

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO
PARASITO-HOSPEDEIRO**

MARCELLA SILVA DE PAULA

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MUTAÇÕES NO GENE DA
INTEGRASE DE ISOLADOS DO HIV-1 DE PACIENTES ATENDIDOS NO
MUNICÍPIO DE JATAÍ/GOIÁS**

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

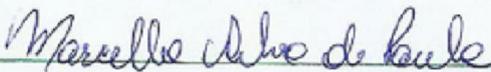
Nome completo do autor: **MARCELLA SILVA DE PAULA**

Título do trabalho: **ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MUTAÇÕES NO GENE DA INTEGRASE DE ISOLADOS DO HIV-1 DE PACIENTES ATENDIDOS NO MUNICÍPIO DE JATAÍ/GOIÁS**

3. Informações de acesso ao documento:

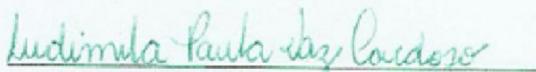
Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO:

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 10/ 05 / 2018

MARCELLA SILVA DE PAULA

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MUTAÇÕES NO GENE DA
INTEGRASE DE ISOLADOS DO HIV-1 DE PACIENTES ATENDIDOS NO
MUNICÍPIO DE JATAÍ/GOIÁS**

Defesa de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva de Paula, Marcella
ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MUTAÇÕES NO GENE DA INTEGRASE DE ISOLADOS DO HIV-1 DE PACIENTES ATENDIDOS NO MUNICÍPIO DE JATAÍ/GOIÁS [manuscrito] / Marcella Silva de Paula. - 2018.
XCIV, 94 f.: il.

Orientador: Profa. Ludimila Paula Vaz Cardoso.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2018.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.
Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. HIV-1. 2. Resistência. 3. Diversidade. 4. Integrase. I. Vaz Cardoso, Ludimila Paula, orient. II. Título.

CDU 616-022



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MARCELLA SILVA DE PAULA - Aos onze dias do mês de abril do ano de 2018 (11/04/2018), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO, FABÍOLA SOUZA FIACCADORI e VALÉRIA CHRISTINA DE REZENDE FERES, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA E MUTAÇÕES NO GENE DA INTEGRASE DE ISOLADOS DO HIV-1 DE PACIENTES ATENDIDOS NO MUNICÍPIO DE JATAÍ/GOIÁS”**, em nível de **MESTRADO**, de autoria de **MARCELLA SILVA DE PAULA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. LUDIMILA PAULA VAZ CARDOSO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu o Candidato, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada:**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso

Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori

Profa. Dra. Valéria Christina de Rezende Feres

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada, (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 25 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, **KARINY VIEIRA SOARES E SILVA**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso (REJ/UFG)

Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Valéria Christina de Rezende Feres (FF/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

Ludimila Paula Vaz Cardoso
Fiaccadori
Valéria C. Rezende Feres
Kariny V. Soares

**Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE MESTRADO

Aluno (a): Marcella Silva de Paula

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ludimila Paula Vaz Cardoso

Membros:

1. Profa. Dra. Valéria Christina de Rezende Feres

2. Profa. Dra. Fabíola Souza Fiaccadori

3. Profa. Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso

Data: 11/04/2018

Gostaria de dedicar este trabalho a todas as pessoas portadoras do vírus do HIV, na esperança de que este ajude, de alguma forma, mesmo que pequena, na vida destas pessoas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela graça da vida e aos meus pais, Mauro e Celma, por todo apoio e incentivo, pelo sacrifício deles para que pudessem me dar a oportunidade de estudar, pois sem eles eu não teria me tornado quem sou hoje.

Agradeço ao meu namorado, Artur, que está sempre ao meu lado, e a toda minha família, que torceram e comemoraram comigo mais esta vitória.

Agradeço imensamente à minha orientadora Profa. Dra. Ludimila Cardoso, por ter me aceitado como aluna e ter acreditado que eu seria capaz, por sua dedicação para comigo e que apesar da distância sempre esteve presente.

À Profa. Dra. Mariane Stefani, obrigada por abrir as portas do seu laboratório no IPTSP, tornando essa pesquisa real, assim como a ajuda da biomédica Mônica Reis que foi de extrema importância para a finalização do projeto.

Agradeço à médica infectologista Dra. Regyane, e a farmacêutica Luciana, que trabalham no Hospital das Clínicas Dr. Serafim de Carvalho, que foram responsáveis pela coleta das amostras e pela informação dos esquemas terapêuticos dos pacientes.

Agradeço à banca de exame de qualificação pelas contribuições: Profa. Dra. Merina Borges, Profa. Dra. Fabíola Souza e a Profa. Dra. Ângela Argolo.

Meus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desta pesquisa e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) que me proporcionaram a bolsa durante meu mestrado.

Enfim, o meu sincero e profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira nesta longa jornada para que eu chegasse até aqui e que estiveram presentes no período do meu Mestrado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	10
LISTA DE FIGURAS, APÊNDICES E ANEXOS.....	13
LISTA DE QUADROS E TABELAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Classificação e Aspectos Epidemiológicos do HIV	17
1.2. Diversidade Genética do HIV-1	18
1.3. Distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 no mundo	20
1.3.1. Distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 no Brasil.....	21
1.3.2. Distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 na Região Sudoeste Goiano	23
1.4. Estrutura e Genoma do HIV-1.....	25
1.5. Ciclo de Replicação do HIV-1	28
1.6. Resposta Imune Contra o HIV	32
1.6.1. Resposta Imune Inata.....	32
1.6.2. Resposta Imune Adaptativa.....	34
1.7. Curso da Infecção do HIV-1	35
1.8. Diagnóstico da Infecção Pelo HIV-1	37
1.9. Tratamento Antirretroviral - TARV	38
1.9.1. Inibidores Nucleosídeos e Nucleotídeos da Transcriptase Reversa	39
1.9.2. Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa.....	39
1.9.3. Inibidores de Protease.....	40
1.9.4. Inibidores de Entrada	40
1.9.5. Inibidores de Integrase.....	40
1.10. Tratamento Antirretroviral no Brasil.....	41
1.11. Resistência aos Antirretrovirais	42
2. JUSTIFICATIVA.....	47
3. OBJETIVOS	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1. População de Estudo.....	49
4.2. Coleta e Processamento da Amostra Biológica.....	50
4.3. Extração do RNA Viral.....	50

4.4.	Síntese do DNA Complementar por Transcrição Reversa do RNA.....	51
4.5.	Amplificação da Região da Integrase do HIV-1 pela Reação de “nested”-PCR	51
4.6.	Eletroforese em Gel de Agarose 1%.....	53
4.7.	Purificação dos Produtos Amplificados.....	53
4.8.	Sequenciamento Automatizado	53
4.9.	Análise das Mutações de Resistência aos Inibidores da Integrase	54
4.10.	Análise Filogenética dos Subtipos	54
4.11.	Aspectos Éticos	55
4.12.	Análise Estatística	55
5.	RESULTADOS.....	56
6.	DISCUSSÃO	61
7.	CONCLUSÕES	67
8.	REFERÊNCIAS.....	68
	APÊNDICES	78
	APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78
	APÊNDICE 2 – Questionário.....	80
	ANEXO 1 – Parecer Do Comitê De Ética	82
	ANEXO 2 – Localização Dos Primers	85
	ANEXO 3 - Lista De Polimorfismos	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

- ABC: Abacavir
- AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*
- ARV: Antirretroviral
- ATV: Atazanavir
- AZT: Zidovudina ou Azidotimidina
- CCD: Domínio catalítico nuclear, do inglês *Catalitic Core Dominion*
- CD: Células dendríticas
- CDm: Células dendríticas mielóides
- CD-SIGN: Célula dendrítica específica de adesão intracelular de grambina não-integrina, do inglês *Dendritic Cell Specific Intercellular adhesion molecule Grabbing Non-integrin*
- CDp: Células dendríticas plasmocitóides
- CNPq: Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento
- CRFs: Formas recombinantes circulantes, do inglês *Circulating Recombinant Forms*
- CTA: Centro de Testagem e Aconselhamento
- CTL: Linfócito T citotóxico, do inglês *Cytotoxic Lymphocyte T*
- CTD: Domínio C-terminal, do inglês *C-Terminal Domain*
- DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*
- DNAc: DNA complementar
- dNTPs: Desoxinucleotídeos trifosfatados naturais
- DRV: Darunavir
- DTG: Dolutegravir
- EFV: Efavirenz
- ELISA: Ensaio imunoenzimático, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
- ENF;T-20: Enfuvirtida
- EST: Estavudina
- ETR: Etravirina
- FDA: do inglês *Food and Drug Administration*
- FPV: Fosamprenavir
- gp: Glicoproteína

HAART: Terapia antirretroviral altamente ativa, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HIV: Vírus da imunodeficiência humana, do inglês , *human immunodeficiency virus*

IAS-USA: Sociedade Internacional de AIDS dos Estados Unidos da América

ICL: Células Linfóides Inatas

IE: Inibidores de entrada

IFN- γ : Interferon gama

IFN-1: Interferon tipo 1

IL: Interleucina

IN: Integrase

INI: inibidores de Integrase

INNTR: Inibidores não-nucleosídeos da Transcriptase Reversa

INTR: Inibidores nucleosídeos e nucleotídeos da Transcriptase Reversa

IP: Inibidores da Protease

kb: Kilobases

LPV: Lopinavir

LTRs: Repetições terminais longas, do inglês *Long terminal repetitions*

MVQ: Maraviroque

NK: Natural Killer

NTD: Domínio N-terminal, do inglês *N- Terminal Dominion*

NVP: Nevirapina

OH: Hidroxila

pb: pares de base

PCR: Reação em cadeia pela polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PR: Protease

RAL: Raltegravir

RENAGENO: Rede Nacional de Genotipagem

RNA: Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

RNA_m: RNA mensageiro

RT-PCR: Reação da polimerase em cadeia precedida da transcriptase reversa

RTV: Ritonavir

SQV: Saquinavir

TARV: Terapia antirretroviral

TB: Tuberculose

TDF: Tenofovir

TR: Transcriptase reversa

TPV: Tipranavir

URF: Forma recombinante única

V: Valina

3TC: Lamivudina

LISTA DE FIGURAS, APÊNDICES E ANEXOS

FIGURA 1 Distribuição geográfica dos subtipos e CRFs do HIV-1 no mundo.....	20
FIGURA 2 Distribuição dos subtipos do HIV-1 e formas recombinantes no Brasil.....	22
FIGURA 3 Macrorregiões do estado de Goiás.....	24
FIGURA 4 Estrutura do vírus do HIV-1.....	26
FIGURA 5 Esquema da organização genômica do HIV-1.....	27
FIGURA 6 Estrutura dos três domínios da integrase.....	27
FIGURA 7 Ciclo replicativo do HIV-1.....	29
FIGURA 8 Esquema representativo do processamento 3'.....	30
FIGURA 9 Integração do DNA complementar do HIV-1 no genoma do hospedeiro....	31
FIGURA 10 Principais mutações no gene da integrase relacionado a resistência aos antirretrovirais em 2007.....	45
FIGURA 11 Principais mutações no gene da integrase relacionado a resistência aos antirretrovirais em 2013.....	46
FIGURA 12 Principais mutações no gene da integrase relacionado a resistência aos antirretrovirais em 2017.....	46
FIGURA 13 Árvore filogenética da região da IN de isolados de HIV-1.....	60
APÊNDICE 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	78
APÊNDICE 2 Questionário.....	80
ANEXO 1 Parecer do Comitê de Ética.....	82
ANEXO 2 Localização dos Primers.....	85
ANEXO 3 Lista de Polimorfismos.....	89

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 Antirretrovirais disponíveis no Brasil.....	39
QUADRO 2 “Mix1” para primeira etapa de “nested”-PCR.....	51
QUADRO 3 “Mix2” para a segunda etapa da “nested”-PCR.....	52
QUADRO 4 Sequência dos <i>primers</i> para o gene da Integrase do HIV-1.....	52
TABELA 1 Principais características do perfil epidemiológico de pacientes HIV+/AIDS atendidos no SAE de Jataí/Goiás.....	56

RESUMO

Os INI estão disponíveis no Brasil desde 2009, quando o primeiro INI, Raltegravir, passou a ser disponibilizado para terapia de resgate de paciente HIV+ em falha terapêutica. No ano de 2017, um segundo INI foi introduzido na TARV de pacientes recém diagnosticados com HIV-1, o Dolutegravir, que por possuir barreira genética mais elevada e dose diária única, substituiu o Efavirenz na primeira linha de tratamento. Porém, apesar da eficiência dos INI, a emergência de variantes virais resistentes a estes fármacos é inevitável. Por isto, é necessário o monitoramento das mutações de resistência aos INI, que podem levar falha terapêutica, visando a otimização do esquema terapêutico e controle da infecção pelo HIV. O objetivo deste estudo foi avaliar a ocorrência de mutações aos INI e o perfil de resistência em pacientes HIV+/AIDS do município de Jataí/Goiás. O gene completo da IN foi sequenciado a partir de amostras de pacientes virgens de INI. As mutações de resistência foram identificadas pelo banco de dados de Stanford-HIV e IAS-USA. Os subtipos virais foram identificados por análise filogenética. Entre as 52 amostras analisadas, nenhuma mutação primária foi identificada. Duas mutações acessórias (T97A/G163K) foram identificadas e estas induzem baixo nível de resistência à Raltegravir e Elvitegravir. No total, 152 polimorfismos foram identificados. O subtipo mais prevalente foi o subtipo B. Portanto, estes dados demonstram que a região da IN ainda é bastante conservada, encorajando o uso de INI na terapia contra o HIV-1 e auxiliam no mapeamento da diversidade genética do HIV-1 na região Sudoeste Goiano.

Palavras-chaves: HIV-1, Resistência, Diversidade e Integrase.

ABSTRACT

INI have been available in Brazil since 2009, when the first INI, Raltegravir, became available for therapy of rescue of HIV + patients in therapeutic failure. In the year 2017, a second INI was introduced into ART of patients newly diagnosed with HIV-1, Dolutegravir, which had a higher genetic barrier and a single daily dose, replaced Efavirenz in the first line of treatment. However, despite the efficiency of INI, the emergence of viral variants resistant to these drugs is inevitable. For this reason, it is necessary to monitor resistance mutations to INI, which may lead to therapeutic failure, aiming at optimizing the therapeutic regimen and controlling HIV infection. The objective of this study was to evaluate the occurrence of INI mutations and the resistance profile in HIV + / AIDS patients in the city of Jataí/Goiás. The complete IN gene was sequenced from samples from INI-naive patients. Resistance mutations were identified by the Stanford-HIV and IAS-USA database. Viral subtypes were identified by phylogenetic analysis. Among the 52 samples analyzed, no primary mutation was identified. Two accessory mutations (T97A / G163K) were identified and these induce a low level of INI resistance. In total, 152 polymorphisms were identified. The most prevalent subtype was subtype B. Therefore, these data demonstrate that the IN region is still highly conserved, encouraging the use of INI in HIV-1 therapy, and assist in the mapping of HIV-1 genetic diversity in the Southwest region of Goiás.

Keywords: HIV-1, Resistance, Diversity and Integrase.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Classificação e Aspectos Epidemiológicos do HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), é classificado como um retrovírus pertencente à ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae*, do gênero *Lentivirus* (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - <https://talk.ictvonline.org/> Acesso: 12/04/2018 às 13:14) e originou-se de transmissões zoonóticas múltiplas de vírus da imunodeficiência símia (SIV) de primatas não humanos para humanos na África Ocidental e Central, no início do século XX. O HIV é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) identificada na década de 80, nos Estados Unidos da América (EUA) em jovens homossexuais. O vírus ataca o sistema imune e causa grave depressão da imunidade celular, tornando o indivíduo suscetível à infecções oportunistas podendo levar até a morte (BARRÉ-SINOUSI, 1983; MAARTENS et al., 2014).

Um resumo global da epidemia do HIV estima que atualmente existem 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV/AIDS no mundo. Ocorreram cerca de 1 milhão de mortes relacionadas à AIDS e 1,8 milhões de novos casos de infecções pelo HIV no ano de 2016. As regiões que mais apresentam casos de infecção pelo HIV concentram-se nas regiões leste e sul do continente africano, apresentando em torno de 19 milhões de pessoas infectadas (UNAIDS, 2016).

