

# Caracterização da diversidade genética do HIV-1 das quasispécies provirais de indivíduos submetidos à HAART bem sucedida como terapia de primeira linha

Brunna M. Alves (DO)<sup>1</sup>, Isabel M. Prellwitz<sup>1</sup>, Hector N. Seuánez<sup>2</sup>, Marianne Monteiro<sup>3</sup>, Sayonara Rocha<sup>3</sup>, Marcelo A. Soares<sup>1</sup>, Esmeralda A. Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Oncovirologia, Instituto Nacional de Câncer; <sup>2</sup>Programa de Genética, Instituto Nacional de Câncer; <sup>3</sup>Hospital Federal de Ipanema, Rio de Janeiro

## INTRODUÇÃO

Com o aumento dos esforços na prevenção e terapia, o acesso à terapia antirretroviral (ARV) por indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) triplicou em cinco anos. Atualmente, estima-se que existam 734 mil pessoas vivendo com HIV/Aids no Brasil e destes, aproximadamente 404 mil HIV<sup>+</sup> fazem uso de medicamentos ARV ofertados pelo Sistema Único de Saúde (Figura 1).

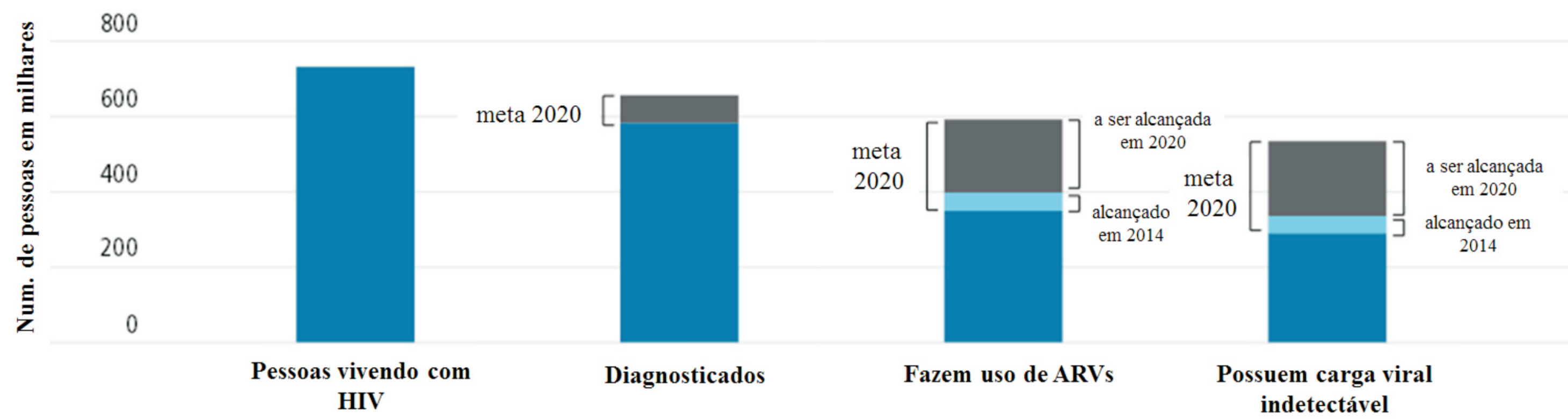


Figura 1. Cascata de cuidados com a população HIV+ no Brasil em 2014 e as metas para 2020 (Fonte: Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2015 compilado em *Maximizing the treatment and prevention potential of antiretroviral drugs: early country experiences towards implementing a treat-all policy*, 2015)

A notável variabilidade genética do HIV permite o aparecimento de diversas variantes virais altamente relacionadas, mas individualmente distinguíveis, que são referidas como quasispécies. As quasispécies representam um desafio no diagnóstico e no tratamento, pois são capazes de influenciar na persistência e na patogenicidade do HIV.

