute/recent HIV infection in Brazil.** 2017. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases.* 21 (4): 396-401.
- FISCHER, U. *ET AL.* **The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs.** 1995. *Cell.* 82 (3): 475-483.
- FISCHL, M. A. *ET AL.* **The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial.** 1987. *The New England journal of medicine.* 317 (4): 185-191.
- FOKAM, J. *ET AL.* **Pre-treatment drug resistance and HIV-1 genetic diversity in the rural and urban settings of Northwest-Cameroon.** 2020. *PloS one.* 15 (7): e0235958.

GAO, F. *ET AL.* **Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*.** 1999. *Nature*. 397 (6718): 436-441.

GAO, X. *ET AL.* **HLA-B alleles associate consistently with HIV heterosexual transmission, viral load, and progression to AIDS, but not susceptibility to infection.** 2010. *Aids*. 24 (12): 1835-1840.

GARTNER, S. *ET AL.* **Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS.** 1986. *Jama*. 256 (17): 2365-2371.

GIBSON, R. M. *ET AL.* **Sensitive detection of HIV-1 resistance to Zidovudine and impact on treatment outcomes in low- to middle-income countries.** 2017. *Infectious diseases of poverty*. 6 (1): 163.

GOTO, T. *ET AL.* **Projection structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) observed with high resolution electron cryo-microscopy.** 1994. *Journal of electron microscopy*. 43 (1): 16-19.

GOTTLIEB, M. S. *ET AL.* **Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.** 1981. *The New England journal of medicine*. 305 (24): 1425-1431.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. **Boletim Epidemiológico HIV e AIDS.** Rio de Janeiro, 2018.

GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS e Sífilis.** Porto Alegre, 2020.

GRANT, R. M. *ET AL.* **Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men.** 2010. *The New England journal of medicine*. 363 (27): 2587-2599.

GRAY, G. E. *ET AL.* **Safety and efficacy of the HVTN 503/Phambili Study of a clade-B-based HIV-1 vaccine in South Africa: a double-blind, randomised, placebo-controlled test-of-concept phase 2b study.** 2011. *The Lancet Infectious Diseases*. 11 (7): 507-515.

GREGSON, J. *ET AL.* **Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study.** 2016. *The Lancet Infectious Diseases*. 16 (5): 565-575.

GRUMBT, B. *ET AL.* **Diagnostic applications of next generation sequencing in immunogenetics and molecular oncology.** 2013. *Transfusion medicine and hemotherapy* : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie. 40 (3): 196-206.

GULICK, R. M. *ET AL.* **Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy.** 1997. *The New England journal of medicine*. 337 (11): 734-739.

GUPTA-WRIGHT, A. *ET AL.* **Virological failure, HIV-1 drug resistance, and early mortality in adults admitted to hospital in Malawi: an observational cohort study.** 2020. *The Lancet HIV.* 7 (9): e620-e628.

GUPTA, R. K. *ET AL.* **Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis.** 2009. *The Lancet. Infectious diseases.* 9 (7): 409-417.

GUPTA, R. K. *ET AL.* **Evidence for HIV-1 cure after CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation 30 months post analytical treatment interruption: a case report.** 2020. *The Lancet HIV.* 7 (5): e340-e347.

GUPTA, S. *ET AL.* **Connection domain mutations in HIV-1 reverse transcriptase do not impact etravirine susceptibility and virologic responses to etravirine-containing regimens.** 2011. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 55 (6): 2872-2879.

GURTLER, L. G. *ET AL.* **A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon.** 1994. *Journal of virology.* 68 (3): 1581-1585.

HALVAS, E. K. *ET AL.* **Low frequency nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in treatment-experienced patients.** 2010. *The Journal of infectious diseases.* 201 (5): 672-680.

HAMMER, S. M. *ET AL.* **A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team.** 1997. *The New England journal of medicine.* 337 (11): 725-733.

HANSEN, J. *ET AL.* **Identification and characterization of HIV-specific RNase H by monoclonal antibody.** 1988. *The EMBO journal.* 7 (1): 239-243.

HEINZINGER, N. K. *ET AL.* **The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells.** 1994. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 91 (15): 7311-7315.

HEMELAAR, J. *ET AL.* **Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis.** 2019. *The Lancet Infectious Diseases.* 19 (2): 143-155.

HIRSCH, M. S. *ET AL.* **Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an International AIDS Society-USA panel.** 2008. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 47 (2): 266-285.

HIVROZ, C. *ET AL.* **Crosstalk between T lymphocytes and dendritic cells.** 2012. *Critical reviews in immunology.* 32 (2): 139-155.