Em geral, o número de infecções pelo HIV no mundo se estabilizou, e, o número de novos casos reduziu de 3,1 milhões em 2000, para 1,8 milhões em 2016. O número de mortes relacionadas ao HIV também reduziu, de 1,6 milhões em 2000, para 800.000 em 2016, o que conseqüentemente elevou o número de pessoas vivendo com o HIV no mundo, que em 2000 era em torno de 28,6 milhões de pessoas, e, atualmente este número está em torno de 36,7 milhões. Nas últimas estatísticas realizadas, a sobrevivência dos indivíduos infectados com o HIV aumentou de maneira significativa, e acredita-se que isto é devido ao maior acesso destes indivíduos à terapia antirretroviral (TARV). Acredita-se também que a diminuição da taxa de novos casos são em decorrência da expansão de programas de prevenção da transmissão do vírus tanto por contato sexual quanto vertical (FETTIG et al., 2016).

No Brasil, a estimativa do número de pessoas vivendo com HIV/AIDS é de 830.000 pessoas, sendo 48.000 novos casos da infecção e 14.000 mortes relacionadas à AIDS em 2016 (UNAIDS,2016).

De acordo com o Boletim Epidemiológico do Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde, do ano de 2007 até junho de 2017, foram notificados 194.217 casos de infecção pelo HIV no país, sendo que, a região Sudeste contém o maior número de casos, 96.439 (49,7%), seguido pelas regiões Sul, 40.275 casos (20,7%), Nordeste com 30.297 casos (15,6%), Norte com 14.275 casos (7,4%) e a região Centro-Oeste com 12.931 casos (6,7%). As populações-chaves que compõem a maior parte das pessoas infectadas pelo HIV compõem de indivíduos do sexo masculino, homossexuais, com idade média entre 20 e 34 anos de idade, ressaltando que estas estimativas foram realizadas de acordo com os número de casos notificados (BRASIL, 2017a).

Na região Centro-Oeste, Goiás é o estado com maior número de casos de HIV notificados, de 2007 a 2017 foram notificados 5390 casos de infecção pelo HIV, cerca de 42% do total de número de casos da região Centro-Oeste, que era em torno de 12.931 casos até junho de 2017. O primeiro caso notificado neste estado ocorreu no ano de 1984, em um homem homossexual de 30 anos de idade, e de lá para cá, 14.701 casos de AIDS já foram notificados e ocorreram cerca de 5.353 óbitos relacionados ao HIV (BRASIL, 2017b).

Em Goiás, a maioria dos casos notificados por infecção pelo HIV são em homens (75%), a faixa etária dos pacientes se encontram entre 20 a 29 anos. A Região de Saúde do estado de Goiás com os maiores números de casos foram na Regional Central, com 50,1% dos casos (2700). Em gestantes infectadas com HIV, 1.642 casos foram notificados 2000 até 30 de junho de 2017 (BRASIL, 2017b).

1.2 Diversidade Genética do HIV-1

De acordo com diferenças genômicas e filogenéticas, o HIV pode ser classificado em dois tipos: HIV-1 e HIV-2. Em termos gerais, estes dois tipos de HIV se diferem quanto a transmissibilidade, virulência e distribuição geográfica mas, são transmitidos da mesma forma, principalmente por contato sexual, seguido de contato com sangue e seus componentes contaminados (transfusões e no compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas) (MAARTENS et al., 2014).

O HIV-1 apresenta viremia mais elevada e é o responsável pela pandemia da infecção. Já o HIV-2 é praticamente restrito ao oeste da África e a maioria dos indivíduos não progridem para a AIDS (CAMPBELL-YESUFU & GANDHI, 2011).

A infecção pelo HIV-1 é caracterizada pela grande diversidade genética do vírus, e isto ocorre devido a alguns fatores entre estes, a principal causa é a falta de mecanismos de correção da enzima viral, transcriptase reversa (TR), esta enzima no momento da transcrição reversa pode promover substituição de nucleotídeos, bem como, deleções e inserções de nucleotídeos, e, por não possuir capacidade de correção resulta na geração de novas variantes virais. Outro fator importante que contribui para a diversidade genética do HIV é sua taxa de replicação elevada, que gera em torno de 10^{10} novos vírions por dia. O tempo de meia vida de vírus no plasma e em células produtoras de vírus é muito curto, cerca de dois dias, por isso, o vírus do HIV possui rápido “turnover”, que em combinação com a ocorrência de substituições, deleções e inserções contribuem para emergência de variantes mutantes e até resistentes a terapia (SANTOS & SOARES, 2010; SANTORO & PERNO, 2013). Por todos esses fatores descritos, genomas mutantes podem ser gerados, resultando em variantes virais com genomas intimamente relacionados, porém não idênticos, conhecidos como *quasispécies* (ANDINO & DOMINGO, 2015).

Devido a esta grande diversidade, o HIV-1 é dividido em 4 grupos (M, N, O e P), e, cada grupo resultou de um evento independente de transmissão de espécies cruzadas de vírus da imunodeficiência simiana (SIVs) em macacos africanos. Embora os grupos M e N tenham sido atribuídos à infecção em chimpanzés no sul de Camarões, os reservatórios humanos dos grupos O e P tem origem em gorilas da planície ocidental (D'ARC et al., 2015). O grupo M é o mais prevalente, distribuídos por todo o mundo, sendo subdividido em 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K). Os subtipos A e F ainda são subdivididos em sub-subtipos (A1- A5 e F1- F2) (SHARP & HAHN, 2011).

Além dos erros da TR e da capacidade de replicação do HIV, outra estratégia que contribui para a diversidade genética do HIV é sua capacidade de recombinação genética. A recombinação surge quando a enzima TR realiza leitura alternada das fitas de RNA, durante a transcrição reversa, originando genomas heterozigotos. Assim, a recombinação genética pode ocorrer em vírus do mesmo subtipo (intrasubtipos), entre diferentes subtipos (intersubtipos) e ainda em diferentes grupos (intergrupos) (NÁJERA et al., 2002). Quando ocorre a recombinação genética e a infecção destas novas variantes virais são documentadas em mais de 3 indivíduos, estas são conhecidas como formas

recombinantes circulantes (CRFs). Quando uma forma recombinante é identificada mas, não há relatos de transmissão, é definida como uma forma recombinante única (URF) (HEMELAAR et al., 2011). Até o momento, 90 CRFs foram reconhecidas (Los Alamos 2017).

1.3 Distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 no mundo

A distribuição geográfica de subtipos do HIV-1 no mundo é bastante heterogênea, com prevalência regional de variantes específicas relacionadas principalmente aos subtipos do grupo M (Figura 1) (SANTOS & SOARES, 2010).

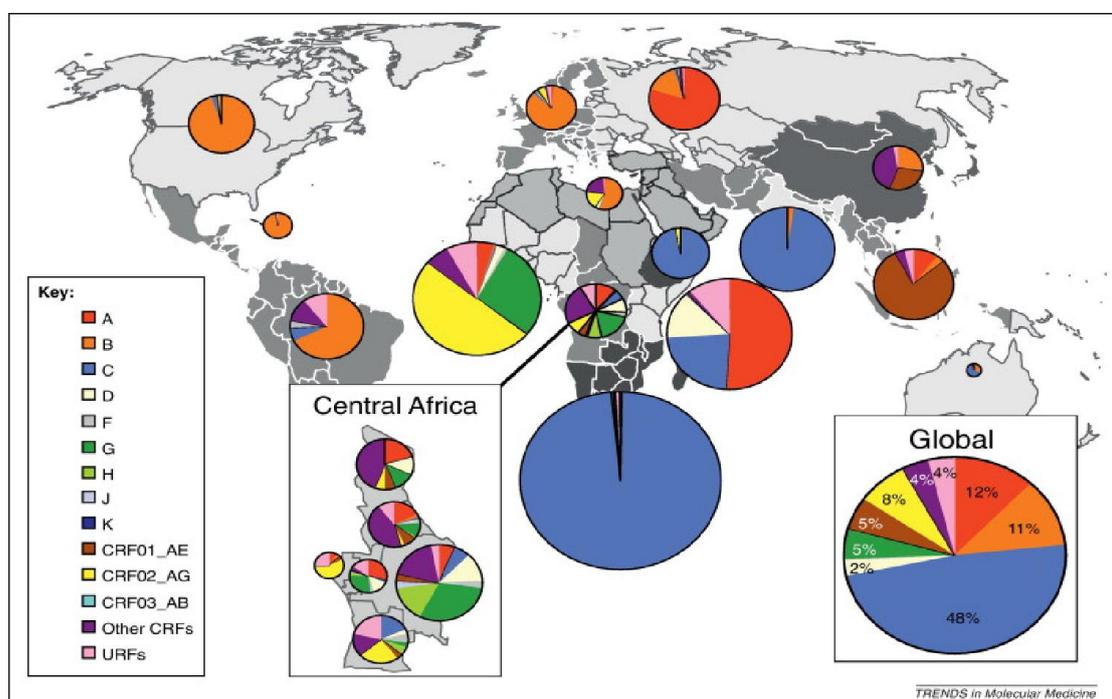


Figura 1: Distribuição geográfica dos subtipos e CRFs no mundo. (HEMELAAR, 2012)

O subtipo C é o subtipo mais prevalente, representado cerca de 48% das infecções mundiais, com predominância em quase todo o continente Africano, mas é encontrado em menor frequência na Índia e no Brasil. O subtipo A é prevalente na África Oriental e Europa e representa cerca de 12% das infecções no mundo (ABECASIS et al., 2013; PATIÑO-GALINDO & GONZÁLEZ-CANDELAS, 2017).

O subtipo B é amplamente disperso pelo mundo e representa cerca de 11% das infecções pelo HIV-1. Evidências filogenéticas sugerem que o subtipo B surgiu como linhagem viral após a disseminação do HIV-1 fora da África. Este subtipo foi introduzido no Haiti em torno de 1966, pela migração humana e após a dispersão localizada, o vírus foi levado aos EUA por volta de 1969, por meio de contato homossexual/bissexual. Em seguida, o vírus se estabeleceu em outras regiões e, se tornou prevalente na Europa, nas Américas (Norte, Sul e Central), na Austrália, no Sudoeste Asiático, no Norte da África e no Oriente médio (JUNQUEIRA & ALMEIDA, 2016).

A prevalência de cepas não-B também foram aumentando gradativamente, devido ao influxo de imigrantes da África e Ásia, mas ocorrem em menor frequência no mundo (CHIN, 2017). Os subtipos D, G, H, J e K ocorrem em menores frequências e podem ser encontrados na África Central e Ocidental (HEMELAAR et al., 2011). O subtipo F representa menos de 1% das infecções mundiais pelo HIV-1, porém é um subtipo extremamente disperso pelo mundo, podendo ser encontrado no leste da Ásia, nas Américas e na África, e, é o subtipo prevalente no noroeste da Espanha (PERNAS et al., 2014).

Com relação às formas recombinantes, aproximadamente 20% das infecções mundiais do HIV-1 são causadas por CRFs, sendo as principais: CRF01_AE que predomina no leste asiático e CRF02_AG com predomínio na África e representam respectivamente 8% e 5 % das infecções do HIV-1 no mundo (TAYLOR et al., 2008; ABECASIS et al., 2013).

1.3.1 Distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 no Brasil

A epidemia brasileira do HIV é caracterizada pela circulação de diferentes subtipos de HIV-1, incluindo os subtipos B, F e C, além de uma série de CRFs envolvendo principalmente os recombinantes BF1 e BC, bem como, várias URFs (DIAZ et al., 2015).

Entre os 14 CRFs_BF1 descritos até o momento, nove originaram no Brasil, sendo seis na região Sudeste do país (CRF28_BF, CRF29_BF, CRF39_BF, CRF40_BF, CRF46_BF e CRF72_BF), duas na região Nordeste (CRF70_BF e CRF71_BF), e uma na região Centro-Oeste (CRF90_BF1) (DE SÁ et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008; SANABANI et al., 2010; PESSÔA et al., 2014a; PESSÔA et al., 2014b; REIS et al., 2017).

A epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil é caracterizada pela prevalência do subtipo B em quase todas as regiões do país, exceto na região sul, onde o subtipo predominante é o subtipo C (Figura 2). (BRINDEIRO et al., 2003; INOCENCIO et al., 2009; CARDOSO et al., 2011; BELLO et al., 2012; DIAZ et al., 2015; LIBRELOTTO et al., 2015). Entretanto, apesar do predomínio do subtipo B, a prevalência relativa de diferentes variantes genéticas do HIV-1 varia entre as regiões do país (DIVINO et al., 2016).

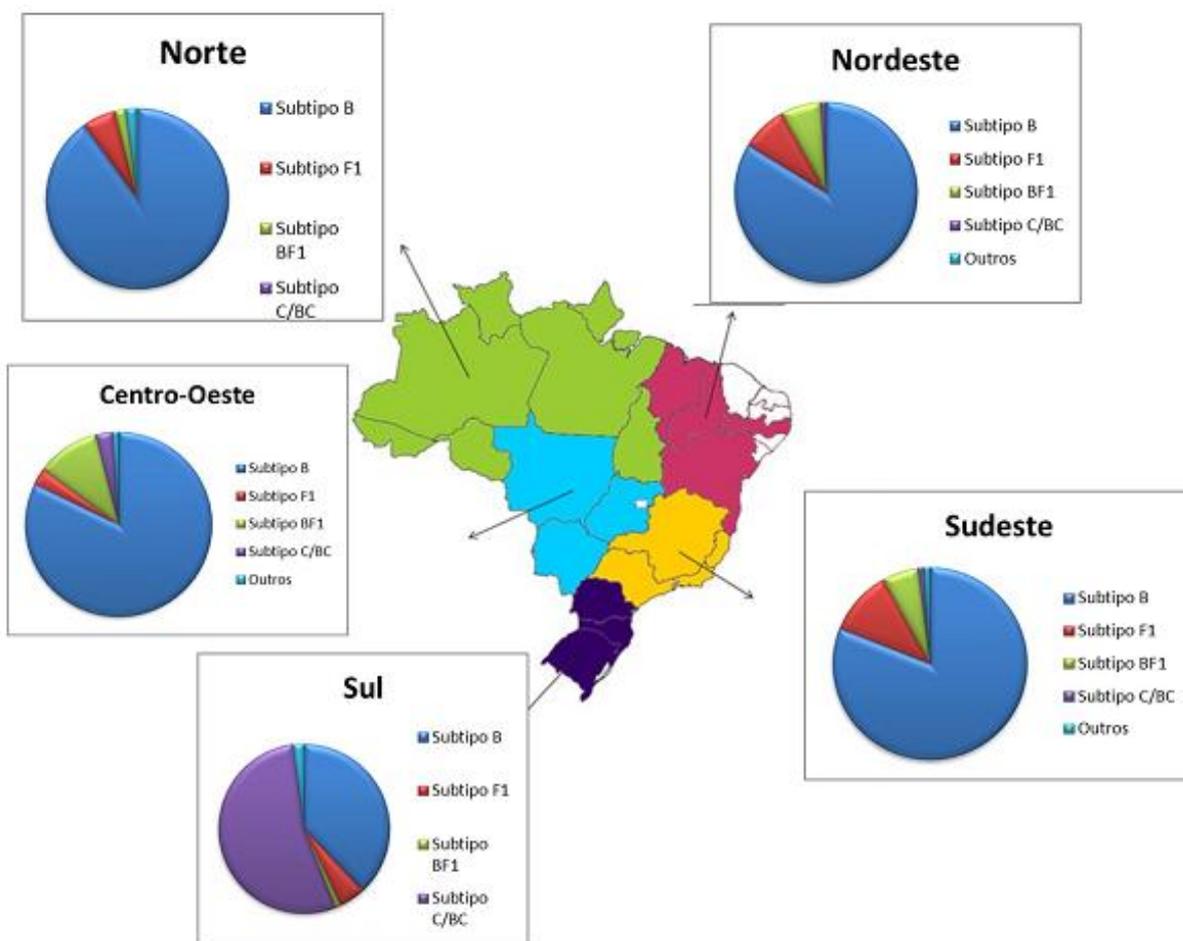


Figura 2: Distribuição dos subtipos do HIV-1 e formas recombinantes no Brasil.

<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19368>

Acesso:28/02/2018 às 13:57

Na região Norte do Brasil, o subtipo do HIV-1 mais prevalente observado é o subtipo B, seguido de formas recombinantes BF1, subtipo F1, subtipo C e recombinantes BC (COSTA et al., 2016). Na região Nordeste ocorreu um aumento constante no número de casos de HIV na última década, onde sua diversidade genética consiste na prevalência

do subtipo B, seguidos pelos subtipos F1, formas recombinante BF1, BC, BCF, CRF02_AG e o subtipo C (DELATORRE, 2017). A epidemiologia molecular do HIV-1 na região Sudeste é bem caracterizada, onde o subtipo prevalente é o subtipo B, seguido pelas formas recombinantes BF1, tais como CRF28_BF e CRF29_BF, o subtipos F1 e em menor número de casos, o subtipo C (SANABANI et al., 2013; VELASCO-DE-CASTRO et al., 2014). A região Sul, diferentemente das demais regiões é caracterizada pela predominância do subtipo C e formas recombinantes BC, como a CRF31_BC, seguido pelos subtipos B, F1 e formas recombinantes BF1 (LIBRELOTTO et al., 2015).

Estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 no Centro-Oeste identificaram a prevalência do subtipo B, seguida de formas recombinantes de BF1 e casos esporádicos de subtipos C e F1 (CARDOSO & STEFANI, 2009; CARDOSO et al., 2011; CARVALHO et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012). Recentemente uma nova forma recombinante BF1 que difere de qualquer conhecido CRF_BF1 relatado até o momento, foi identificada em amostras de pacientes da região Centro-Oeste, nomeada como CRF90_BF1. Esta é primeira CRF identificada nesta região (GRÄF & PINTO, 2013; LIBRELOTTO et al., 2015; REIS, 2017).

1.3.2 Distribuição dos subtipos genéticos do HIV-1 na Região Sudoeste Goiano

O estado de Goiás é dividido em cinco macrorregiões: Nordeste, Centro-Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sudoeste. A região Sudoeste do estado de Goiás, é ainda subdividida em Regiões Sudoeste I e Sudoeste II, onde cada macrorregião possui um município sede da regional de saúde, representando a Secretaria de Estado da Saúde. A macrorregião Sudoeste II, que é a região de estudo deste trabalho, engloba 10 municípios: Aporé, Caiapônia, Chapadão do Céu, Doverlândia, Mineiros, Perolândia, Portelândia, Serranópolis, Santa Rita do Araguaia e o município de Jataí, sendo este o município-sede da macrorregião Sudoeste II. Jataí está localizado a 320 km da capital Goiânia, com população estimada em 98.128 habitantes (Latitude:-17° 52'53''/Longitude: -51° 42'52'') (www.ibge.gov.br; www.saude.go.gov.br).

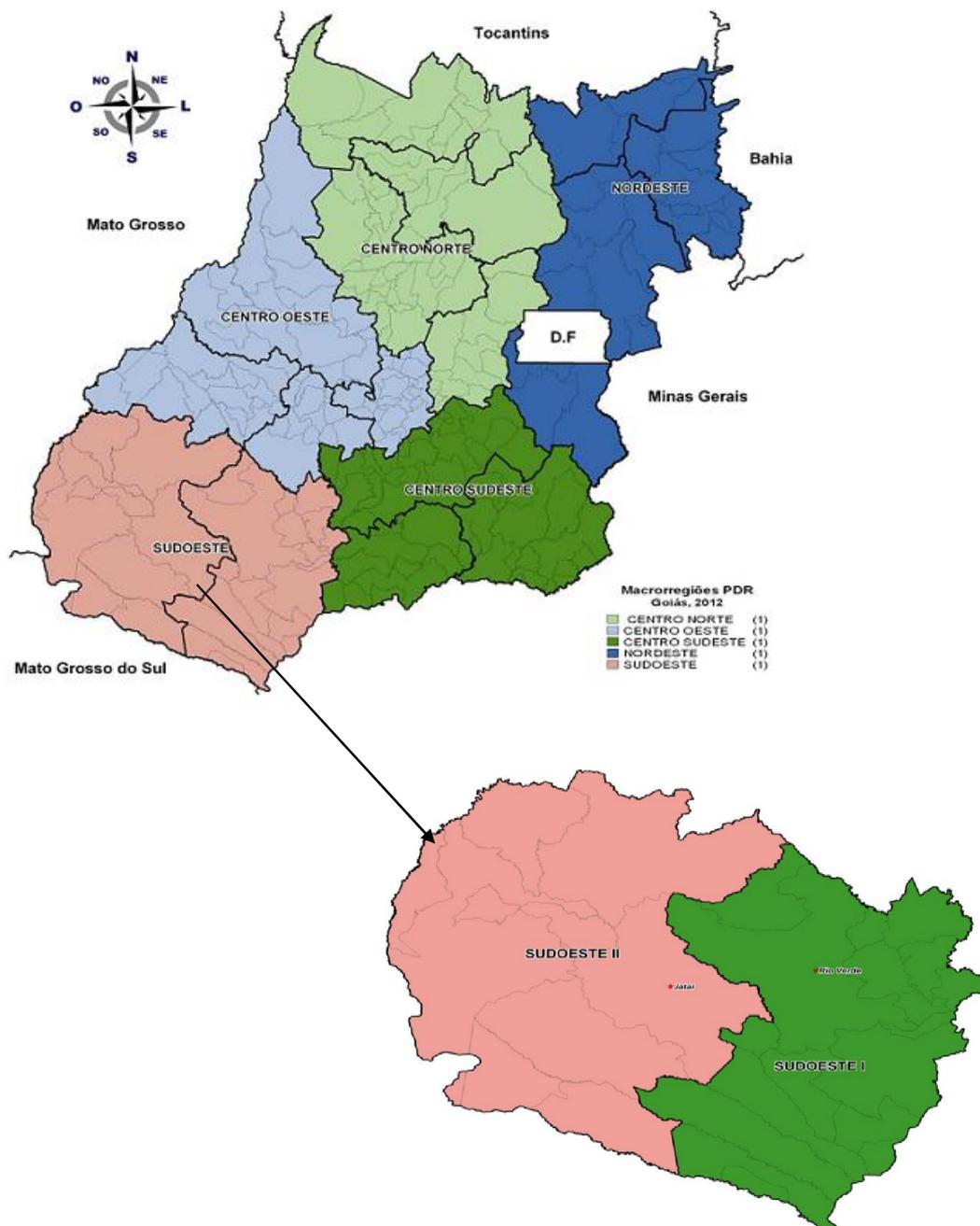


Figura 3: Macrorregiões do Estado de Goiás.

Adaptado de http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_692_anexo.jpg

Acesso : 28/02/2018 às 16:59

Na região Sudoeste II, o primeiro caso de infecção por HIV registrado, ocorreu em 1997, porém, apenas no ano de 2003, em Jataí, foi inaugurado o Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA), onde acontecem ações de diagnóstico e prevenção de HIV/AIDS e outras DSTs. Desde 2005, Jataí possui serviço de diagnóstico de novos casos

de HIV, tratamento e acompanhamento às pessoas vivendo com HIV/aids. Neste ano, a cidade passou a ter uma unidade do Serviço de Assistência Especializada em HIV/AIDS (SAE) (www.jatai.go.gov.br). Segundo recente estudo do nosso grupo de pesquisa (ainda não publicado), desde a abertura do SAE em 2005 até o ano de 2015, 338 casos de AIDS foram notificados na região, sendo 196 homens, 142 mulheres (sendo 69 gestantes), com prevalência de raça/cor parda, e faixa etária na maioria dos casos entre 40-50 anos. (DIAS, 2015- dados não publicados).

Adicionalmente, estudos do nosso grupo de pesquisa, em relação à diversidade genética do HIV-1, realizado em amostras de pacientes da região Sudoeste II do estado de Goiás, mostra prevalência da circulação do subtipo B, seguido pelo subtipo F1 e pelo subtipo C. Poucos isolados mosaicos, envolvendo os subtipos B e F1 foram identificados nesta região (DIAS, 2015; BENTO, 2016 – dados não publicados).

1.4 Estrutura e Genoma do HIV-1

A partícula viral do HIV-1 apresenta morfologia esférica de 100-120 nm de diâmetro, possui envelope constituído por membrana de bicamada lipídica da célula hospedeira, que apresenta um complexo de proteínas tetraméricas de duas subunidades ligadas não covalentemente: a glicoproteína (gp) 120 que é a proteína externa do envelope e a gp41 que é uma proteína transmembrana do envelope. O capsídeo viral formado pela proteína p24 está localizado internamente ao envelope e é internalizado pela proteína de matriz p17. O nucleocapsídeo é composto pelas proteínas p7/p9, o material genético do HIV é formado por duas fitas idênticas de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples polaridade positiva e encontra-se associado à três enzimas virais: transcriptase reversa (TR), protease (PR) e integrase (IN) (Figura 4) (SIERRA et al., 2005).

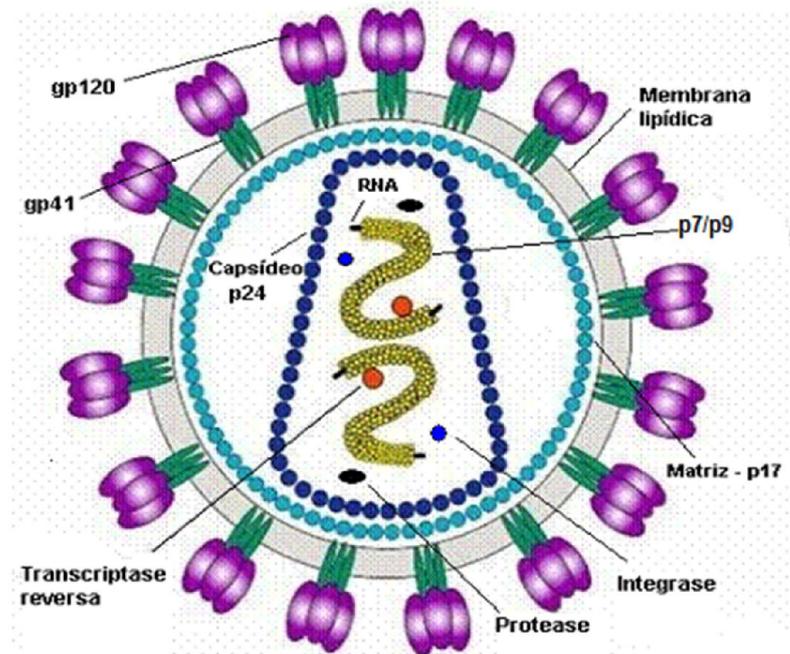


Figura 4: Figura Esquemática da partícula do vírus do HIV-1. (Adaptado de <https://web.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>) Acesso: 28/02/2018 às 16:47

A estrutura genômica do HIV-1 consiste em duas moléculas de RNA de cadeia simples idênticas que estão incluídas da partícula do vírus, possui 9,2 kilobases (kb) de comprimento e em ambas as extremidades possui repetições terminais longas do inglês, *Long Terminal Reptitions* (LTRs), que são sequências idênticas que regulam a interação do genoma viral com o genoma do hospedeiro para a transcrição de genes na direção 5'-3' (Figura 5). Entre as LTR's existem nove genes, que codificam proteínas que desempenham papéis essenciais durante o ciclo do HIV, sendo: três estruturais (*gag*, *env* e *pol*), dois reguladores (*tat* e *rev*) e quatro acessórios (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) (BARRÉ-SINOUSSE, 1996; NKEZE et al., 2015; SEITZ, 2016).

O gene *gag* codifica um precursor de 55 kDaltons (kD), que sofre clivagem e gera novas proteínas virais: a proteína p17 da matriz, a proteína p24 do capsídeo e as proteínas p7/p9 do nucleocapsídeo (SUNDQUIST & KRAUSSLICH, 2012). O gene *env* codifica a proteína precursora do envelope gp160, que posteriormente será clivada dando origem as glicoproteínas gp120 e gp41, que estão envolvidas na interação, reconhecimento e promoção da fusão das membranas viral (BENJELLOUN et al., 2012). O gene *pol* codifica as enzimas virais: a TR (p51) que é responsável pela síntese de ácido

desoxirribonucleico (DNA) a partir de RNA viral, a PR (p12) que gera por sucessivas clivagens proteínas individuais através de precursores de *gag* e *pol* e a IN (p32) que integra o DNA viral no genoma do hospedeiro, denominado provírus (NKEZE et al., 2015). Além da função de integração, a IN também auxilia no ciclo replicativo, como na cooperação da transcrição reversa e na importação nuclear de complexos de pré-integração (MULDER et al., 2002).

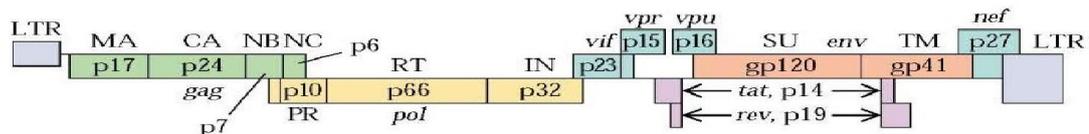


Figura 5: Esquema da organização genômica do HIV-1.

(Adaptado de <http://what-when-how.com/acp-medicine/human-retroviral-infections-part-1/>) Acesso: 29/03/2017 às 09:13

Em relação à IN, cuja região é alvo deste estudo, esta enzima possui 288 aminoácidos e sua estrutura é dividida em três domínios funcionais (Figura 6): domínio N-terminal (NTD) formado pelos aminoácidos de 1 à 49 responsável por facilitar a multimerização da IN e possui o motivo HHCC (H12, H16, C40 e C43), na qual se liga o zinco; o domínio nuclear catalítico (CCD) formado pelos aminoácidos de 50 à 211 onde está presente o sítio de ligação do DNA viral e possui o motivo DDE (Asp64, Asp116, Glu152), responsável por coordenar o íon de magnésio e, o domínio C-terminal (CTD) formado pelos aminoácidos de 212 à 288 onde se liga o DNA do hospedeiro (BOJJA et al., 2011; ENGELMAN & CHEREPANOV, 2014).

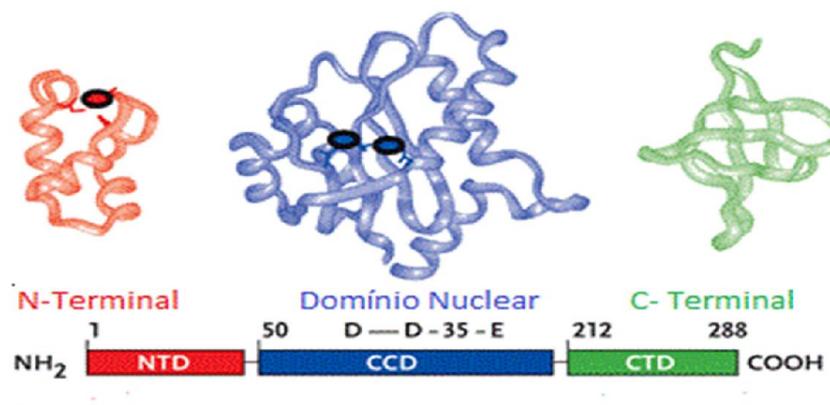


Figura 6: Estrutura dos três domínios da integrase.

(Adaptado de LOW; MUESING, 2006)

Os genes reguladores e acessórios possuem diversas funções no ciclo replicativo do HIV-1. A função da proteína *tat* é de regular positivamente a transcrição de RNA a partir do promotor viral na região U3 das LTR's por meio da ligação aos RNAs recém-transcritos. A proteína *rev* promove o transporte de RNA mensageiros (RNAm) do núcleo para o citoplasma para que sirvam como molde na tradução de proteínas estruturais, assim ausência de *rev*, estas proteínas não são codificadas. A proteína *nef* está envolvida na replicação eficiente *in vivo*. As proteínas *vif* e *vpu* estão envolvidas respectivamente na infecciosidade dos vírions livres e na liberação de novos vírions por brotamento à partir de células infectadas. A proteína *vpr* está envolvida na replicação do HIV-1 em células que não se dividem (RAJARAPU, 2014; SEITZ, 2016).

1.5 Ciclo de Replicação do HIV-1

O ciclo replicativo do HIV-1 inicia-se com a ligação dos vírions à superfície das células do hospedeiro mediada pela interação da gp120 com receptores celulares de linfócitos T CD4+, macrófagos e células dendríticas (CD) (Figura 7) (SIERRA et al., 2005). O CD4 é o receptor primário do HIV-1, mas apenas sua ligação não é o suficiente para garantir o estabelecimento da infecção na célula hospedeira pelo vírus do HIV-1, indicando a necessidade de fatores adicionais para a entrada viral. Estes fatores adicionais são os chamados co-receptores, formados principalmente pelos receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4. O CXCR4 medeia a entrada do HIV-1 em células T CD4+, enquanto o CCR5 medeia a entrada em macrófagos e CD. Essa escolha de receptor é conhecida como tropismo viral. Normalmente, nas fases iniciais da doença, o co-receptor utilizado é o CCR5. Com a progressão da doença pode ocorrer a variação do gene *env* alterando o tropismo viral para o CXCR4 (CONNOR, 1997). Os vírus com tropismo para o receptor CXCR4 estão associados a um declínio na contagem de células T CD4+, formação de sincício e progressão para a AIDS (DAAR et al., 2007).