Com o avanço do NGS é possível detectar variantes minoritárias com frequência inferior a 1%, antes indetectáveis, além da identificação de variantes minoritárias de resistência aos ARVs e variantes com mutações de resistência a drogas transmitidas (TDRM). Estima-se que aproximadamente 10% dos novos pacientes diagnosticados estão infectados com cepas que apresentam ao menos uma TDRM. No entanto, a significância clínica e o papel das variantes de resistência minoritárias e TDRMs na futura resposta ao tratamento ainda é incerta.

A análise das quasispécies virais faz parte de um estudo multicêntrico internacional feito em colaboração com diversos pesquisadores no Brasil, Canadá e França, cuja principal finalidade é correlacionar a composição dos alelos HLA aos epítomos do HIV que são restritos por esses alelos. Assim, esses epítomos seriam capazes de provocar respostas citotóxicas efetivas que poderão ajudar a controlar a infecção após a descontinuação do tratamento antirretroviral.

## OBJETIVO

Caracterizar a diversidade genética do HIV de pacientes submetidos à terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART) bem-sucedida como primeira opção terapêutica através da obtenção de sequências completas de quasispécies provirais arquivadas por Sequenciamento de Nova Geração (NGS), estabelecendo uma metodologia de análise de dados de NGS e determinando a presença e frequência de variantes de escape imune e de mutações de resistência às drogas, além da diversidade de subtipos e formas recombinantes nessas populações.

## METODOLOGIA

Para o estudo estão sendo selecionados até 40 indivíduos adultos HIV-1<sup>+</sup> provenientes do Hospital Federal de Ipanema no Rio de Janeiro.

Os critérios de inclusão são: idade maior ou igual a 18 anos, estando sob HAART de primeira linha com sucesso terapêutico (carga viral do HIV indetectável) durante pelo menos 12 meses.