- HORTON, H. *ET AL.* **Preservation of T cell proliferation restricted by protective HLA alleles is critical for immune control of HIV-1 infection.** 2006. *Journal of immunology.* 177 (10): 7406-7415.
- HUTTER, G. *ET AL.* **Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation.** 2009. *The New England journal of medicine.* 360 (7): 692-698.
- HUY, N. T. *ET AL.* **Association of HLA and post-schistosomal hepatic disorder: a systematic review and meta-analysis.** 2011. *Parasitology international.* 60 (4): 347-356.
- INTERNATIONAL, H. I. V. C. S. *ET AL.* **The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation.** 2010. *Science.* 330 (6010): 1551-1557.
- JANEWAY, C. A. *ET AL.* **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.** 5th ed. New York: 2001.
- JONES, K. A. E PETERLIN, B. M. **Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter.** 1994. *Annual review of biochemistry.* 63 717-743.
- KAPLAN, A. H. *ET AL.* **The activity of the protease of human immunodeficiency virus type 1 is initiated at the membrane of infected cells before the release of viral proteins and is required for release to occur with maximum efficiency.** 1994. *Journal of virology.* 68 (10): 6782-6786.
- KARADE, S. K. *ET AL.* **Cross-sectional study of virological failure and multinucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance at 12 months of antiretroviral therapy in Western India.** 2016. *Medicine.* 95 (37): e4886.
- KEELE, B. F. *ET AL.* **Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1.** 2006. *Science.* 313 (5786): 523-526.
- KLEIN, J. E SATO, A. **The HLA system. First of two parts.** 2000. *The New England journal of medicine.* 343 (10): 702-709.
- KLIGER, Y. E SHAI, Y. **A leucine zipper-like sequence from the cytoplasmic tail of the HIV-1 envelope glycoprotein binds and perturbs lipid bilayers.** 1997. *Biochemistry.* 36 (17): 5157-5169.
- KOEHLER, R. N. *ET AL.* **Class I HLA-A\*7401 is associated with protection from HIV-1 acquisition and disease progression in Mbeya, Tanzania.** 2010. *The Journal of infectious diseases.* 202 (10): 1562-1566.
- KORBER, B. *ET AL.* **Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation.** 2001. *British medical bulletin.* 58 19-42.
- KOSMRLJ, A. *ET AL.* **Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection.** 2010. *Nature.* 465 (7296): 350-354.
- KYEYUNE, F. *ET AL.* **Low-Frequency Drug Resistance in HIV-Infected Ugandans on Antiretroviral Treatment Is Associated with Regimen Failure.** 2016. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 60 (6): 3380-3397.

LAHER, F. *ET AL.* **Safety and immune responses after a 12-month booster in healthy HIV-uninfected adults in HVTN 100 in South Africa: A randomized double-blind placebo-controlled trial of ALVAC-HIV (vCP2438) and bivalent subtype C gp120/MF59 vaccines.** 2020. PLoS medicine. 17 (2): e1003038.

LEAL, E. *ET AL.* **Characterization of HIV-1 genetic diversity and antiretroviral resistance in the state of Maranhao, Northeast Brazil.** 2020. PloS one. 15 (3): e0230878.

LENGRUBER, R. B. *ET AL.* **Phenotypic characterization of drug resistance-associated mutations in HIV-1 RT connection and RNase H domains and their correlation with thymidine analogue mutations.** 2011. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 66 (4): 702-708.

LEVY, J. A. *ET AL.* **Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.** 1984. Science. 225 (4664): 840-842.

LI, J. Z. E KURITZKES, D. R. **Clinical implications of HIV-1 minority variants.** 2013. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 56 (11): 1667-1674.

LI, J. Z. *ET AL.* **Relationship between minority nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutations, adherence, and the risk of virologic failure.** 2012. Aids. 26 (2): 185-192.

LIU, C. *ET AL.* **HIV-1 functional cure: will the dream come true?** 2015. BMC medicine. 13 284.

LOCATELLI, S. E PEETERS, M. **Cross-species transmission of simian retroviruses: how and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population.** 2012. Aids. 26 (6): 659-673.

MACDONALD, K. S. *ET AL.* **Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection.** 2000. The Journal of infectious diseases. 181 (5): 1581-1589.

MACHADO, L. F. *ET AL.* **Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02\_AG in the Amazon region of Brazil.** 2009. AIDS research and human retroviruses. 25 (10): 961-966.

MACHNOWSKA, P. *ET AL.* **Prevalence and persistence of transmitted drug resistance mutations in the German HIV-1 Seroconverter Study Cohort.** 2019. PloS one. 14 (1): e0209605.

MADDEN, D. R. **The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes.** 1995. Annual review of immunology. 13 587-622.

MARCUS, J. L. *ET AL.* **Comparison of Overall and Comorbidity-Free Life Expectancy Between Insured Adults With and Without HIV Infection, 2000-2016.** 2020. JAMA network open. 3 (6): e207954.