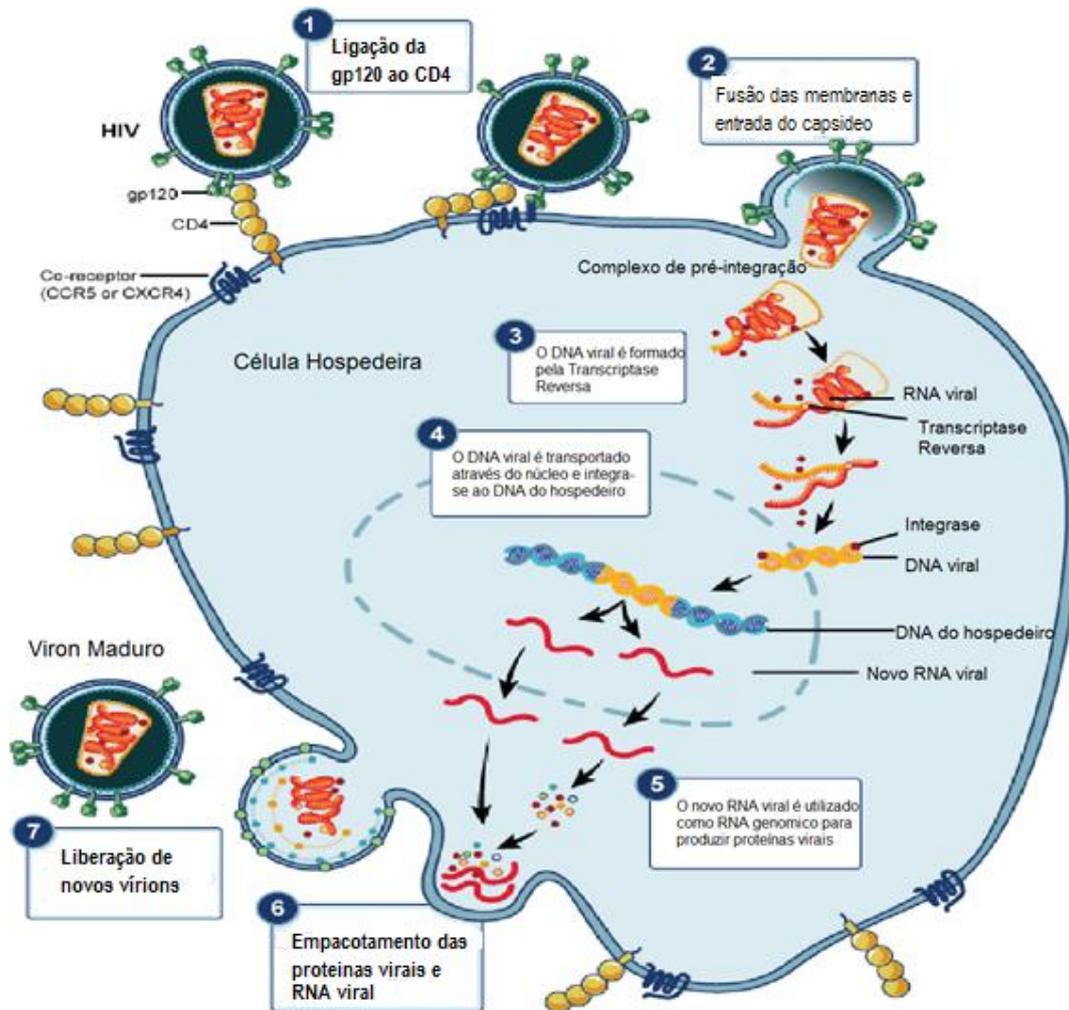


Figura 7: Esquema representativo do ciclo de replicação do HIV-1.

Adaptado de

([http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/nurse/bacchalo ur%20of%20sciences%20in%20nurses/ptn/microbiology/2/29%20Retroviruses.%20HI V.%20%20.htm](http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/micbio/classes_stud/en/nurse/bacchalo%20ur%20of%20sciences%20in%20nurses/ptn/microbiology/2/29%20Retroviruses.%20HI%20V.%20%20.htm)) Acesso: 07/03/2017 às 13:58

A ligação da gp120 ao CD4 forma um complexo intermediário que desencadeia uma série de mudanças conformacionais, com a ativação da gp41 e exposição de sua região hidrofóbica amino-terminal, rica em glicina, conhecido como peptídeos de fusão. Os peptídeos de fusão inserem-se na membrana da célula alvo e são formados complexos de seis hélices do tipo “bobina enrolada” de sua região de repetição (hepta) conhecidos como HR1 e HR2. Estas regiões hepta aproximam a membrana viral com a celular permitindo a fusão da membrana viral com a membrana da célula hospedeira. Além disso, poros de fusão são formados permitindo a entrada do capsídeo viral no citoplasma celular (CHAN & KIM, 1998; PANCERA et al., 2010).

No citoplasma, ocorre a ativação da enzima TR, onde o RNA viral é retrotranscrito em DNA complementar (DNAc), que é transportado para o núcleo da célula hospedeira mediante complexos de pré-integração. Após a retrotranscrição do DNAc, uma ribonuclease da TR, que promove a degradação de RNA (RNAase), degrada o modelo do RNA viral híbrido com DNA, para que ocorra o complemento da molécula pela ação da DNA polimerase (CHINEN & SHEARER, 2002; SUZUKI & CRAIGIE, 2007). Após a produção do DNAc seu transporte para o núcleo, a enzima IN realiza o processo de integração do DNAc no material genético da célula hospedeira, que é dividido em duas etapas, conhecidas como etapa do processamento da extremidade 3' e a etapa de transferência de cadeia (Figura 8) (JASKOLSKI et al., 2010).

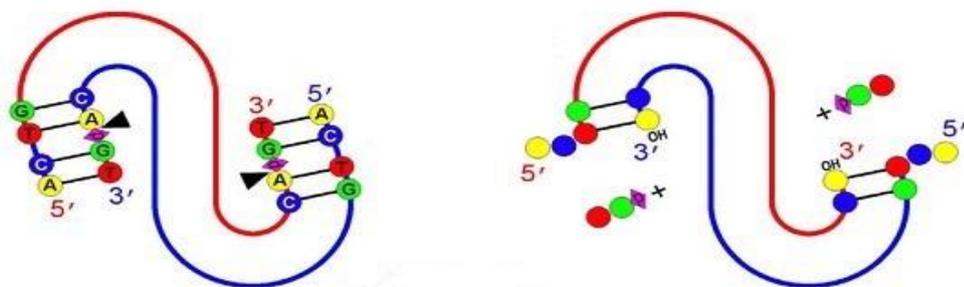


Figura 8: Esquema representativo do processamento 3'.
(Adaptado de JASKOLSKI et al., 2010)

A 1ª etapa da integração ocorre no citoplasma da células infectada, onde a IN reconhece sequências específicas das LTRs e cliva dois nucleotídeos GT das extremidades 3' do DNA viral (indicado pelas setas na Figura 7), expondo nucleotídeos CA e gerando extremidades com grupo hidroxila (OH) reativo (ENGELMAN & CHEREPANOV, 2014). Ainda no citoplasma forma-se o complexo de pré-integração que é constituído pelo DNA viral e várias proteínas virais e celulares, como a IN, proteína da matriz, TR, Vpr e fator de crescimento celular derivado do cristalino (LEDGF)/p75 onde o complexo transporta o DNA viral para o núcleo por meio de microtúbulos. Após a entrada no núcleo, a proteína LEDGF/p75 estabiliza o complexo de pré-integração ao cromossomo do hospedeiro para que ocorra a integração (SUZUKI & CRAIGIE, 2007).

A 2ª etapa ocorre no núcleo, na reação de transferência de cadeia, o grupo OH reativo da extremidade 3' cliva o cromossomo do hospedeiro, causando um corte escalonado de 5 pares de bases (pb), formando ligações covalentes entre a extremidade 3'-OH do DNA viral com a extremidade 5'-fostato do DNA da célula hospedeira (LOW; MUESING, 2006). Quando o DNA viral é inserido ao DNA da células hospedeira, forma-

se o provírus, que servirá de molde para a formação do RNA genômico e RNAm pela célula hospedeira quando for ativada (LATAILLADE et al., 2007; VLADAR et al., 2015). A análise da atuação da IN demonstra que a enzima é um importante alvo para inibição da replicação viral por meio do bloqueio da integração do DNA viral ao da célula hospedeira, onde uma vez impedido o processo de integração, o vírus não será capaz de se replicar (Figura 9) (FITZKEE et al., 2010).

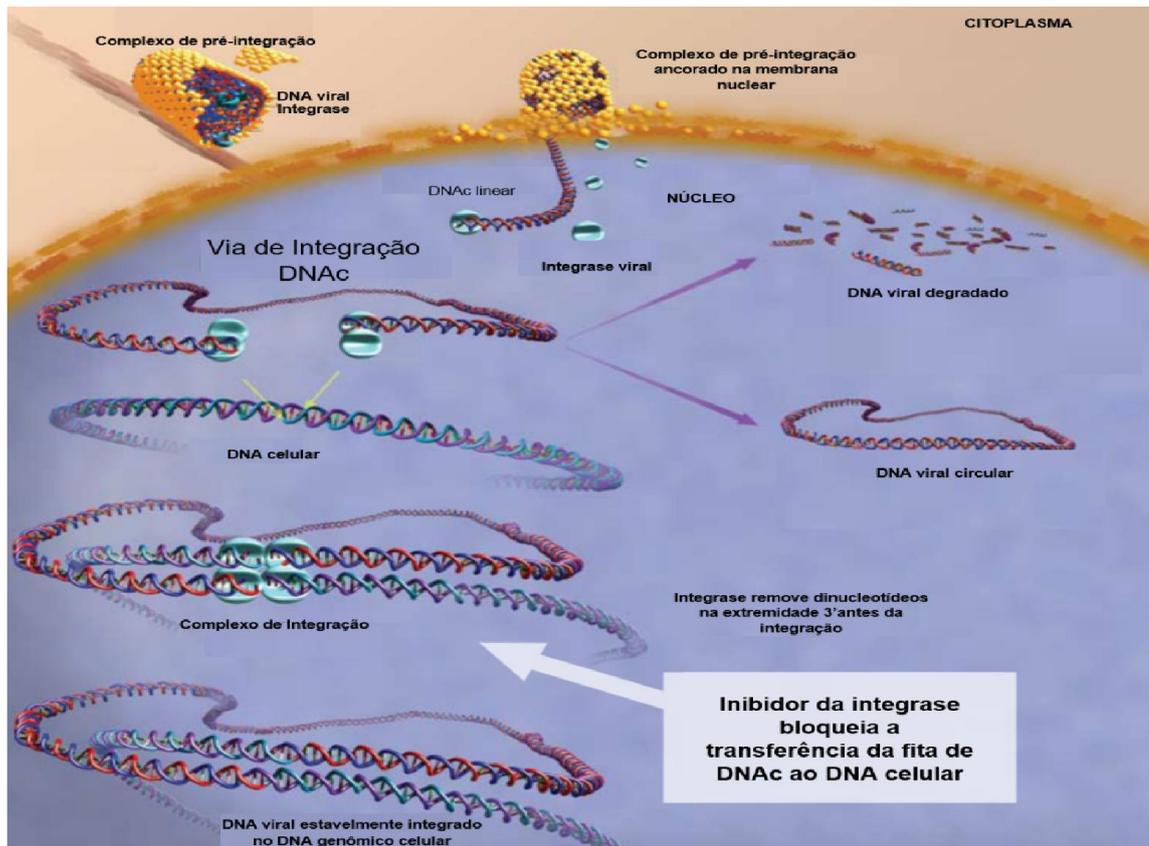


Figura 9: Integração do DNA complementar do HIV-1 no genoma do hospedeiro. (Adaptado de EVERING, 2008)

Uma vez que o DNA proviral está integrado, as primeiras rodadas de transcrição proviral é feita pela RNA polimerase II celular que produz quantidades basais de Tat, Rev e Nef, onde Tat controla a transcrição adicional de genes HIV-1. Inicialmente são transcritos os genes reguladores e acessórios, depois a proteína Rev promove a mudança para a transcrição dos genes estruturais, que codificam as proteínas do envelope, matriz, capsídeo e as enzimas virais (SIERRA et al., 2005). A montagem das novas partículas virais é realizada pelo empacotamento das proteínas estruturais da matriz (p17), do

capsídeo (p24) e as do nucleocapsídeo (p7/p9), com as enzimas virais (TR, PR e IN) e o RNA viral (GREENE, 2007). A liberação é realizada por brotamento através da membrana celular, forando o envelope viral. Esses novos vírions se disseminam infectando novas células, e assim continuando o ciclo infeccioso do HIV-1 (GOMEZ & HOPE, 2005).

1.6 Resposta Imune Contra o HIV

1.6.1 Resposta Imune Inata

A resposta inata é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos. Os mecanismos efetores desta resposta imune inicial são compostos pela barreira epitelial, o sistema complemento, macrófagos, células naturais killers (NK), CDs e peptídeos antimicrobianos, como defensinas e lactoferrinas (QUARANTA et al., 2012).

As defensinas são peptídeos antimicrobianos encontrados em leucócitos e produzidas por células epiteliais. Constituem-se em proteínas catiônicas, ricas em cisteínas e possuem atividade anti-HIV, tanto pela inativação direta das partículas virais quanto por agir em células suscetíveis ao HIV, inibindo a replicação. No entanto, é pouco provável que estes componentes antivirais possam proteger contra a infecção de forma eficaz (CHANG et al., 2005). Outro peptídeo antimicrobiano descrito é a lactoferrina, presente no leite materno e em secreções, que possui atividade antiviral por meio de sua ligação à DC-SIGN (molécula intercelular tipo 3 grambina não-integrina), que é uma lectina tipo C e atua como molécula de adesão, evitando a ligação do HIV e assim, a infecção. O leite materno possui outros fatores com potente atividade antiviral. Uma nova proteína de peso molecular, a Tenascin-C, foi encontrada no leite materno, com capacidade de inibir a infecção pelo HIV *in vitro*, por meio da neutralização pela ligação aos co-receptores de quimiocinas (GROOT et al., 2005; FOUDA et al., 2013).

As CDs são os primeiros alvos do HIV-1 após sua entrada no hospedeiro, e estas células apresentam alguns subconjuntos: as CDs plasmocitóides (CDp) que secretam interferon tipo 1 (IFN-1) e confere imunidade antiviral às células vizinhas; as CDs mielóides (CDm) que secretam citocinas que ativam as células NK e as células de Langerhans, que são CDs especializadas presentes no epitélio de mucosas (WU & KEWALRAMANI, 2006; DERBY et al., 2011). Na infecção crônica pelo HIV-1, as CDp promovem a depleção de células linfóides inatas (ILC), que é um tipo de linfócito, que

orquestram respostas imunes e auxiliam na homeostase do tecido, mas não expressam receptores de reconhecimento de antígenos adaptativos, uma vez que sua ativação e expansão ocorrem por sinais de citocinas do tecido. As ILCs podem ser classificadas em 1, 2 ou 3, e as ILC3 são as células que interagem com CDs, e por meio da ativação das DCp, indução de IFN-I e apoptose mediada por CD95, induz o esgotamento das células ILC3 durante a infecção pelo HIV-1 (ZHANG et al., 2015).

As CDs atuam como ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida mediante à sua atividade de apresentação de antígenos, essencial para a indução da imunidade mediada pelas células T (LORÉ et al., 2005). Quando as CDs entram em contato com o vírus, o HIV-1 se liga à uma molécula CD-SIGN, promovendo a replicação do vírus nas CDs. As CDs infectadas sofrem maturação e migram para os linfonodos, onde atuam como apresentadoras de antígenos às células T. O transporte do vírus do HIV-1 para os linfonodos pelas DCs aumenta a probabilidade de infecção dos linfócitos T CD4⁺ e, conseqüentemente, aumenta a disseminação do vírus pelo organismo. O HIV-1 se concentra na superfície da CDs e no momento em que entra em contato com o linfócito T CD4⁺ forma-se a sinapse virológica, transferindo o HIV-1 para a células alvo mediante a ligação direta com a gp120. As CDs também podem ativar as células NK (GEIJTENBEEK et al., 2000; COLEMAN et al., 2013).

As células NK circulam pelo sangue, vasos linfáticos e tecidos, na procura de células infectadas e representam até 15% dos linfócitos do sangue periférico. Sua principal função é destruir células infectadas por vírus, por meio da citotoxicidade e produção de citocinas pró-inflamatórias. Células NK podem ser subdivididas em diferentes populações, com base na expressão de seus marcadores de superfície. Elas podem ser: CD56^{low}, que são células que produzem grande quantidade de grânulos citotóxicos, possuem maior capacidade lítica e são a maioria das células NK que circulam pelo sangue periférico, ou podem ser CD56^{high}, que são células NKs que secretam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (STABILE et al., 2015).