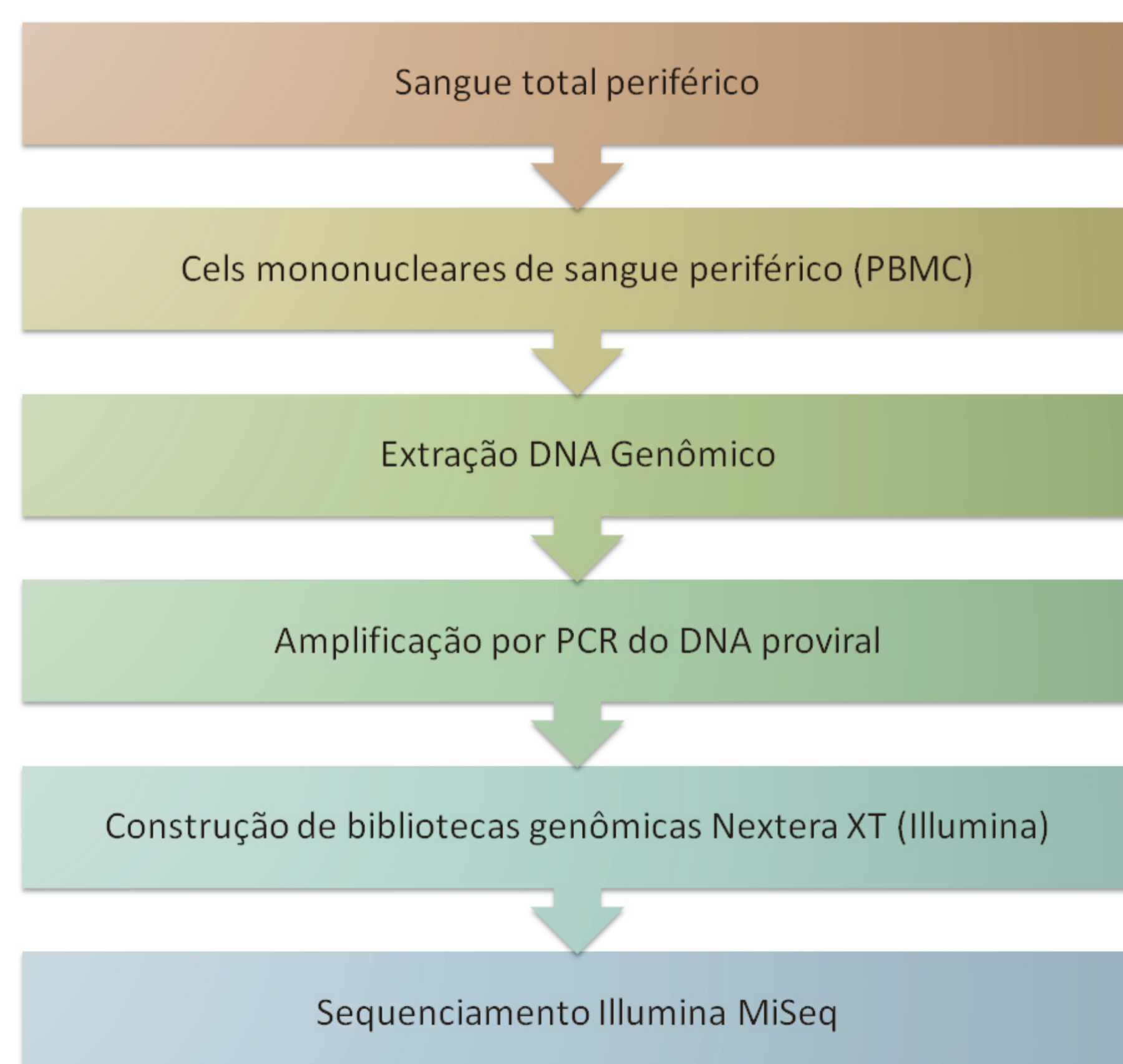


Figura 2. Fluxograma da metodologia a ser desenvolvida no estudo.

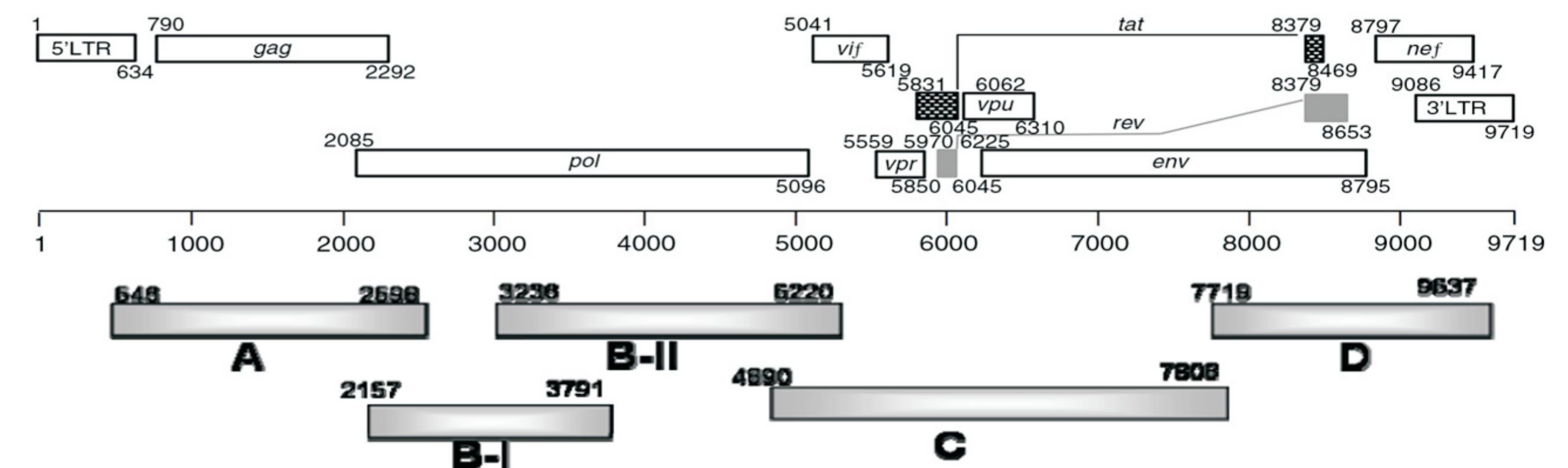


Figura 3. Estratégia de amplificação do genoma completo do HIV (Sanabani et al., 2005).