- MARTIN, M. P. E CARRINGTON, M. **Immunogenetics of viral infections**. 2005. Current opinion in immunology. 17 (5): 510-516.
- MASSIAH, M. A. *ET AL.* **Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: evidence for conformational changes during viral assembly**. 1996. Protein science : a publication of the Protein Society. 5 (12): 2391-2398.
- MATUCCI, A. *ET AL.* **HLA-C increases HIV-1 infectivity and is associated with gp120**. 2008. Retrovirology. 5 68.
- MCMICHAEL, A. J. *ET AL.* **The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development**. 2010. Nature reviews. Immunology. 10 (1): 11-23.
- MIGUELES, S. A. *ET AL.* **HLA B\*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors**. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97 (6): 2709-2714.
- MILLER, M. D. *ET AL.* **Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition**. 1997. Journal of virology. 71 (7): 5382-5390.
- MILNER, C. M. E CAMPBELL, R. D. **Structure and expression of the three MHC-linked HSP70 genes**. 1990. Immunogenetics. 32 (4): 242-251.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Prevenção Combinada do HIV: bases conceituais para profissionais, trabalhadores(as) e gestores(as) de saúde**. Brasília, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, 2018.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids**. Brasília, 2019a.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **NOTA INFORMATIVA Nº 5/2019-.DIAHV/SVS/MS**. Brasília, 2019b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids**. Brasília, 2020.
- MITSUYA, H. *ET AL.* **3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro**. 1985. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 82 (20): 7096-7100.
- MOHAMED, S. *ET AL.* **Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure**. 2014. Aids. 28 (9): 1315-1324.
- MONTEIRO-CUNHA, J. P. *ET AL.* **Lack of high-level resistance mutations in HIV type 1 BF recombinant strains circulating in northeast Brazil**. 2011. AIDS research and human retroviruses. 27 (6): 623-631.
- MOSCONA, R. *ET AL.* **Comparison between next-generation and Sanger-based sequencing for the detection of transmitted drug-resistance mutations among**

- recently infected HIV-1 patients in Israel, 2000-2014.** 2017. Journal of the International AIDS Society. 20 (1): 21846.
- MOTHE, B. *ET AL.* **Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses.** 2011. Journal of translational medicine. 9 208.
- MUNGALL, A. J. *ET AL.* **The DNA sequence and analysis of human chromosome 6.** 2003. Nature. 425 (6960): 805-811.
- MUNKANTA, M. *ET AL.* **HLA-B polymorphism in Japanese HIV-1-infected long-term surviving hemophiliacs.** 2005. Viral immunology. 18 (3): 500-505.
- NEEFJES, J. *ET AL.* **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** 2011. Nature reviews. Immunology. 11 (12): 823-836.
- NISHIZAWA, M. *ET AL.* **Longitudinal Detection and Persistence of Minority Drug-Resistant Populations and Their Effect on Salvage Therapy.** 2015. PloS one. 10 (9): e0135941.
- NORMAN, P. J. *ET AL.* **Sequences of 95 human MHC haplotypes reveal extreme coding variation in genes other than highly polymorphic HLA class I and II.** 2017. Genome research. 27 (5): 813-823.
- O'CALLAGHAN, C. A. E BELL, J. I. **Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G.** 1998. Immunological reviews. 163 129-138.
- ODE, H. *ET AL.* **Quasispecies Analyses of the HIV-1 Near-full-length Genome With Illumina MiSeq.** 2015. Frontiers in microbiology. 6 1258.
- OMONDI, F. H. *ET AL.* **HIV Subtype and Nef-Mediated Immune Evasion Function Correlate with Viral Reservoir Size in Early-Treated Individuals.** 2019. Journal of virology. 93 (6):
- PALELLA, F. J., JR. *ET AL.* **Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators.** 1998. The New England journal of medicine. 338 (13): 853-860.
- PALMER, S. *ET AL.* **Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis.** 2005. Journal of clinical microbiology. 43 (1): 406-413.
- PANICHSILLAPAKIT, T. *ET AL.* **Prevalence of Transmitted HIV Drug Resistance Among Recently Infected Persons in San Diego, CA 1996-2013.** 2016. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 71 (2): 228-236.
- PANTALEO, G. E FAUCI, A. S. **Immunopathogenesis of HIV infection.** 1996. Annual review of microbiology. 50 825-854.
- PANTALEO, G. *ET AL.* **The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.** 1993. The New England journal of medicine. 328 (5): 327-335.