Durante a infecção, os altos níveis de HIV-1 podem modificar o equilíbrio entre as células NK, dificultando suas funções efetoras antivirais e prejudicando a distribuição das subpopulações de células NK, levando a anergias destas células (MIKULAK et al., 2017). A estimulação da proliferação de células NK, ocorrem por meio das CDs, que secretam interleucinas 12, 15 e 18 (IL-12, IL-15 e IL18). As células NK, por sua vez, secretam interferon gama (IFN- γ), que atua ativando macrófagos, que além de serem

fagócitos, produzem citocinas pró-inflamatórias e recrutam outras células de defesa, como os neutrófilos (SAEZ-CIRION et al., 2014).

Os macrófagos desempenham um papel importante na resposta imune. Além de fagocitarem os agentes patogênicos, atuam como APC, através da via MHC-II para células T CD4⁺ e ativam células T CD8⁺. Outra função dos macrófagos é a secreção de citocinas pró-inflamatórias, que também contribui para o estabelecimento da infecção, pois uma vez secretadas, as citocinas pró-inflamatórias dos macrófagos, atraem outras células para o local da resposta imune, no entanto, na infecção pelo HIV-1 isto pode facilitar a disseminação do vírus pelas células do sistema imune (CLAPHAM & MCKNIGHT, 2001; KOPPENSTEINER & WU, 2012).

Algumas quimiocinas do tipo CC como RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β produzidas pela ativação de macrófagos, CDs, células T e NK podem bloquear a entrada do HIV-1 nas células pela competição do uso dos co-receptores CCR5 das células alvo. Porém, apesar dos macrófagos, CDs e NK serem as principais células da imunidade inata contra o vírus do HIV-1, também são células alvo do vírus, uma vez que todas estas células expressam a molécula receptora CD4 e os co-receptores CCR5 e CXCR4, sendo suscetíveis ao HIV-1. (QUARANTA et al., 2012).

1.6.2 Resposta Imune Adaptativa

A imunidade adaptativa refere-se a mecanismos de defesa específicos contra o antígeno. As respostas imunes adaptativas são divididas em imunidade mediada por células T, que envolve a produção de linfócitos T citotóxicos (CTL), macrófagos, células NK e produção de citocinas em resposta a um antígeno e a imunidade humoral que é mediada por linfócitos B e envolve a produção de anticorpos em resposta ao antígeno. (QUARANTA et al., 2012).

Durante a infecção primária, antes da soroconversão há um aumento do número de linfócitos T CD8⁺ ou CTL que possuem a função de eliminar estas células infectadas. Porém, apesar de não ser suscetível ao HIV-1, a expansão clonal exacerbada dos CTLs pode sobrecarregar a resposta imune, resultando em anergia das células T, desviando a maturação de linfócitos T CD8⁺ e suprimindo a resposta específica. O HIV-1 também pode afetar a expressão das moléculas de MHC classe I comprometendo o reconhecimento de células infectadas pelos linfócitos T CD8⁺ (SLEASMAN & GOODENOW, 2003; SIERRA et al., 2005).

Os linfócitos T CD4⁺ são o principal alvo do HIV-1, levando a diminuição de seus níveis por meio de mecanismos de depleção como a destruição de células infectadas pelos CTL, apoptose devido aos efeitos citopáticos causado pelo vírus e a regeneração diminuída de linfócitos causada pela sobrecarga do sistema imune (COSTIN, 2007). As células T CD4⁺ reconhecem antígenos por meio do MHC de classe II, secretam citocinas que ativam macrófagos e além disso, são de grande importância para auxiliar as CDs a ativar células T CD8⁺ específicas e estimular as células B a produzirem anticorpos neutralizantes. Por isso, a redução do número de células T CD4⁺ afeta toda a resposta imune contra o HIV-1 e a deficiência imunológica causada pelo HIV-1 é determinada pelo equilíbrio dinâmico entre a eliminação e a produção de novas células T CD4⁺. Assim, a determinação do grau de supressão imunológica pelo HIV baseia-se principalmente na avaliação da contagem de células T CD4⁺ (SLEASMAN & GOODENOW, 2003; SAEZ-CIRION et al., 2014).

A infecção pelo HIV provoca uma resposta de anticorpos que tem como alvo a proteína gp120 do envelope do HIV. Estes anticorpos são chamados de anticorpos neutralizantes, produzidos pelas células B, e são importantes para a redução da viremia, pois sua ligação por meio da gp120 medeia a destruição das partículas virais pelos fagócitos, reduzindo a carga viral. Porém, estes anticorpos somente são gerados após meses do estabelecimento da infecção e sua presença não é capaz de controlar de forma drástica a carga viral do HIV-1, uma vez que o HIV-1 já desenvolveu mecanismos capazes de evadir da ação dos anticorpos neutralizantes mediante alterações conformacionais da gp120 induzidas por mutações (SIERRA et al., 2005; SAEZ-CIRION et al., 2014).

Apesar dos esforços do sistema imune para tentar combater o HIV-1, a resposta imune não é capaz de impedir a disseminação ou erradicar o vírus, que levará a uma deficiência no sistema imune do hospedeiro. A redução no número de linfócitos T CD4⁺ leva a progressão à AIDS, tornando o indivíduo suscetível a infecções oportunistas, podendo leva-ló a morte (SAEZ-CIRION et al., 2014).

1.7 Curso da Infecção do HIV-1

O primeiro estágio da infecção pelo HIV-1 é conhecido como infecção primária ou fase aguda, caracterizado por uma síndrome transitória sintomática ou não, da qual ocorre intensa replicação viral e pode durar algumas semanas. Os sinais e sintomas que

ocorrem durante esta fase não são reconhecidos como indicadores da doença e são semelhantes aos de uma síndrome viral aguda, como febre, erupções cutâneas, fadiga, mialgias, cefaleia, faringite e úlceras orais, e tem duração média de 1 a 2 semanas (HOENIGL et al., 2016). Devido à natureza inespecífica dos sinais e sintomas, o diagnóstico durante a fase aguda ainda é um desafio (ARYA et al., 2015).

Conforme o sistema imune é ativado, a carga viral começa a reduzir e a infecção entra em um período assintomático que pode durar até 10 anos, conhecido como latência clínica (ARYA et al., 2015). Os níveis plasmáticos virais podem chegar a ser indetectáveis durante a TARV, entretanto, a ausência de sintomas não significa que não haja replicação viral. A replicação do HIV-1 mesmo que reduzida continua ativa em determinados órgãos linfóides (MCCUNE, 1995).

Quando a TARV é interrompida, ocorre o reaparecimento da replicação viral no sangue periférico. Este fato ocorre devido a presença de reservatórios virais que reabastecem a infecção do HIV-1 (WILLIAMS & GREENE, 2007). Estes reservatórios são formados por subconjuntos de células T CD4⁺ em repouso que estão infectadas com o provírus integrado. O HIV-1 explora a memória imunológica dos linfócitos T de longa duração, e estas células T CD4⁺ que foram ativadas e infectadas sobrevivem aos efeitos citopáticos do HIV-1 e retornam ao estado de repouso com o vírus transcrito, mas silencioso (FINZI et al., 1999; SILICIANO & GREENE, 2011). A reativação da células T por qualquer circunstância, seja por antígenos, citocinas ou mitógenos, induz fatores de transcrição que promovem a reativação do provírus, que inicia novamente a replicação viral (RUELAS & GREENE, 2013; DAHABIEH et al., 2015).

A meia vida longa de células T CD4⁺ fazem com que elas sejam reservatórios ideais para o vírus e a sua forma latente não é afetada pela TARV nem pela resposta imune, tornando-os a grande barreira para a erradicação do HIV-1 (MARCELLO, 2006; REZAEI & CAMERON, 2015). Durante a fase de latência clínica ocorre a depleção progressiva dos linfócitos T CD4⁺ e a medida que o sistema imune se torna mais debilitado, a infecção progride (ARYA et al., 2015). A depleção de células T CD4⁺ durante a infecção pelo HIV-1 ocorre predominantemente no trato gastrointestinal, onde residem a maioria deste subconjunto de células, o que pode causar danos na mucosa gastrointestinal, como inflamação e lesão epitelial da mucosa intestinal, resultando em sua ruptura imunológica e estrutural, permitindo a passagem da microbiota intestinal do lúmen do intestino para a circulação sistêmica. Este processo é conhecido como translocação microbiana (BRENCHLEY et al., 2004; MARCHETTI et al., 2013).

A translocação microbina estimula a ativação imunológica sistêmica e indica a progressão da infecção pelo HIV-1 (BRENCHLEY et al., 2006). Sem a capacidade de conter a replicação viral e com a destruição do sistema imunológico, a doença prossegue para sua fase sintomática, a AIDS, caracterizada pelo aumento dos linfonodos, perda de peso, febre e o aparecimento de doenças oportunistas, que na ausência de tratamento podem ser fatais (FANALES-BELASIO et al., 2010).

1.8 Diagnóstico da Infecção Pelo HIV-1

Os ensaios para o diagnóstico do HIV são baseados na detecção do material genético do vírus (RNA viral ou DNA proviral), do antígeno p24 (proteína do capsídeo) e por anticorpos anti-HIV específicos (SIMON et al., 2006; DEEKS et al., 2015). De acordo com o Ministério da Saúde, o diagnóstico da infecção pelo HIV é realizado em duas etapas: a etapa de triagem, que quando o resultado é positivo deve ser confirmado com a etapa complementar/confirmatória (BRASIL, 2016a).

Os métodos de diagnóstico para a triagem podem ser sorológicos (pesquisa de antígenos ou anticorpos), moleculares (detecção de material genético) e ainda testes rápidos. O ensaio imunoenzimático (ELISA) é o método sorológico mais utilizado devido a sua metodologia simples e sua rentabilidade, porém apresentam limitações durante a fase inicial da infecção e em lactantes com até 18 meses, pois, os anticorpos anti-HIV-1 só começam a ser produzidos após a soroconversão, que ocorre cerca de 4 a 8 semanas após a infecção. Baseado na detecção de anticorpos por meio da ligação com o antígeno fixado em fase sólida com a ligação a um segundo anticorpo conjugado com uma enzima, que reage com o substrato alterando sua coloração, que é mensurada por espectrofotômetro (ARYA et al., 2015).

Os primeiros ensaios de ELISA surgiram em 1985, chamados de ELISA de 1ª geração, são sensíveis, porém, menos eficazes em relação a especificidade. Além disto, sua capacidade de detecção de anticorpos era de pouco mais de 40 dias após a infecção (CORNETT & KIRN, 2013). Em 1987, surgiu a 2ª geração do ELISA, que apresenta o mesmo formato indireto, mas com a presença de antígenos e peptídeos recombinantes do HIV ligados a fase sólida, o que aumentou a especificidade do teste, sendo capaz de detectar anticorpos em torno de 33 dias após a infecção (BUTTÒ et al., 2010).

Em 1994, a 3ª geração foi criada em um novo formato, conhecido como “sanduíche”, onde o conjugado com a enzima é formado por peptídeos sintéticos ou

proteínas recombinantes, o que permite detectar todas as classes de anticorpos anti-HIV aumentando a sensibilidade e especificidade, e reduzindo o período de janela para cerca de 22 dias. Em 2010, os ensaios de 4ª geração foram introduzidos, similares aos da geração anterior, mas com a capacidade de detectar antígenos e com o período de janela para 15 dias (BUTTÒ et al., 2010). A detecção do antígeno p24 é realizado por ELISA de 4ª geração, onde o anticorpos específicos são fixados a fase sólida para capturar o antígeno presente na amostra (ARYA et al., 2015).

Os testes moleculares são utilizados para detectar o material genético do vírus (qualitativo), mas também podem ser utilizados para quantificar a carga viral do paciente (quantitativo), o que é uma ferramenta importante para o acompanhamento da TARV. O teste mais utilizado é a PCR (reação em cadeia pela polimerase), que amplifica sequências de DNA's específicas e variações da técnica como a PCR em tempo real (RT-PCR), que utiliza corante fluorescente (ARYA et al., 2015).

Os testes rápidos são aqueles que se obtém resultados em até 30 minutos, podem ser realizados com sangue total obtido por punção venosa ou da polpa digital e ainda por fluidos orais. O mais frequentemente utilizado é a imunocromatografia de fluxo lateral, que se baseia em uma reação de antígeno-anticorpo. Outros testes rápidos utilizados são: imunocromatografia de dupla migração e dispositivos de imunocaptação. Além de sua rapidez e a praticidade do método, outra vantagem do teste rápido é sua alta sensibilidade e especificidade (CORNETT & KIRN, 2013).

Os testes complementares/confirmatórios empregados para a confirmação devem ser mais específicos que os de triagem, para se evitar resultados falsos-positivos. O teste mais utilizado é o Western Blot (FEARON, 2005; BUTTÒ et al., 2010).

Para o monitoramento e acompanhamento da infecção pelo HIV, são utilizados testes de contagem de linfócitos T CD4⁺ e quantificação da carga viral. Estes testes possibilitam avaliar o grau de comprometimento do sistema imune, sua recuperação após o início da TARV, monitorar a eficácia da TARV e detectar precocemente problemas de adesão ao tratamento (BRASIL, 2017).

1.9 Tratamento Antirretroviral - TARV

A TARV contra a infecção pelo HIV-1 não tem a capacidade de eliminar o vírus do organismo, seu objetivo é prolongar a vida dos pacientes e evitar a imunossupressão (DEEKS et al., 2015). A TARV atua bloqueando o ciclo replicativo do vírus, e assim

reduzindo a carga viral. Existem cinco classes de antirretrovirais (ARV): os inibidores nucleosídeos e nucleotídeos da TR (INTR), os inibidores não-nucleosídeos da TR (INNTR), inibidores da PR (IP), inibidores de entrada (IE) e os inibidores da IN (INI) (MAARTENS et al., 2014). O Quadro 1 mostra os ARVs em uso no Brasil.

QUADRO 1. Antirretrovirais disponíveis no Brasil.				
INTR	INNTR	IP	IE	INI
Abacavir (ABC)	Efavirenz	Atazanavir (ATV)	Enfuvirtida	Raltegravir
Didanosina (ddI)	(EFV)	Darunavir (DRV)	(ENF;T-20)	(RAL)
Lamivudina	Etravirina	Fosamprenavir	Maraviroque	Dolutegravir
(3TC)	(ETR)	(FPV)	(MVQ)	(DTG)
Tenofovir (TDF)	Nevirapina	Lopinavir (LPV)		
Zidovudina	(NVP)	Ritonavir (RTV)		
(AZT)		Tipranavir (TPV)		
Estavudina		Saquinavir (SQV)		
(EST)				

IE: Inibidores de Entrada; INI: Inibidores da Integrase; IP: Inibidores da Protease; INNTR: Inibidores Não Nucleosídeos da Transcriptase Reversa; INTR: Inibidores Nucleosídeos da Transcriptase Reversa.

1.9.1 Inibidores Nucleosídeos e Nucleotídeos da Transcriptase Reversa

Os INTR foram os primeiros ARVs aprovados pela *Food and Drug Administration (FDA)*. Estes são administrados em sua forma inativa e necessitam entrar na célula hospedeira e sofrer fosforilação antes de iniciarem seu efeito antiviral (ARTS; HAZUDA, 2012). São análogos à nucleosídeos e nucleotídeos naturais e competem com os desoxinucleotídeos trifosfatados naturais (dNTPs) pela incorporação às novas cadeias de DNA, levando a interrupção da síntese do DNA viral impedindo a transcrição reversa (DEEKS et al., 2015).

1.9.2 Inibidores Não-Nucleosídeos da Transcriptase Reversa

Diferentemente dos INTR, os INNTR não competem com a TR e não necessitam de ativação intracelular, eles se ligam a um local próximo do sítio ativo da enzima e

formam uma bolsa hidrofóbica, o que provoca alterações conformacionais do sítio de ligação que reduz a polimerização, bloqueando o sítio ativo da enzima e impedindo a síntese de DNA (ARTS & HAZUDA, 2012; DEEKS et al., 2015).

1.9.3 Inibidores de Protease

A enzima PR é responsável por clivar os precursores de *gag* e *pol* durante a maturação do vírion. Os IP bloqueiam o funcionamento da enzima mediante ligação ao sítio ativo da PR e inibem a clivagem das poliproteínas precursoras gag-pol, o que impede a maturação dos vírions resultando na liberação de partículas virais imaturas e incapazes de infectar novas células (BHATTI et al., 2016).