O produto do sequenciamento foi utilizado na montagem do genoma proviral utilizando sequências-referências através do programa Geneious (Biomatters Limited), onde também foi realizada a extração de sequências representativas da população viral majoritária de cada amostra para determinação do subtipo infectante por análises filogenéticas.

A análise das variantes foi realizada através da ferramenta *variant finder plugin* no mesmo programa, para determinação da presença e frequência das mutações de resistência aos ARVs e de TDRMs, com base no consenso da Sociedade Internacional de Aids (IAS) e no banco de dados *Stanford* (BENNETT et al., 2009; WENSING et al., 2015). As variantes com frequência entre 20 e 2% foram consideradas variantes minoritárias. Variantes acima de 20% foram consideradas majoritárias.

## RESULTADOS

Das 32 amostras provenientes do Hospital Federal de Ipanema já incluídas no estudo, 17 amostras que possuíam mais de 3 fragmentos genômicos amplificados com sucesso já foram sequenciadas. Foi possível obter a sequência completa do genoma viral para 11 dessas amostras; as outras seis amostras possuem diferentes padrões de cobertura parcial do genoma viral.

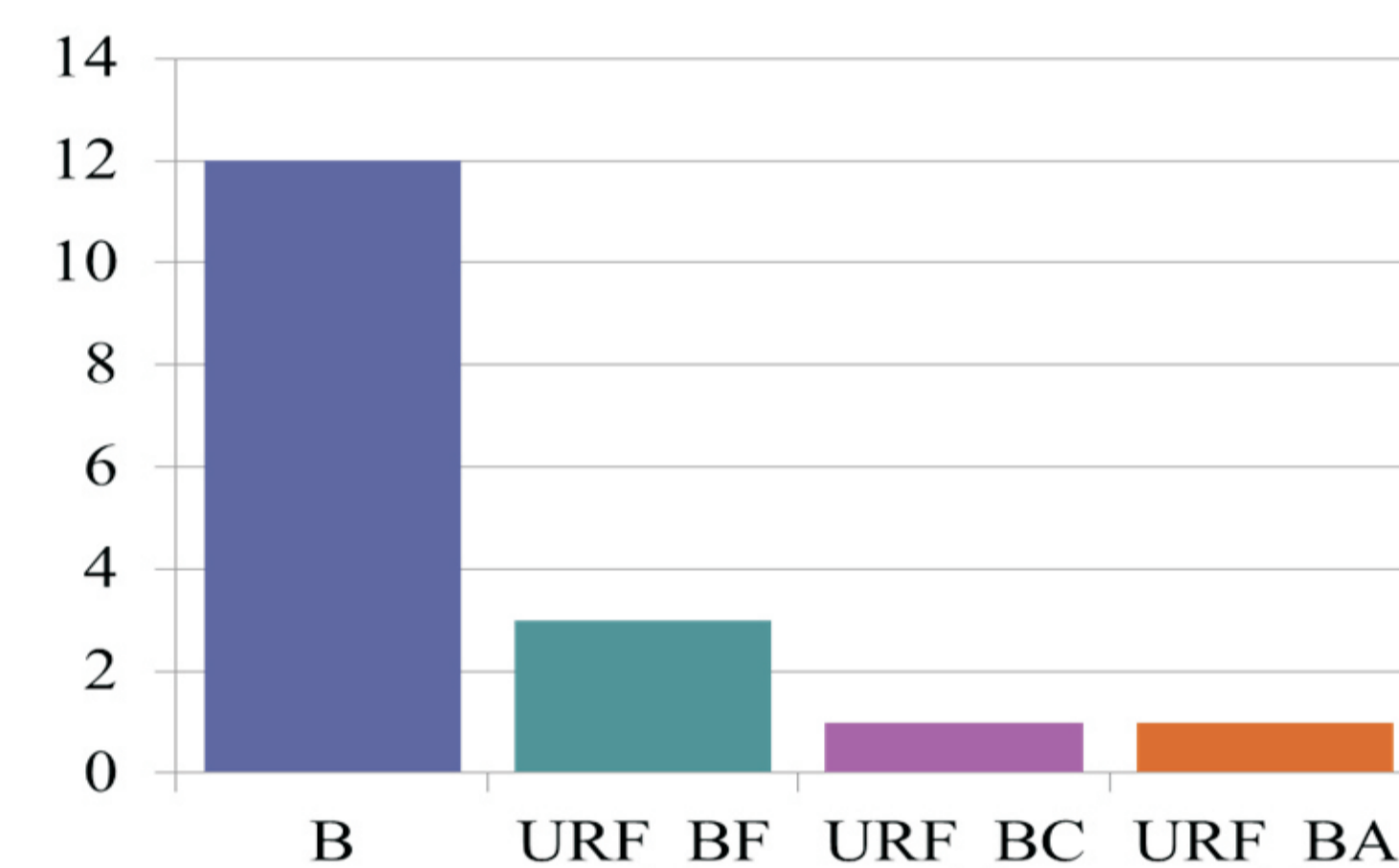


Figura 4. Resultado da prevalência dos subtipos do HIV nas 17 amostras sequenciadas na plataforma Illumina MiSeq observados por análises filogenéticas. URF, Forma Recombinante Únicas.

Quanto à resistência aos ARVs, foram identificados sete pacientes (41%) cujas mutações majoritárias apresentadas estavam associadas a determinado nível de resistência aos antirretrovirais. A análise das variantes minoritárias permitiu observar seis pacientes apresentando mutações capazes de conferir resistência, incluindo um paciente com padrão de resistência cruzada capaz de conferir resistência a vários medicamentos. Desses, cinco pacientes não apresentavam resistência a nenhum antirretroviral na análise da população viral majoritária. Além disso, três pacientes apresentaram variantes minoritárias classificadas como mutações de resistência à droga transmitidas (TDRM).