- PAPUCHON, J. *ET AL.* **Kinetics of HIV-1 CTL epitopes recognized by HLA I alleles in HIV-infected individuals at times near primary infection: the Provir/Latitude45 study.** 2014. PloS one. 9 (6): e100452.
- PAPUCHON, J. *ET AL.* **Resistance mutations and CTL epitopes in archived HIV-1 DNA of patients on antiviral treatment: toward a new concept of vaccine.** 2013. PloS one. 8 (7): e69029.
- PARCEJ, D. E TAMPE, R. **ABC proteins in antigen translocation and viral inhibition.** 2010. Nature chemical biology. 6 (8): 572-580.
- PAREDES, R. *ET AL.* **A376S in the Connection Subdomain of HIV-1 Reverse Transcriptase Confers Increased Risk of Virological Failure to Nevirapine Therapy.** 2011. The Journal of infectious diseases. 204 (5): 741-752.
- PARKIN, N. T. *ET AL.* **Multi-Laboratory Comparison of Next-Generation to Sanger-Based Sequencing for HIV-1 Drug Resistance Genotyping.** 2020. Viruses. 12 (7):
- PASSAES, C. P. *ET AL.* **Genetic characterization of HIV-1 BC recombinants and evolutionary history of the CRF31\_BC in Southern Brazil.** 2009. Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 9 (4): 474-482.
- PATIL, A. *ET AL.* **HIV-1 pol gene diversity and molecular dating of subtype C from Sri Lanka.** 2020. PloS one. 15 (6): e0234133.
- PEDROSO, C. *ET AL.* **High prevalence of primary antiretroviral resistance among HIV-1-infected adults and children in Bahia, a northeast state of Brazil.** 2007. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 45 (2): 251-253.
- PEETERS, M. *ET AL.* **Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient.** 1999. Journal of virology. 73 (9): 7368-7375.
- PERELSON, A. S. E RIBEIRO, R. M. **Modeling the within-host dynamics of HIV infection.** 2013. BMC biology. 11 96.
- PLANTIER, J. C. *ET AL.* **A new human immunodeficiency virus derived from gorillas.** 2009. Nature medicine. 15 (8): 871-872.
- POLLACK, R. A. *ET AL.* **Defective HIV-1 Proviruses Are Expressed and Can Be Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes, which Shape the Proviral Landscape.** 2017. Cell host & microbe. 21 (4): 494-506 e494.
- POLLARD, R. B. *ET AL.* **Safety and efficacy of the peptide-based therapeutic vaccine for HIV-1, Vacc-4x: a phase 2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial.** 2014. The Lancet Infectious Diseases. 14 (4): 291-300.
- POMERANTZ, R. J. E HORN, D. L. **Twenty years of therapy for HIV-1 infection.** 2003. Nature medicine. 9 (7): 867-873.

POPOVIC, M. *ET AL.* **Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.** 1984. *Science*. 224 (4648): 497-500.

RAFFI, F. *ET AL.* **Once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-naive adults with HIV-1 infection (SPRING-2 study): 96 week results from a randomised, double-blind, non-inferiority trial.** 2013. *The Lancet Infectious Diseases*. 13 (11): 927-935.

RECORDON-PINSON, P. *ET AL.* **Phylogenetic analysis of HIV-1 archived DNA in blood and gut-associated lymphoid tissue in two patients under antiretroviral therapy.** 2021. *Gut pathogens*. 13 (1): 20.

RERKS-NGARM, S. *ET AL.* **Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand.** 2009. *The New England journal of medicine*. 361 (23): 2209-2220.

RHEE, S. Y. *ET AL.* **Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance in a Large US Clinic Population.** 2019. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 68 (2): 213-221.

RIBAS-SILVA, R. C. *ET AL.* **Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of Southern Brazil.** 2013. *BMC infectious diseases*. 13 198.

ROBERTS, J. D. *ET AL.* **The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.** 1988. *Science*. 242 (4882): 1171-1173.

ROBERTSON, D. L. *ET AL.* **HIV-1 nomenclature proposal.** 2000. *Science*. 288 (5463): 55-56.

RODGER, A. J. *ET AL.* **Risk of HIV transmission through condomless sex in serodifferent gay couples with the HIV-positive partner taking suppressive antiretroviral therapy (PARTNER): final results of a multicentre, prospective, observational study.** 2019. *The Lancet*. 393 (10189): 2428-2438.

RODGER, A. J. *ET AL.* **Sexual Activity Without Condoms and Risk of HIV Transmission in Serodifferent Couples When the HIV-Positive Partner Is Using Suppressive Antiretroviral Therapy.** 2016. *Jama*. 316 (2): 171-181.

RODGERS, M. A. *ET AL.* **Sensitive Next-Generation Sequencing Method Reveals Deep Genetic Diversity of HIV-1 in the Democratic Republic of the Congo.** 2017. *Journal of virology*. 91 (6):

RODRIGUEZ, B. *ET AL.* **Safety, tolerability, and immunogenicity of repeated doses of dermavir, a candidate therapeutic HIV vaccine, in HIV-infected patients receiving combination antiretroviral therapy: results of the ACTG 5176 trial.** 2013. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 64 (4): 351-359.

ROQUES, P. *ET AL.* **Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N.** 2004. *Aids*. 18 (10): 1371-1381.