1.9.4 Inibidores de Entrada

Os IE atuam bloqueando a entrada do HIV-1 na células hospedeira. Os IE podem agir em várias etapas do processo de ligação do vírus com a célula hospedeira, como na interrupção da ligação da gp120 do vírus com a receptor CD4 da célula hospedeira, inibição de alvos necessário para a ligação completa do vírus como os co-receptores CCR5 e CXCR4, e ainda impedir a fusão do vírus com a célula pela ligação com a gp41 (BHATTI et al., 2016).

1.9.5 Inibidores de Integrase

A IN é responsável pela clivagem de dois nucleotídeos da extremidade 3' do DNA viral, a formação do complexo de pré-integração e a transferência de cadeia, ou seja, a inserção do DNA viral ao material genético da célula hospedeira, e é nesta etapa da integração que os INI atuam. Por isso, também são chamados de inibidores da transferência de cadeia pela IN. Os INI ligam-se ao complexo entre a IN e o DNA viral e interagem com dois cofatores de íons metálicos de magnésio, que não permitem a formação de ligações covalentes, deste modo impedem a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira (ARTS & HAZUDA, 2012).

Existem atualmente três INI aprovados pelo FDA, todos os três atuam inibindo a transferência de cadeia. O primeiro INI foi RAL, aprovado em 2007 e disponibilizado no Brasil à partir de 2009, este INI possui barreira genética superior quando comparado

aos INNTR, deve ser administrado duas vezes ao dia e apresenta alta potência, poucas interações medicamentosas e eventos adversos pouco frequentes e segurança para o uso em coinfeções (HICKS & GULICK, 2009; BRASIL, 2017b). Em 2012, o segundo fármaco aprovado foi o EVG, porém, este não está disponível no Brasil (SHIMURA & KODAMA, 2009). E o mais recentemente aprovado, em agosto de 2013, foi o DTG, considerado INI de segunda geração e disponibilizado no Brasil desde o início de 2017. Por ter vantagens como barreira genética mais elevada que o RAL, alta potência, administração em dose única diária e poucos eventos adversos, garantindo esquemas terapêuticos mais duradouros e seguros, este INI foi aderido ao primeiro esquema de TARV (BRASIL, 2017) (Nota Informativa nº 096, de 2016/DDAHV/SVS/MS).

1.10 Tratamento Antirretroviral no Brasil

Desde 1997, o Ministério da Saúde oferece gratuitamente o acesso universal a TARV para pacientes diagnosticados com HIV. Devido a alta variabilidade genética do HIV-1 é necessário a utilização de vários ARVs combinados no tratamento. Geralmente emprega-se o uso de pelo menos 3 fármacos ativos, conhecido como TARV altamente ativa (HAART) (SIMON et al., 2006).

Durante muito tempo a TARV era adiada até que a contagem de células T CD4⁺ do paciente estivesse abaixo de 200 células por milímetro cúbico (células/mm³), o que resultava em infecções oportunistas frequentes. Porém, pacientes com carga viral elevada e com sintomas mais graves e prolongados durante a infecção aguda pelo HIV-1, estão relacionados com a progressão mais rápida para a AIDS (PEDERSEN et al., 1989 & GATELL et al., 2011). Devido a este fato, acredita-se que a TARV precoce durante a infecção aguda pode trazer potenciais benefícios, com a preservação de respostas imunes específicas, redução da infecciosidade e limitação da disseminação do vírus (KAHN et al., 1998; SMITH et al., 2004).

O Ministério da Saúde, desde 2013 recomenda TARV para todas as pessoas que estejam infectadas pelo HIV/AIDS, independente da contagem de linfócitos, até mesmo para indivíduos assintomáticos. Até no final de 2016, o tratamento inicial, também conhecido como primeira linha de tratamento, baseava-se em dois INTRs (TDF e 3TC) combinados com um INNTR (EFV). Em casos de contraindicação, o TDF era substituído por AZT, ABC ou ddl. Quando este esquema terapêutico não era possível, alterava-se o INNTR por um IP, sendo a segunda linha de tratamento (BRASIL, 2017).

Em janeiro de 2017, o Ministério da Saúde anunciou o início da distribuição do DTG no Brasil, que substituiu o EFV na atual combinação conhecida como “três em um” para pacientes que iniciariam a TARV no mês de fevereiro/2017 (Nota Informativa nº 096, de 2016/DDAHV/SVS/MS). Algumas de suas vantagens sobre os outros INI é sua administração única ao dia, sem a necessidade de aumento de doses e sua barreira genética mais elevada ao desenvolvimento de resistência aos ARVs pelo HIV-1 (OSTERHOLZER & GOLDMAN, 2014). Assim, atualmente o esquema de TARV inicial preferencial para adultos consiste na associação dos ARVs TDF+3TC+ DTG, porém em casos de coinfeção por tuberculose (TB) e em gestantes o DTG deve ser substituído pelo EFV (BRASIL, 2017c).

Em casos de falha virológica, em que, o paciente apresenta resistência a pelo menos um ARV de cada classe, esquemas de resgate composto por alguns desses ARVs: DRV, TPV, DTG, ETR, MQV e T20 podem ser administrados seguindo o consenso da nota informativa nº 007/2017-DDAHV/SVS/MS (BRASIL, 2017c).

1.11 Resistência aos Antirretrovirais

A TARV trouxe vários benefícios aos portadores do HIV, aumentando sua sobrevivência e melhorando sua qualidade de vida. Porém, apesar de seu sucesso, ao longo do tempo, os vírus podem selecionar mutações de resistência aos medicamentos, levando à falha terapêutica. (STADELI & RICHMAN, 2013).

A resistência aos ARVs é causada por mutações nos alvos moleculares dos ARVs, que diminuindo a suscetibilidade do HIV às estas drogas (SHAFER, 2002). Para identificar as mutações, compara-se as diferenças na sequência de aminoácidos dos isolados virais com a estirpe de referência HXB2 do subtipo B do HIV-1, que contém os aminoácidos mais comuns em cada posição do subtipo B do HIV-1 (KORBER et al., 1998). Desta forma, uma mutação é representada pela letra indicativa ao aminoácido consenso, prosseguido pelo número do códon e a letra do aminoácido indicando a mutação. Por exemplo, a mutação M184V, significa que na posição do códon 184, o aminoácido metionina (M) do consenso foi substituído pelo aminoácido valina (V) (SHAFER, 2002).

As mutações de resistência associadas ao HIV podem ser classificadas em primárias ou principais e secundárias ou acessórias. As mutações primárias são aquelas que ocorrem no sítio ativo da enzima ou próximo a ele e reduzem a suscetibilidade ao

fármaco. As mutações acessórias são aquelas geradas para melhorar a capacidade de replicação do vírus que já possui uma mutação principal. Podem estar presentes como polimorfismos que ocorrem sem a exposição aos ARVs e por si só não tem efeito sobre a suscetibilidade aos ARVs, mas quando associadas com mutações primárias podem diminuir a suscetibilidade aos ARVs (SHAFER, 2002; SPIRA et al., 2003).

A resistência aos ARVs é classificada em primária (ou transmitida) e secundária. A resistência primária é detectada em pacientes recém diagnosticados que nunca fizeram uso de ARVs. Normalmente o indivíduo já foi infectado por um vírus resistente, por isso, também é conhecida como resistência transmitida. A resistência secundária surge em resposta a pressão seletiva dos ARVs e também é conhecida como resistência adquirida (TROTTER et al., 2013).

Vários fatores podem contribuir para o surgimento de resistência aos ARVs, como a baixa adesão ao tratamento, utilização de esquemas subótimos com ARVs inadequandos ou com número insuficientes de fármacos ativos, fatores farmacológicos como administração incorreta dos medicamentos ou interações medicamentosas e iniciação de terapia tardia. Outro fator importante é a barreira genética que é determinada pela quantidade de mutações necessárias para que o HIV adquira resistência. Desta forma, ARVs que possuem baixa barreira genética, com apenas uma mutação viral podem ter sua suscetibilidade reduzida, causando a falha terapêutica. A ocorrência de falha virológica, que é quando a carga viral é detectável ou acima de 50 cópias/ml após 6 meses de tratamento é o principal parâmetro que caracteriza a falha terapêutica. Nestes casos é necessário um esquema de resgate, que consiste na modificação do esquema de ARVs (BODEN et al., 1999; BRASIL, 2015).

Em casos de falha virológica e em pacientes recém diagnosticados é indicado a realização de testes de resistência para que a escolha do regime terapêutico seja o mais adequado (BUCHACZ et al., 2015). As mutações de resistência podem ser detectadas mediante testes fenotípicos e genotípicos. Ensaios fenotípicos medem diretamente a resistência ao ARV, análogo à testes de resistência à antibióticos para bactérias, porém, a cultura *in vitro* de vírus é mais complexa, demorada e dispendiosa. Os ensaios genotípicos ou genotipagem é o principal método para avaliar a resistência aos ARVs. Estes testes amplificam uma porção do genoma do HIV e detectam alterações nas sequências nucleotídica do gene relevante à resistência à determinados ARVs o que possibilita a escolha de esquemas terapêuticos com maior chance de supressão viral (CHEN & ALDROVANDI, 2008).

No Brasil, os testes de genotipagem de pacientes HIV+ que detectam mutações de resistência associadas aos ARVs são realizados desde 2002 pela Rede Nacional de Genotipagem (RENAGENO), com o intuito de otimizar a escolha do esquema terapêutico, reduzindo o acúmulo progressivo de mutações de resistência aos ARVs. A genotipagem é indicada em algumas situações, que devem seguir determinados critérios. Os pacientes que realizarão a genotipagem devem ter falha virológica confirmada, com carga viral superior a 500 cópias/mL e que façam uso regular de TARV por pelo menos seis meses (TUPINAMBÁS et al., 2006; BRASIL, 2015).

A genotipagem ainda pode ser realizada em indivíduos infectados que ainda não iniciaram a TARV, como em pacientes que tenham se infectado com parceiro que faça uso de TARV, pacientes co-infectados TB-HIV, gestantes e crianças infectadas, conhecida como genotipagem pré-tratamento (BRASIL, 2015, 2017c). O teste de genotipagem convencional solicitado em toda situação de falha virológica realizado pela RENAGENO é constituído apenas pelas enzimas virais TR e PR. Testes de resistência para IN são solicitados apenas em casos de falha atual ou prévia de esquemas ARVs incluindo o uso de algum INI onde ocorreu a falha terapêutica (SANTORO & PERNO, 2016; BRASIL, 2017b). Embora a prevalência de mutações de resistência associadas a INI ainda seja menor que à de outros ARVs, houve um aumento significativo de casos de resistência relacionados aos INI, provavelmente devido ao aumento do uso destes ARVs nos últimos anos (LEPIK et al., 2016). É provável que nos próximos anos, devido ao uso do DTG na primeira linha de tratamento, a enzima IN passe a compor uma região de análise nos testes de genotipagem convencionais.

Em relação as mutações relacionadas aos INI, para o RAL, foram descritas três vias de mutações primárias que levam a falha virológica: (1ª) Q148H/R/K ± G140A/S/C ± E138A/K/T; (2ª) N155H ± E92Q; e (3ª) Y143C/R. As vias descritas para resistência ao EVG estão associadas as mutações T66I, E92Q, Q148H/R/K, Q146P e S147G. Embora a mutação Y143C/R não seja selecionados pelo EVG, quando ocorrem em combinação com mutações acessórias podem reduzir a susceptibilidade de EVG (SHAFER, 2017). Mutações primárias nos códons 155 e 143 não reduzem a suscetibilidade ao DTG, porém a mutação primária Q148H/R/K está associadas à resistência aos três INI disponíveis e quando ocorre associadas com mutações acessórias polimórficas como L74I/M e T97A, podem resultar em maior redução da suscetibilidade ao DTG (ARTS & HAZUDA, 2012; OSTERHOLZER & GOLDMAN, 2014).

Estudos mostraram que ocorre uma frequência maior de mutações na vigência da TARV com esta classe de ARV e que em pacientes virgens de tratamento para esta classe há ausência de mutações primárias e poucas mutações acessórias observadas (PASSAES et al., 2009; ARRUDA et al., 2010; LEPIK et al., 2016).

Pesquisadores especialistas em resistência do HIV-1 aos ARVs, da Sociedade Internacional de AIDS dos EUA (IAS-USA), anualmente atualizam o banco de dados contendo as principais mutações de resistência aos ARVs disponíveis, descritas na literatura. Quando se compara as edições dos últimos 10 anos, nota-se um grande aumento no número de mutações relacionadas à resistência aos INI. Em 2007, ano da liberação da primeira droga INI, estavam descritas apenas duas mutações contra o RAL, Q148H/K/R e N155H (Figura 10). Em 2013, quando os três INI já estavam tinham sido aprovados, 17 mutações ao todo estavam descritas, sendo 3 mutações contra DTG, 6 contra EVG e 8 contra o RAL (Figura 11). A última edição foi publicada em janeiro de 2017 (Figura 12) e atualmente estão descritas 24 mutações de resistência aos INI, sendo 10 mutações contra o RAL, 8 mutações contra o ELV e 6 mutações contra o DTG. Portanto, as mutações contra os INI vem cada vez mais aumentando, o que demonstra a necessidade de estudos que monitorem a diversidade genética do gene *pol* que codifica a enzima IN (JOHNSON, 2007; JOHNSON, 2013; WENSING, 2017).

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE INHIBITORS

	Q	N
Raltegravir ²⁶	148	155
(expanded access)	H K N	H

Figura 10: Principais mutações no gene da integrase relacionado a resistência aos antirretrovirais em 2007.

(Adaptado de JOHNSON et al., 2007)

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS

				E	G		Q		
Dolutegravir ^{aa}				138	140		148		
				A	S		H		
				K	A				
Elvitegravir ^{bb}	T	E	T				S Q	N	
	66	92	97				147 148	155	
	I	Q	A				G R	H	
	A	G					H		
	K						K		
Raltegravir ^{cc}		L	E	T	E	G	Y	Q	N
		74	92	97	138	140	143	148	155
		M	Q	A	A	A	R	H	H
					K	S	H	K	
							C	R	

Figura 11: Principais mutações no gene da integrase relacionado a resistência aos antirretrovirais em 2013.
(Adaptado de JOHNSON et al., 2013)

MUTATIONS IN THE INTEGRASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INTEGRASE STRAND TRANSFER INHIBITORS^d

				F	E	G		Q	N	R	
Dolutegravir ^{aa}				121	138	140		148	155	263	
				Y	A	A		H	H	K	
					K	S		K			
								R			
Elvitegravir ^{bb}	T	E	T	F				S Q	N	R	
	66	92	97	121				147 148	155	263	
	I	Q	A	Y				G H	H	K	
	A	G						K			
	K							R			
Raltegravir ^{cc}		L	E	T	F	E	G	Y	Q	N	R
		74	92	97	121	138	140	143	148	155	263
		M	Q	A	Y	A	A	R	H	H	K
						K	S	H	K		
								C	R		

Figura 12: Principais mutações no gene da integrase relacionado a resistência aos antirretrovirais em 2017.
(Adaptado de WENSING et al., 2017)

2 JUSTIFICATIVA

Devido à maior dificuldade dos INI em selecionar variantes resistentes, o Ministério da Saúde incorporou um novo INI na primeira linha de tratamento contra a infecção pelo HIV-1, o DTG, que desde fevereiro de 2017, passou a ser utilizado na terapia inicial para pacientes recém-diagnosticados. Porém, apesar do sucesso da TARV, é inevitável que ao longo do tempo o vírus do HIV-1 selecione mutações de resistência aos medicamentos, levando à falha terapêutica.

Estas mutações de resistência aos ARVs, no Brasil são detectadas pela RENAGENO, que é o responsável pela realização dos testes de genotipagem de pacientes HIV positivos, da rede pública (Sistema Único de Saúde-SUS), com o objetivo de auxiliar na escolha da estratégia terapêutica. Porém, ainda não estão disponíveis de forma rotineira testes de genotipagem para a região da IN, da mesma forma como é para as outras enzimas virais. Desta forma, a alternativa para adquirir conhecimento sobre as características genéticas da IN, principalmente sobre as mutações de resistência é o sequenciamento e a análise das sequências na região da IN.

No Brasil, os dados sobre a diversidade genética da IN são escassos. Apesar de algumas regiões brasileiras possuírem uma diversidade genética do HIV-1 melhor caracterizada, os dados em cidades de interiores ainda são muito limitados. Os poucos estudos realizados sobre diversidade genética da IN foram em grandes cidades da região Sudeste do Brasil. No estado de Goiás, este é o primeiro estudo realizado sobre a diversidade genética da IN.