Dessa forma, considerando também as variantes minoritárias, foi observado que doze dos dezessete pacientes (70%) carregavam vírus arquivados apresentando ao menos uma mutação capaz de conferir resistência aos antirretrovirais.

Em conjunto, essas informações mostram um perfil epidemiológico semelhante ao prevalente na maior parte do país, e podem direcionar futuras trocas terapêuticas e complementam os estudos da diversidade dos epítomos virais arquivados.

## PERSPECTIVAS

Quanto à resistência aos ARVs, foram identificados sete pacientes (41%) cujas mutações majoritárias apresentadas estavam associadas a determinado nível de resistência aos antirretrovirais. A análise das variantes minoritárias permitiu observar seis pacientes apresentando mutações capazes de conferir resistência, incluindo um paciente com padrão de resistência cruzada capaz de conferir resistência a vários medicamentos. Desses, cinco pacientes não apresentavam resistência a nenhum antirretroviral na análise da população viral majoritária. Além disso, três pacientes apresentaram variantes minoritárias classificadas como mutações de resistência à droga transmitidas (TDRM).

Dessa forma, considerando também as variantes minoritárias, foi observado que doze dos dezessete pacientes (70%) carregavam vírus arquivados apresentando ao menos uma mutação capaz de conferir resistência aos antirretrovirais.

Em conjunto, essas informações mostram um perfil epidemiológico semelhante ao prevalente na maior parte do país, podem direcionar futuras trocas terapêuticas e complementam os estudos da diversidade dos epítomos virais arquivados.