- ROUSSEAU, C. M. *ET AL.* **Extensive intrasubtype recombination in South African human immunodeficiency virus type 1 subtype C infections.** 2007. *Journal of virology.* 81 (9): 4492-4500.
- SAHBANDAR, I. N. *ET AL.* **Ultra-Deep Sequencing Analysis on HIV Drug-Resistance-Associated Mutations Among HIV-Infected Individuals: First Report from the Philippines.** 2017. *AIDS research and human retroviruses.* 33 (11): 1099-1106.
- SAKHNO, L. V. *ET AL.* **Impairments of Antigen-Presenting Cells in Pulmonary Tuberculosis.** 2015. *Journal of immunology research.* 2015 793292.
- SAKSENA, N. K. *ET AL.* **Elite HIV controllers: myth or reality?** 2007. *AIDS reviews.* 9 (4): 195-207.
- SANABANI, S. *ET AL.* **Full-length genome analysis of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in Brazil.** 2006. *AIDS research and human retroviruses.* 22 (2): 171-176.
- SANCHEZ-PESCADOR, R. *ET AL.* **Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2).** 1985. *Science.* 227 (4686): 484-492.
- SANTOS, A. F. *ET AL.* **Conservation patterns of HIV-1 RT connection and RNase H domains: identification of new mutations in NRTI-treated patients.** 2008. *PLoS one.* 3 (3): e1781.
- SARGENT, C. A. *ET AL.* **Identification of multiple HTF-island associated genes in the human major histocompatibility complex class III region.** 1989. *The EMBO journal.* 8 (8): 2305-2312.
- SATTENTAU, Q. J. *ET AL.* **Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding.** 1993. *Journal of virology.* 67 (12): 7383-7393.
- SAUER, M. E. *ET AL.* **Genetics of leprosy: Expected-and unexpected-developments and perspectives.** 2016. *Clinics in dermatology.* 34 (1): 96-104.
- SCHACKMAN, B. R. *ET AL.* **The lifetime medical cost savings from preventing HIV in the United States.** 2015. *Medical care.* 53 (4): 293-301.
- SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO RIO GRANDE DO SUL. **Boletim Epidemiológico HIV/AIDS.** Porto Alegre, 2019.
- SERENA, M. *ET AL.* **HIV-1 Env associates with HLA-C free-chains at the cell membrane modulating viral infectivity.** 2017. *Scientific reports.* 7 40037.
- SHARP, P. M. E HAHN, B. H. **Origins of HIV and the AIDS pandemic.** 2011. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 1 (1): a006841.
- SHIINA, T. *ET AL.* **An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004.** 2004. *Tissue antigens.* 64 (6): 631-649.

SIJTS, E. J. E KLOETZEL, P. M. **The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses.** 2011. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 68 (9): 1491-1502.

SIMON, F. *ET AL.* **Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O.** 1998. Nature medicine. 4 (9): 1032-1037.

SMITH, D. K. *ET AL.* **Antiretroviral postexposure prophylaxis after sexual, injection-drug use, or other nonoccupational exposure to HIV in the United States: recommendations from the U.S. Department of Health and Human Services.** 2005. MMWR. Recommendations and reports : Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports. 54 (RR-2): 1-20.

SPIRA, A. I. *ET AL.* **Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques.** 1996. The Journal of experimental medicine. 183 (1): 215-225.

STEKLER, J. D. *ET AL.* **Prevalence and impact of minority variant drug resistance mutations in primary HIV-1 infection.** 2011. PloS one. 6 (12): e28952.

STELLA-ASCARIZ, N. *ET AL.* **The Role of HIV-1 Drug-Resistant Minority Variants in Treatment Failure.** 2017. The Journal of infectious diseases. 216 (suppl\_9): S847-S850.

TAKOU, D. *ET AL.* **HIV-1 drug resistance testing is essential for heavily-treated patients switching from first- to second-line regimens in resource-limited settings: evidence from routine clinical practice in Cameroon.** 2019. BMC infectious diseases. 19 (1): 246.

TANAKA, T. S. O. *ET AL.* **HIV-1 Molecular Epidemiology, Transmission Clusters and Transmitted Drug Resistance Mutations in Central Brazil.** 2019. Frontiers in microbiology. 10 20.

TANG, J. *ET AL.* **HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection.** 1999. AIDS research and human retroviruses. 15 (4): 317-324.

TANG, J. *ET AL.* **Human leukocyte antigens and HIV type 1 viral load in early and chronic infection: predominance of evolving relationships.** 2010. PloS one. 5 (3): e9629.

TELELE, N. F. *ET AL.* **A viral genome wide association study and genotypic resistance testing in patients failing first line antiretroviral therapy in the first large countrywide Ethiopian HIV cohort.** 2019. BMC infectious diseases. 19 (1): 569.

THE LANCET, H. **U=U taking off in 2017.** 2017. The lancet. HIV. 4 (11): e475.

THOMPSON, M. A. *ET AL.* **Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International Antiviral Society-USA panel.** 2012. Jama. 308 (4): 387-402.

THOMSON, M. M. *ET AL.* **Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18\_cpx) of Central African origin in Cuba.** 2005. *Aids*. 19 (11): 1155-1163.

TRACHTENBERG, E. A. E ERLICH, H. A. **A review of the role of the human leukocyte antigen (HLA) system as a host immunogenetic factor influencing HIV transmission and progression to AIDS.** 2001. *HIV molecular immunology*. 43 43.

TUMIOTTO, C. *ET AL.* **Provir/Latitude 45 study: A step towards a multi-epitopic CTL vaccine designed on archived HIV-1 DNA and according to dominant HLA I alleles.** 2019. *PloS one*. 14 (2): e0212347.

TZOU, P. L. *ET AL.* **Comparison of an In Vitro Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing.** 2018. *Journal of clinical microbiology*. 56 (6):

UNAIDS. **Diagnostics access initiative to achieve the 90-90-90 treatment target.** 2015.