Por isto, é necessário o monitoramento e a identificação das principais mutações primárias e secundárias associadas a resistências aos INI assim como seus polimorfismos, que podem reduzir a suscetibilidade a estes fármacos, para geração de novos dados que contribuirão com o conhecimento sobre a diversidade genética e a resistência aos ARVs na população HIV+/AIDS do Sudoeste Goiano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de mutações de resistência do HIV-1 aos INI e o perfil de resistência de isolados de HIV-1 obtidos de amostras de pacientes do município de Jataí/Goiás.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Descrever as mutações de resistência para inibidores da IN;
- b) Caracterizar o perfil de resistência das mutações aos inibidores da IN em baixo, intermediário e alto
- c) Descrever os polimorfismos detectados no gene IN do HIV-1;
- d) Identificar os subtipos genéticos no gene da IN do HIV-1;
- e) Avaliar a possível associação de presença de mutações de resistência no gene da IN do HIV-1 às mutações de resistência no gene da PR e TR de um mesmo isolado de pacientes já identificados previamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de Estudo

Este trabalho constitui um subprojeto de um projeto original intitulado “Estudo de Resistência aos Antirretrovirais e Diversidade Genética em Pacientes HIV+/Aids do interior do Estado de Goiás”, sob financiamento do CNPq - chamada MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 (Anexo 1 – parecer com a aprovação pelo Comitê de Ética). No projeto original pretende-se avaliar a prevalência de mutações do HIV-1 às drogas antirretrovirais e o perfil de resistência primária (transmitida) e secundária e subtipos genéticos no gene *pol* e *env* do HIV-1 em amostras de pacientes HIV+/Aids provenientes de municípios da região Sudoeste do estado de Goiás. Além disso, visa selecionar isolados de HIV-1 cujos subtipos se mostram como mosaicos (discordantes) nos genes *pol* e *env* para o estudo do genoma completo e possível identificação e caracterização de novas formas recombinantes circulantes (CRF) do estado de Goiás.

A partir do projeto original, três subprojetos foram originados: Um subprojeto com a avaliação das regiões de PR e TR do HIV-1 de pacientes em terapia ARV; um subprojeto com a avaliação das regiões de PR e TR do HIV-1 de pacientes sem tratamento e outro subprojeto com a avaliação da região de IN do HIV-1. Este último subprojeto constitui as atividades descritas desta dissertação de Mestrado.

Para a realização deste subprojeto, dos 69 isolados dos subprojetos anteriores, pacientes HIV+, do Serviço de Atendimento Especializado (SAE) do município de Jataí-GO foram selecionadas para o estudo de investigação de mutações de resistência aos inibidores da IN, recrutados no período de janeiro de 2015 a janeiro de 2016, no SAE, localizado no Hospital das Clínicas Dr. Serafim de Carvalho, no município de Jataí/Goiás.

Os critérios de inclusão para o estudo de resistência aos ARVs e diversidade genética foram: pacientes de ambos os sexos, de idade superior a 18 anos de idade, com diagnóstico de infecção aguda ou crônica pelo HIV-1, com presença ou não de sintomas, como perda de peso, febre, inchaço nos gânglios e doenças oportunistas, com e sem uso prévio de TARV composta de INTR/INNTR + IP e carga viral plasmática detectável. Como critério de exclusão, foi utilizado pacientes em TARV que possuíam INI no esquema terapêutico.

Após consulta médica, os pacientes que aceitaram participar do estudo receberam informações sobre a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE 1). Além disso, todos os pacientes foram submetidos a uma entrevista baseada em um questionário padronizado para a coleta de dados (APÊNDICE 2).

4.2 Coleta e Processamento da Amostra Biológica

Cerca de 20 mL de sangue venoso periférico foram coletados em tubo vacutainer contendo anticoagulante EDTA (Becton & Dickinson®, San Jose, CA, USA). No laboratório de análises clínicas do Hospital das Clínicas Dr. Serafim de Carvalho (Jataí/Goiás), uma alíquota de 2 mL de sangue total foi separada e o restante da amostra foi centrifugada (2500 rpm, 20 min) e separados 2 mL de plasma em duas alíquotas. As alíquotas de sangue total e plasma foram estocadas em temperatura de -20°C e transferidas para o Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) para serem estocadas a -80°C.

No mesmo momento da coleta, parte do volume de sangue total (cerca de 10 mL) foi disponibilizada para a realização da contagem de linfócitos T CD4⁺ e parte do volume de plasma (cerca de 2 mL) para a quantificação da carga viral plasmática do HIV. Esses dois ensaios foram realizados no Laboratório Central de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros (LACEN/SUS/Go) em Goiânia/Goiás.

4.3 Extração do RNA Viral

A extração do RNA genômico foi realizada a partir do plasma, por meio do kit QIAamp® RNA Mini Kit (Qiagen® GmbH, Hilden, Germany): Seguindo as orientações do fabricante, as partículas virais na amostra de plasma são lisadas pelo agente “carregador” de ligação de RNA carrier-RNA e o RNA foi precipitado com etanol absoluto (Merck®). O RNA foi adsorvido a uma membrana de sílica e posteriormente eluído. Os produtos da extração de RNA foram armazenados à temperatura de -80°C no Laboratório de Imunologia da AIDS e da Hanseníase do IPSTP/UFG (LIAH-IPTSP/UFG).

4.4 Síntese do DNA Complementar por Transcrição Reversa do RNA

A transcrição reversa do RNA para obtenção do DNAc foi realizada com reagentes da Invitrogen (Life Technologies®, NY, USA): a partir de concentrações de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (desoxiadenina-dATP, desoxicitosina-dCTP, desoxitimina-dTTP e desoxiguanina-dGTP trifosfatadas), primer randômico e enzima Super Script® III RT. A reação de retrotranscrição foi realizada através da incubação a 25°C por 5 min, 50°C por 60 min seguida de inativação da reação a 80°C por 15 min. As amostras de DNAc foram armazenadas à temperatura de -80°C no LIAH-IPTSP/UFG.

4.5 Amplificação da Região da Integrase do HIV-1 pela Reação de “nested”-PCR

A região da IN do gene *pol* do HIV-1 foi alvo de amplificação por “nested”-PCR: a região completa da IN foi amplificado (867 pares de base). Na primeira etapa da “nested”-PCR foi utilizado um “mix1” (QUADRO 2) contendo tampões, co-fator, dNTPs, *primers* específicos, Taq DNA polimerase e DNAc obtido por RT-PCR. Concentração final 55,25 µL (CARDOSO & STEFANI,2009).

QUADRO 2 “Mix1” para a primeira etapa da “nested”-PCR.	
H ₂ O Ultrapura	33,4 µL
Tampão de PCR 5x	10 µL
MgCl ₂ 25 mM	5 µL
Mistura de dNTP 25 mM	0,6 µL
<i>Primer</i> RT7 25 pmoles/µL	0,5 µL
<i>Primer</i> INT7 25 pmoles/µL	0,5 µL
Taq “Go”	0,25 µL
Amostra de DNAc	5 µL
Volume total	55,25 µL

Na segunda etapa da “nested”-PCR foi utilizado um “mix2” (QUADRO 3) contendo tampões, co-fator, dNTPs, *primers* específicos, Taq DNA polimerase e o produto da primeira etapa da “nested”-PCR.

QUADRO 3 “Mix2” para a segunda etapa da “nested”-PCR.	
H ₂ O Ultrapura	33,4 µL
Tampão de PCR 5x	10 µL
MgCl ₂ 25 mM	5 µL
Mistura de dNTP 25 mM	0,6 µL
<i>Primer</i> RT2 25 pmoles/µL	0,5 µL
<i>Primer</i> INT6 25 pmoles/µL	0,5 µL
Taq “Go”	0,25 µL
Produto do Mix1	5 µL
Volume total	55,25 µL

As duas etapas do “nested”-PCR para a região da IN do gene *pol* do HIV-1 foram realizadas por termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA) utilizando o seguinte programa de ciclagem: 3 ciclos de 97°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min. Seguidos de 32 ciclos de 95 °C por 45 seg, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. E extensão final de 1 ciclo à 72 °C por 10 min.

As sequências dos *primers* utilizados para a reação de “nested”-PCR e para o sequenciamento estão descritas no Quadro 4. A sequência completa da região da IN com os primers pode ser vista no anexo 2.

QUADRO 4: Sequência dos <i>primers</i> para o gene da Integrase (867pb) do HIV-1.				
Primers	Sequências	Localização HXB2*	Comprimento (pb)	Sentido
RT7	CATGGGTACCAGCACA	4150-4165	16 pb	→
RT2	ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA	4173-4195	23 pb	→
INT6	GGGATGTGTACTTCTGAACTT	5193-5213	21 pb	←
INT7	CCTGTWTGCARMCCCCAATATGT	5241-5264	23 pb	←
MMRT2	ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA	4173-4195	23 pb	→
MMINT4	CTTGACTTTGGGGATTGTAGGG	4653-4674	22 pb	→
MMINT6	GGGATGTGTACTTCTGAACTT	5193-5213	21 pb	←
SCCOAS	TATTCTTTCCCCTGCACTGTA	4809-4829	21 pb	←

* Localização dos *primers* relativo à sequência de referência do HIV-1 (HXB2, K03455).

4.6 Eletroforese em Gel de Agarose 1%

Os fragmentos de amplificação obtidos pela “nested”-PCR da região da IN do gene *pol* do HIV-1 foram analisados por meio de aplicação de uma mistura contendo produto de amplicon e azul de bromofenol (Gibco®) ao gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e paralelamente uma mistura de padrão de peso molecular (100 bp Low DNA mass ladder, Invitrogen®) e azul de bromofenol puro (Gibco®). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal (Horizon 11-14 e 25-25 Gel Electrophoresis Apparatus, Gibco®, USA) durante 1 h a 100 V, 400 mA em tampão TAE 1x (Gibco®). O gel foi analisado sob luz ultravioleta a 310 nm de comprimento de onda para visualização de fragmentos fluorescentes de tamanhos esperados em brometo de etídio.

4.7 Purificação dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados do “nested”-PCR foram purificados empregando-se o kit QIAquick® PCR Purification Kit/QIAGEN® (Qiagen® GmbH, Hilden, Germany): o produto amplificado da segunda etapa da “nested”-PCR em tampão específico foi adicionado a uma coluna de sílica para adsorção. Em seguida o produto de PCR amplificado foi eluído. As amostras de produto de PCR purificadas foram armazenadas à temperatura de -20°C no LIAH-IPTSP/UFG.

4.8 Sequenciamento Automatizado

Os produtos de PCR purificados da região da IN do gene *pol* do HIV-1 foram submetidos ao sequenciamento automatizado utilizando Big Dye Terminator Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems®, CA, USA), baseado no método de Sanger *et al* (1977). Em placas de 96 poços (Applied Biosystems®, CA, USA) foram adicionados o produto de PCR purificado em tampão específico, 4 *primers* separadamente (MMRT2, MMINT4, MMINT6 e SCCOAS - Gibco®) e o Big Dye Terminator Sequencing Kit v.3.1 (Applied Biosystems®, CA, USA). A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador automático com o seguinte programa de ciclagem: 25 ciclos de 95 °C por 20 seg, 50°C

por 15 seg e 60°C por 60 seg. As informações sobre as sequências de nucleotídeos dos *primers* utilizados no sequenciamento encontram-se no QUADRO 4.

Os produtos sequenciados foram submetidos à precipitação com isopropanol e etanol (MERCK®) para purificação do material. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em formamida Hi-Di (Applied Biosystems® Inc, Foster City, CA, USA), seguida por um período de incubação de 2 min a 95°C para desnaturação da fita dupla de DNA e choque térmico em gelo por 2 min. Finalmente, a leitura dos eletroferogramas foi realizada em sequenciador automático (ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems®) do Laboratório Multiusuário do IPTSP/UFG. Este sequenciador já apresenta o software *Phred*, e, portanto, os cromatogramas já foram submetidos à avaliação de sua qualidade.

Após a obtenção dos cromatogramas, as sequências foram editadas manualmente por comparação de complementaridade dos *contigs* e alinhadas por meio do programa *Staden Package 2.0* para Windows (www.staden.sourceforge.net/).

4.9 Análise das Mutações de Resistência aos Inibidores da Integrase

A presença de mutações relacionadas à resistência aos INI foi avaliada comparando-se ao banco de dados da Universidade de Stanford e da IAS-USA (WENSING et al., 2017). Além disso, a partir do banco de dados de mutações de resistência do HIV da Universidade de Stanford, foi definido o perfil de resistência em suscetível, potencial de baixo nível, baixo nível, intermediário e alto nível de resistência. Todos os laudos dos testes de genotipagem foram disponibilizados aos médicos responsáveis e/ou pacientes e integrados ao prontuário médico. As análises foram repetidas novamente no mês de fevereiro, a fim de se reanalisar possíveis atualizações do banco de dados.

4.10 Análise Filogenética dos Subtipos

A definição dos subtipos genéticos dos isolados do HIV-1 estudados foi realizada empregando ferramentas de subtipagem do HIV como: Stanford HIV-1 (<http://hivdb.stanford.edu/>), programa REGA HIV-1 versão 2.0 e por inferência filogenética (OLIVEIRA, 2005).

A análise filogenética foi realizada por meio do alinhamento das sequências de estudo com sequências referências representativas dos diversos subtipos puros e

recombinantes do grupo M do HIV-1 obtidas no banco de dados do Los Alamos HIV Database (http://hiv_web.lanl.gov) (Sequências referências: subtipo B - K03455, DQ358805, DQ358808, AY173956, U63632 e U21135; subtipo F1 - DQ358801, DQ358802, AF077336 e AF005494; subtipo C - AY727523, AY727522, AF286228, AF110967, U46016 e AF067155; subtipo D - K03454 e M27323. A sequência do vírus SIVcpz foi utilizada como grupo externo), usando o software Clustal X e ajustado manualmente pelo software BioEdit. A árvore filogenética foi construída empregando o método Neighbor-Joining (NJ) sob a correção de dois parâmetros de Kimura usando o software MEGA6. Os valores de Bootstrap (1000 repetições) acima de 70% foram considerados significativos.

Os isolados virais que apresentaram subtipos discordantes foram analisados para confirmação da recombinação mediante programa SIMPLOT versão 3.5.1 (Lole et al. 1999), sob os seguintes parâmetros: método NJ, modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros com valor de *Bootstrap* de 1000 replicatas, janela de 200 pb com passos de 20 pb, gap-stripped e taxa de transversão/transição no valor de 2,0.

4.11 Aspectos Éticos

A coleta de sangue foi realizada dentro de um ambiente hospitalar e na presença de médico participante da pesquisa para atender a qualquer intercorrência. Os riscos da coleta de sangue são mínimos e incluem dor local, formação de pequenos hematomas (manchas roxas) no local da coleta e eventual tontura e vertigem.

Todas as informações obtidas em relação aos pacientes e seus dados de prontuário médico (resultados de exames, entrevista) são confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos.

Os procedimentos e testes laboratoriais desta pesquisa não apresentaram nenhum custo financeiro aos participantes.

4.12 Análise Estatística

Os cálculos de frequência, mediana para as principais variáveis obtidas e Intervalo de Confiança (IC) de 95% foram obtidas através do programa “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) para Windows versão 13.0 (Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

Para a realização deste subprojeto, dos 83 isolados dos subprojetos anteriores, 69 amostras de pacientes HIV+, do SAE do município de Jataí-GO foram selecionadas para o estudo de investigação de mutações de resistência aos inibidores da IN. As principais características do perfil epidemiológico dos pacientes incluídos neste estudo estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1. Principais características do perfil epidemiológico de pacientes HIV+/AIDS atendidos no SAE de Jataí/Goiás. (n=69)

	Masculino (%) n=48 (69,6)	Feminino (%) n=21 (30,4)	Total (%) 69 (100)
Mediana da Idade	30 (18 – 71)	35 (18 – 51)	31 (18– 71)
=18	03 (6,25)	01 (4,8)	04 (5,8)
19-34	28 (58,3)	09 (42,7)	37 (53,6)
35-59	14 (29,1)	11 (52,4)	25 (36,2)
≥ 60	03 (6,25)	0 (0)	03 (4,3)
Categoria de Exposição			
Sexual	44 (89,8)	21 (100)	65 (94,2)
Sexual ou Uso de Drogas Injetáveis	02 (4,7)	0 (0)	02 (2,9)
Sem dados	02 (4,7)	0 (0)	02(2,9)
Comportamento Sexual			
Heterossexual	31 (64,6)	21 (100)	52 (75,4)
Homossexual	09 (18,8)	0 (0)	09 (13)
Bissexual	08 (16,7)	0 (0)	08 (11,6)

Destes 69 pacientes selecionados, 50 pacientes não haviam ainda realizado qualquer tipo de esquema terapêutico de TARV e 19 pacientes que estavam em TARV de primeira ou segunda linha, com esquemas terapêuticos formados por: AZT+3TC+ATZ/TTV, TDF+EFV+LOP+RTV, TDF+3TC+EFV ou TDF+AZT+3TC+ATZ/RTV. Nenhum dos pacientes teve contato com INI, ou seja, todos os pacientes incluídos neste estudo eram virgens de tratamento para esta classe de ARV.