UNAIDS. **Data 2020.** 2020.

VALLARI, A. *ET AL.* **Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon.** 2011. *Journal of virology*. 85 (3): 1403-1407.

VAN HEUVERSWYN, F. *ET AL.* **Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas.** 2006. *Nature*. 444 (7116): 164.

VANDAMME, A. M. *ET AL.* **Managing resistance to anti-HIV drugs: an important consideration for effective disease management.** 1999. *Drugs*. 57 (3): 337-361.

VARDAS, E. *ET AL.* **Indicators of therapeutic effect in FIT-06, a Phase II trial of a DNA vaccine, GTU((R))-Multi-HIVB, in untreated HIV-1 infected subjects.** 2012. *Vaccine*. 30 (27): 4046-4054.

VENNER, C. M. *ET AL.* **Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of Sub-Saharan Africa.** 2016. *EBioMedicine*. 13 305-314.

VIDAL, N. *ET AL.* **Characterization of an old complex circulating recombinant form, CRF27\_cpx, originating from the Democratic Republic of Congo (DRC) and circulating in France.** 2008. *AIDS research and human retroviruses*. 24 (2): 315-321.

VIEILLARD, V. *ET AL.* **HIV therapeutic vaccine enhances non-exhausted CD4(+) T cells in a randomised phase 2 trial.** 2019. *NPJ vaccines*. 4 25.

VYAS, J. M. *ET AL.* **The known unknowns of antigen processing and presentation.** 2008. *Nature reviews. Immunology*. 8 (8): 607-618.

WAIN-HOBSON, S. *ET AL.* **Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.** 1985. *Cell*. 40 (1): 9-17.

WILHELMSON, S. *ET AL.* **Prevalence of HIV-1 pretreatment drug resistance among treatment naive pregnant women in Bissau, Guinea Bissau.** 2018. PloS one. 13 (10): e0206406.

WILK, T. *ET AL.* **Organization of immature human immunodeficiency virus type 1.** 2001. Journal of virology. 75 (2): 759-771.

WOOD, E. *ET AL.* **Effect of medication adherence on survival of HIV-infected adults who start highly active antiretroviral therapy when the CD4+ cell count is 0.200 to 0.350 x 10<sup>9</sup> cells/L.** 2003. Annals of internal medicine. 139 (10): 810-816.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach.** 2016.

YAMAGUCHI, J. *ET AL.* **Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L.** 2020. Journal of acquired immune deficiency syndromes. 83 (3): 319-322.

YAMAGUCHI, J. *ET AL.* **Evaluation of HIV type 1 group O isolates: identification of five phylogenetic clusters.** 2002. AIDS research and human retroviruses. 18 (4): 269-282.

ZACCARELLI, M. *ET AL.* **Genotypic resistance test in proviral DNA can identify resistance mutations never detected in historical genotypic test in patients with low level or undetectable HIV-RNA.** 2016. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 82 94-100.

ZAUNDERS, J. E VAN BOCKEL, D. **Innate and Adaptive Immunity in Long-Term Non-Progression in HIV Disease.** 2013. Frontiers in immunology. 4 95.

ZHAO, J. *ET AL.* **HIV-1 molecular epidemiology and drug resistance-associated mutations among treatment-naive blood donors in China.** 2020. Scientific reports. 10 (1): 7571.





Data da Visita: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|  
                          dia      mês      ano

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_

Identificador Amostra: \_\_\_\_\_

**Contagem de CD4 e CD8 (Relatar do mais recente ao mais antigo)**

(Última) Citometria de Fluxo Data: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD4 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD8 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Citometria de Fluxo Data: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD4 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD8 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Citometria de Fluxo Data: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD4 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD8 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Citometria de Fluxo Data: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD4 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD8 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Citometria de Fluxo Data: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD4 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD8 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Citometria de Fluxo Data: |\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|/|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD4 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

CD8 contagem/ml |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Data da Visita: |\_\_||\_\_||/|\_\_||\_\_||/|\_\_||\_\_||\_\_||\_\_||  
*dia mês ano*

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_

Identificador Amostra: \_\_\_\_\_

**História Medicamentosa**

Antirretroviral	Data de início dia/mês/ano	Data de término dia/mês/ano*	Motivo da troca

\* Se o tratamento ainda está em andamento por ocasião da coleta escreva “presente”.

**Comentários e ou observações de comportamento relacionados à transmissão do HIV (usuário de drogas, via sexual, transmissão vertical):**

\_\_\_\_\_

## 9.2. Mutações analisadas nas regiões genômicas virais RNase H e Conexão

Tabela 9.1: Mutações analisadas nas regiões RNase H e Conexão. As classes dos medicamentos e a resistência ao antirretroviral também estão compilados. As mutações são baseadas na literatura (BREHM *ET AL.*, 2007; SANTOS *ET AL.*, 2008; DELVIKS-FRANKENBERRY *ET AL.*, 2009; DAU *ET AL.*, 2010; DELVIKS-FRANKENBERRY *ET AL.*, 2010; GUPTA *ET AL.*, 2011; LENG RUBER *ET AL.*, 2011; PAREDES *ET AL.*, 2011).

Domínio	Mutação	Classe a qual confere resistência	Resistência ao antirretroviral
<b>Conexão</b>	E312Q	INTR	Aumenta resistência ao AZT na presença de TAMs
	Y318FW	INNTR	Resistência ao DLV, EFV e NVP
	G333D	INNTR	Reduz susceptibilidade ao ETR
	G335DC	INTR	Aumenta resistência ao AZT na presença de TAMs
	N348I	INTR e INNTR	Aumenta resistência ao AZT na presença de TAMs. Diminui a susceptibilidade ao DLV, NVP e ETR
	A360IV	INTR e INNTR	Aumenta resistência ao AZT na presença de TAMs. Reduz susceptibilidade ao ETR e NVP
	V365I	INTR	Aumenta resistência ao AZT na presença de TAMs
	T369IV	INNTR	Reduz susceptibilidade ao ETR e NVP
	A371V	INTR	Aumenta resistência ao AZT, 3TC, ABC e TDF na presença de TAMs
	A376S	INTR e INNTR	Aumenta resistência ao AZT na presença de TAMs. Reduz susceptibilidade ao ETR e NVP
<b>RNase H</b>	E399GD	INTR e INNTR	Reduz susceptibilidade ao EFV
	A400T	INTR	Aumenta resistência ao AZT
	Q509L	INTR	Aumenta resistência ao AZT, 3TC, ABC e TDF na presença de TAMs
	H539N	INTR	Aumenta resistência ao AZT. Reduz susceptibilidade de d4T
	D549N	INTR	Aumenta resistência ao AZT e d4T na presença de TAMs

INTR – inibidor nucleosídico da transcriptase reversa; INNTR – inibidor não-nucleosídico da transcriptase reversa; TAMs – mutações análogas de Timidina (do inglês: *Thymidine Analog Mutations*); AZT – zidovudina; DLV – delavirdina; EFV – efavirenz; NVP – nevirapina; ETR – etravirina; 3TC – lamivudina; ABC – abacavir; TDF – tenofovir; d4T – estavudina.

### 9.3. Resultado do sequenciamento das amostras na plataforma Illumina MiSeq

Tabela 9.2: Especificação dos fragmentos sequenciados, os números de *reads* produzidos, os números de *reads* alinhados e a média de cobertura para cada amostra.

Amostra	Fragmento Sequenciado	Número de <i>reads</i>	Número de <i>reads</i> alinhados	Média de cobertura ( <i>reads</i> )	Amostra	Fragmento Sequenciado	Número de <i>reads</i>	Número de <i>reads</i> alinhados	Média de cobertura ( <i>reads</i> )
1-HI*	A, B, D, HG2	813.462	760.210	12.636,6	25-HI	A, B, C	1.026.384	1.182.388	20.477,2
2-HI	A, BI, BII, C, D	259.350	224.455	2.096,5	26-HI	A, BI, B, C, D	1.437.156	1.078.953	11.215,5
3-HI	A, BI, BII, C, D	631.196	537.156	5.214,8	27-HI	A, B, BII, C, D	1.417.280	1.279.882	13.142,1
4-HI	A, B, C, D	729.342	629.946	7.588,5	28-HI	A, B, C, D	1.657.930	1.390.908	12.930,8
5-HI	A, BI, BII, C, D	424.974	356.493	3.630,0	29-HI	A, B, C, D	646.990	522.377	5.402,5
6-HI	A, B, C, D	805.884	753.639	12.871,4	30-HI	A, C, D, HG2	1.501.538	1.053.145	22.175,9
7-HI	HG1b, B, C, D	1.137.672	934.647	18.507,7	31-HI	A, C, D	1.005.994	856.826	9.748,2
8-HI	A, B, BII, C, D	910.002	838.322	9.697,0	32-HI	A, B, C, D	609.584	580.616	8.397,0
9-HI	C	1.098.162	567.884	8.559,3	33-HI	A, B, C, D	1.919.584	1.864.774	24.162,4
10-HI	B, C, D	894.372	630.087	12.743,8	34-HI	A, B, C, D	2.191.098	2.115.394	27.208,9
11-HI	HG1b HG2	882.346	852.076	17.000,3	2-HUCFF	A, B, C, D	453.848	439.304	6.962,9
12-HI	A, B, C, D	1.647.090	1.515.273	23.039,4	3-HUCFF	A, B, C, D	1.012.010	940.158	11.352,3
13-HI	A, BI, BII, C, D	337.546	283.581	2.660,4	4-HUCFF	A, B, C, D	355.388	338.519	6.262,5
14-HI	A, B, C, D	644.866	552.268	5.778,1	5-HUCFF	HG1b, A, B, C, D	2.236.428	2.159.721	46.457,5
15-HI	A, B, C, D	941.538	904.439	13.714,3	6-HUCFF	A, B, C, D	861.922	823.514	13.080,9
16-HI	A, B, C, D	1.069.872	988.457	13.797,6	7-HUCFF	A, B, C, D	909.196	871.439	13.325,9
17-HI	A, B, C, D	1.295.368	1.201.040	17.266,0	9-HUCFF	A, B, C, D	299.404	286.917	5.303,9
18-HI	A, B, C, D	907.782	715.403	8849,3	10-HUCFF	A, B, C, D	861.106	802.588	11.875,6
19-HI	A, B, C, D	535.786	429.439	6.619,4	12-HUCFF	A, B, C, D	1.088.768	1.051.981	16.140,2
20-HI	A, B, C, D	2.335.504	1.723.875	21.234,8	14-HUCFF	A, B, C, D	1.807.950	1.750.411	23.211,2
21-HI	A, B, C, D	577.036	542.630	7.305,0	16-HUCFF	A, B, C, D	2.116.940	2.051.335	27.035,8
22-HI	A, B, C, D	419.034	361.473	3.426,3	17-HUCFF	A, B, C, D	1.009.078	966.471	20.711,7
23-HI	A, B, C, D	620.140	545.854	5.327,8	1-FURG	A, B, C, D	120.008	112.274	9.464
24-HI	A, B, C, D	1.077.134	1.021.960	19.887,4	2-FURG	A, B, C, D	386.102	374.025	8.365,9

Amostra	Fragmento Sequenciado	Número de reads	Número de reads alinhados	Média de cobertura (reads)	Amostra	Fragmento Sequenciado	Número de reads	Número de reads alinhados	Média de cobertura (reads)
<b>3-FURG</b>	A, B, C, D	1.884.180	1.614.229	13.613	22-FURG	HG2	1.919.044	1.862.447	40.745,1
4-FURG	HG2, C, D	1.080.152	854.325	12.086,8	<b>23-FURG</b>	A, B, C, D	1.519.760	1.437.568	23.291,0
<b>5-FURG</b>	HG1b, B, C, D	1.692.912	1.561.280	20.753,2	<b>24-FURG</b>	HG1b, C, D	613.968	588.737	11.732,7
<b>6-FURG</b>	A, B, C, D	345.940	315.123	4.448,6	25-FURG	C, D	426.412	347.483	8.388,8
<b>7-FURG</b>	A, B, C, D	2.196.244	1.734.699	16.892,4	<b>26-FURG</b>	A, B, C, D	1.352.830	1.282.775	16.484,5
<b>8-FURG</b>	A, B, C, D	696.216	673.188	16.195,9	<b>27-FURG</b>	A, B, C, D	1.591.214	1.543.560	19.386,1
<b>9-FURG</b>	A, B, C, D	1.944.608	1.795.300	18.038,8	28-FURG	HG2, C	844.436	815.717	17.990,9
<b>10-FURG</b>	HG1b, B, C, D	1.080.784	987.387	16.355,6	<b>29-FURG</b>	A, B, C, D	1.314.544	1.233.554	26.608,5
<b>11-FURG</b>	A, B, C, D	1.378.096	1.281.642	25.586,7	30-FURG	B, C, D, HG2	1.307.902	1.278.164	20.896,9
<b>12-FURG</b>	HG1b, A, C, D	409.582	367.632	4.655,8	31-FURG	A, C, D	603.900	558.029	12.118,7
<b>13-FURG</b>	HG1b, A, C, D	427.392	403.131	7.064,3	<b>32-FURG</b>	HG1b, A, B, C, D	1.685.704	1.471.312	15.587,6
14-FURG	B, C, D	287.150	274.488	9.691	<b>33-FURG</b>	HG1b, B, C, D	1.378.178	1.253.021	16.177,9
<b>15-FURG</b>	HG1b, B, C, D	1.630.800	1.402.310	15.345,4	34-FURG	B, C	730.058	615.557	13.648,8
<b>16-FURG</b>	A, B, C, D	1.395.598	1.255.470	14.948,6	<b>35-FURG</b>	HG1b, A, B, C, D	1.926.032	1.806.831	37.652,4
<b>17-FURG</b>	A, B, C, D	1.611.836	1.386.666	15.267,4	<b>36-FURG</b>	HG1b, A, B, C, D	826.380	430.509	7.996,8
<b>18-FURG</b>	A, B, C, D	1.282.176	1.222.701	15.832,1	37-FURG	HG1b, C	680.876	669.776	14.094,9
<b>19-FURG</b>	HG1b, A, C, D	2.094.246	1.919.968	25.459,6	<b>38-FURG</b>	A, B, C, D	1.081.146	1.013.419	20.767,7
<b>20-FURG</b>	A, B, C, D	1.585.614	1.352.115	15.789,3	39-FURG	C, D	698.322	466.078	9.592,3
21-FURG	B, HG2	419.052	398.594	7.322,3	40-FURG	C, D	719.154	637.526	13.522,30

\*Os genomas provirais quase completos estão representados em negrito. HI: Hospital Federal de Ipanema; HUCFF: Hospital Universitário Clementino Fraga Filho; FURG: Hospital Universitário Doutor Miguel Riet Corrêa Junior.