Dentre os 69 pacientes, 20 destes obtiveram diagnóstico da infecção pelo HIV-1 entre os anos de 1998-2008 (29%) e 49 entre os anos de 2009-2015 (71%). Dos 69 pacientes, 37 (54%) eram sintomáticos ao diagnóstico. Os principais sinais e sintomas observados ou relatados pelos pacientes foram: perda ponderal (46%), febre (40%), diarreia (30%), linfadenomegalia (16%), fadiga (11%), sudorese noturna (11%), alterações neurológicas (11%), cefaleia (8%), dermatite seborreica (8%), infecção bacteriana de repetição (8%), lesões orais (5%) e monilíase oral (3%).

Relacionado às infecções oportunistas observadas, neurotoxoplasmose foi a com maior prevalência, observada em sete pacientes (10%), seguida por sífilis e pneumocistose observadas em cinco pacientes cada (7%), quatro pacientes (6%) apresentavam tuberculose, neurocriptococose e monilíase esofágica e histoplasmose foram observadas em 2 dois pacientes cada (3%), tuberculose pulmonar, hanseníase e pneumonia foram observados em um paciente cada (1,45%).

Em relação aos dados laboratoriais de monitoramento da infecção pelo HIV-1, a mediana da contagem de células T CD4⁺, no momento da coleta para o teste de genotipagem foi de 469 células/mm³ (variando de 12-1215 células/mm³). A mediana de resultados válidos para a quantificação da carga viral sérica (excluindo 15 pacientes com carga viral abaixo do limite de detecção) foi de 23.761 cópias/mL (variando de 80-767.379 cópias/mL).

Das 69 amostras de plasma obtidas, 52 (75,4%) amostras tiveram a região da IN amplificadas e foram submetidas ao sequenciamento automatizado e análise filogenética dos subtipos. Dentre estes 52 isolados que foram amplificados, sequenciados e analisados, 36 pacientes são sexo masculino e 16 pacientes do sexo feminino, 40 amostras eram de pacientes sem TARV (11 do sexo feminino e 29 do sexo masculino) e 12 amostras eram de pacientes já expostos a TARV (8 são do sexo masculino e 4 do sexo feminino), sendo primeira ou segunda linha de tratamento.

As amostras que não amplificaram (14 amostras) eram amostras que foram mais manipuladas, foi levantado a hipótese de o material ter degradado com tempo, visto que, se busca o isolamento do RNA viral para este estudo. Dentre as amostras que foram sequenciadas, três amostras tiveram que ser excluídas do estudo, pois não foi possível obter qualidade suficiente no sequenciamento destas.

Em relação às mutações de resistência, nenhum dos isolados de HIV-1 dos pacientes selecionados neste estudo apresentou mutações primárias associadas resistência aos INI. No entanto, três pacientes apresentaram mutações acessórias: dois pacientes

apresentaram a mutação T97A (um paciente virgem de tratamento e outro paciente em TARV) e um paciente virgem de tratamento apresentou a mutação G163K.

Os isolados JA69 e JA76 apresentaram a mutação acessória T97A na região da IN do HIV-1 que conferem potencial baixo de resistência a RAL e EVG. O isolado JA69 pertence a uma paciente do sexo feminino, atualmente com 48 anos, diagnosticada no ano de 2013, assintomática e fazia uso de TARV de primeira linha com esquema TDF+3TC+ATZ/RTV. O isolado JA76 pertence a uma paciente também do sexo feminino, atualmente com 49 anos diagnosticada em 2015 que não fazia uso de nenhuma forma de TARV, e apresentou sinais e sintomas como febre, perda ponderal, cefaleia e diarreia. O isolado JA38 apresentou a mutação acessória G163K que confere baixo nível de resistência a RAL e EVG, que pertencia a um paciente do sexo masculino, atualmente com 24 anos de idade, diagnosticado no ano de 2014 que não fazia uso de nenhuma forma de TARV e ainda foi diagnosticado com sífilis.

No presente estudo, doze pacientes apresentaram mutações conhecidas como mutações acessórias polimórficas e que tem algum potencial em conferir resistência aos INI: a mutação L74I foi identificada em seis pacientes virgens de tratamento, a mutação V151I em dois pacientes virgens de tratamento e a mutação M50I em quatro pacientes, sendo 3 virgens de tratamento e 1 em uso TARV.

Neste estudo, vários polimorfismos foram identificados. Entre as 52 sequências analisadas, um total de 152 polimorfismos diferentes estavam presentes, porém nenhum desses estão associados à resistência sem a presença de mutações primárias. No gene da IN, o polimorfismo mais frequentemente encontrado ocorreu no códon 201 (V201I) (presente em 41 sequências de um total de 52, (79%). O segundo polimorfismo mais frequente encontrado foi o L101I (26/52, 50%). Outros polimorfismos que ocorreram em maior frequência foram: I72V (25/52, 48%); V31I (20/52, 38%); S39C e L28I (ambas 18/52, 34,6%); S17N (17/52, 32%); T125A, E11D; T124N, A265V e T124A (ambas 13/52, 25%); e D256E (12/53, 23%). A lista completa de todos os polimorfismos e suas frequências podem ser visualizadas no Anexo 3.

A partir da análise filogenética dos 52 isolados, 50 destes (96,2%) apresentaram um único subtipo na região da IN, sendo 44 isolados (88%) classificados como subtipo B, 5 isolados (10%) como subtipo F1 e 1 isolado (2%) como subtipo C (Figura 13).

Através da análise da árvore filogenética, foi possível observar a presença de alguns grupos (*clusters*) com aparente vínculo afetivo e epidemiológico entre isolados com alto valor de *bootstrap*, sugerindo possíveis *links* de transmissão da infecção

(*clusters* sinalizados: “●”). Os *clusters* JA73-JA74, JA77-JA92 e JA66-JA69 são todos formados por casais heterossexuais, enquanto os *clusters* dos isolados JA135 e JA141, ambos de pacientes masculinos, homossexuais, e dos isolados JA140 e JA145 de pacientes e de sexos opostos, ambos heterossexuais, não foi possível obter informações de vínculo epidemiológico entre eles.

Os outros dois isolados (3,8%) que não apresentaram apenas um subtipo na região da IN, se apresentaram com perfis de mosaicos na região da IN. A análise de *bootscanning* feita pelo SIMPLOT mostrou que o isolado JA54 se apresentou com um perfil envolvendo os subtipos B e F1 e o isolado JA146 com um perfil de CRF31_BC – “like” (dados em análise). Estes isolados estão destacados na árvore filogenética com o símbolo §.

Dois estudos anteriores a este, do nosso grupo de pesquisa, foram realizados em relação a análise de mutações de resistências para ITR e IP com as mesmas amostras de pacientes atendidos no SAE do município de Jataí, todos virgens de INI. No primeiro estudo, amplificaram e sequenciaram 57 amostras de pacientes virgens de TARV para o gene da TR e PR para análise de mutações primárias e encontraram 5 isolados que apresentavam pelo menos uma mutação que conferia resistência a ITR e IP. O segundo estudo analisou 26 amostras de pacientes HIV positivos em uso de TARV recrutados para genotipagem para ITR e IP e observaram 11 isolados com mutações de resistências. Apesar de possuírem mutações de resistência primárias contra ITR e IP, nenhuma destas amostras apresentaram mutações de resistência contra INI. Também nenhum destes isolados coincidiram com os isolados deste estudo que apresentaram mutações acessórias, não mostrando nenhuma correlação entre as mutações de resistência de TR e PR com mutações de resistência de IN.

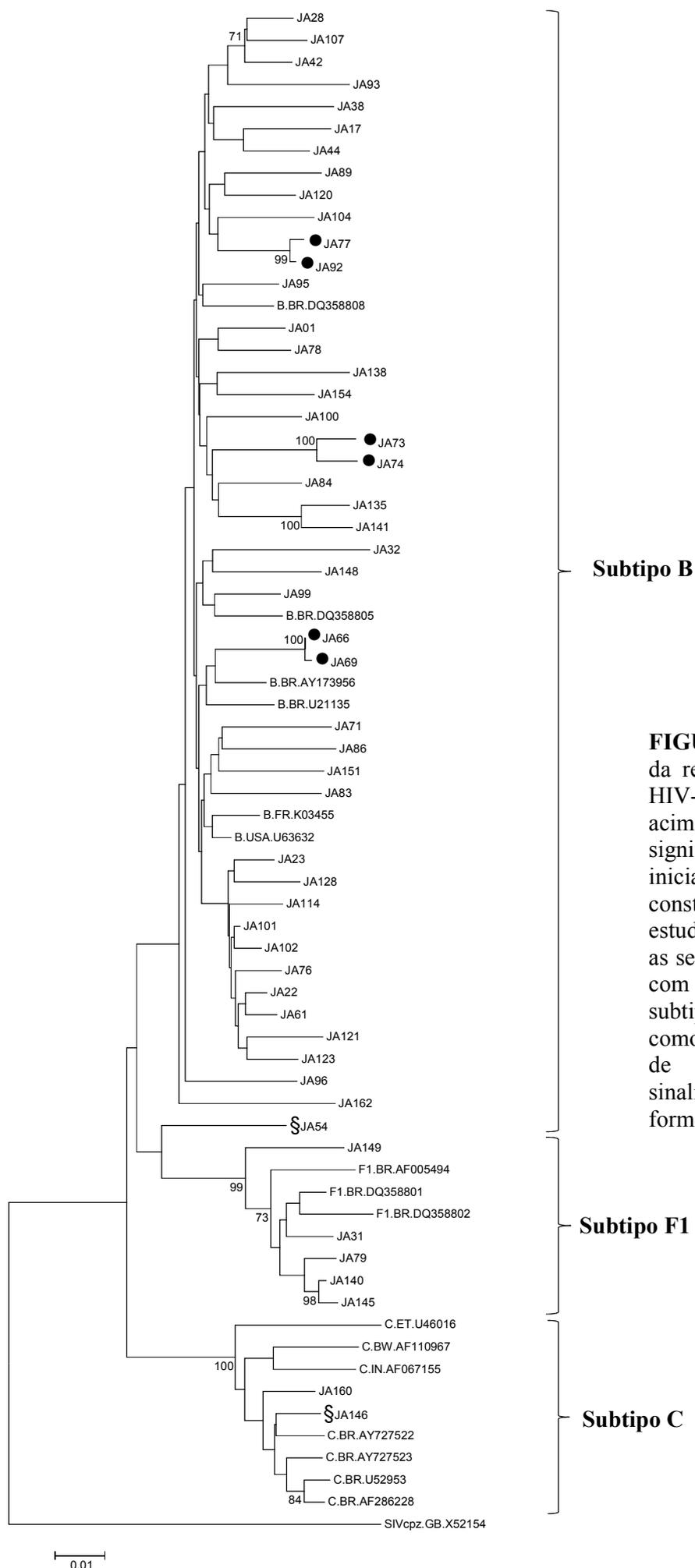


FIGURA 13. Árvore filogenética da região da IN de isolados de HIV-1. Os valores de *bootstrap* acima de 70 foram considerados significativos. Os isolados que iniciam com as letras JA constituem os isolados deste estudo. Os isolados que compõem as sequências referências iniciam com a letra respectiva a cada subtipo. Os *clusters* sinalizados como “●” indicam possíveis *links* de transmissão. Os isolados sinalizados como “§” indicam formas recombinantes.

6 DISCUSSÃO

O estado de Goiás é dividido em cinco macrorregiões: Nordeste, Centro-Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sudoeste. A macrorregião Sudoeste ainda é subdividida em Sudoeste I e Sudoeste II. Cada macrorregião possui um município sede, sendo Jataí o município sede da região Sudoeste II, englobando mais 9 municípios. O Serviço de Atendimento Especializado em DST/AIDS (SAE) localizado no Hospital das Clínicas Dr. Serafim de Carvalho é o responsável pela prevenção, diagnóstico, e tratamento de casos de HIV da regional Sudoeste II.

O município de Jataí já esteve entre os municípios com maiores taxas de incidência de casos de HIV/AIDS no estado de Goiás (BRASIL, 2011). A caracterização do perfil epidemiológico do HIV-1 em municípios do interior dos estados brasileiros ainda é pouco estudada, porém, com o aumento no número de casos da infecção pelo HIV-1 e a disseminação da epidemia para o interior do Brasil, é necessário estender os estudos de diversidade genética do HIV-1 fora das capitais brasileiras, com o intuito de melhorar as medidas de prevenção e controle da infecção e facilitar o atendimento aos pacientes HIV/AIDS.

No presente estudo, a predominância dos pacientes HIV+/AIDS eram de jovens, do sexo masculino, heterossexual e de cor parda, o que corrobora com outros estudos que mostram o perfil epidemiológico dos pacientes HIV/AIDS do estado de Goiás e do país (BRASIL, 2017; DIAS, 2018-dados não publicados).

Em relação à prevalência de mutações de resistência aos INI, estudos mostram a existência de uma prevalência maior de mutações acessórias na região da IN (em uma frequência inferior a 4%) e ausência de mutações de resistência primária aos INI, em populações virgens de terapia para a classe de INI (LOW et al., 2009; PASSAES et al., 2009; ARRUDA et al., 2010; CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., 2010). Estes dados condizem com os resultados encontrados neste estudo. Além disso, uma frequência maior de mutações pode ser identificada na vigência da terapia com esta classe de ARV (ARRUDA et al., 2010; BLANCO et al., 2011). Os pacientes do grupo deste estudo eram todos virgens de tratamento para os INI.

Em relação as mutações secundárias encontradas, a mutação T97A causa potencial baixo de resistência ao EVG e RAL. Esta mutação em combinação com mutações primárias, como a Y143C/R, Q148H+G140S e N155H, reduzem a

suscetibilidade ao EVG e RAL, porém, na ausência de mutações primárias podem se associar com outras mutações acessórias como L74M e G163R e reduzir ainda mais a suscetibilidade aos INI de primeira geração. Esta mutação é frequentemente encontrada em pacientes que possuem subtipo não-B. Na maioria dos subtipos ocorre em 1 a 5% dos isolados de pacientes virgens de tratamento, com exceção dos subtipos A (5-10%) e J (33%) (ABRAM et al., 2017). No presente estudo, esta mutação foi identificada em um paciente virgem de tratamento e em outro paciente em TARV. O paciente em TARV com a mutação T97A, no momento do estudo, estava em uso de terapia de segunda linha e não apresentava nenhuma mutação de resistência para o esquema vigente.

A mutação G163R/K pode ser selecionada em pacientes em uso de RAL, e confere baixo nível de resistência ao RAL e EVG. Mas, esta mutação pode ocorrer em uma frequência de 5 a 10% de isolados de subtipo F de pacientes virgens de tratamento (CASADELLÀ et al., 2015). Além disso, sabe-se que esta mutação em combinação dupla com a mutação primária N155H ou em combinações duplas ou triplas com V72I + T97A confere resistência ao RAL (FRANSEN et al., 2009).

Em relação as mutações acessórias polimórficas, a mutação L74I está associada às mutações como Q148H/R/K, G140S e E138K, pode ocorrer a redução da suscetibilidade ao DTG. A mutação V151I é frequentemente relacionada com a mutação primária N155H e à redução da suscetibilidade à RAL e EVG (SHIMURA; KODAMA, 2009; ARMENIA et al., 2012; CHANG et al., 2016). A alteração polimórfica M50I é observada em 10-25% de pacientes INI-naive, porém, quando associada à mutação primária R263K causa resistência ao DTG (WARES et al., 2014). Estas mutações são comumente selecionadas pelo uso de INI e, em pacientes virgens de tratamento, sua frequência pode ocorrer em 3 a 20% e em 5%, respectivamente, dependendo do subtipo. No entanto, estas mutações sozinhas, não conferem resistência aos inibidores da IN, mas quando combinadas a outras mutações primárias, podem contribuir para a redução da suscetibilidade à essa classe de droga (SHIMURA & KODAMA, 2009).

Estudo realizado por LATAILLADE et al., (2007) enquanto o RAL ainda estava em teste, com amostras de pacientes que faziam uso de TARV e pacientes virgens de INI de várias partes do mundo (Estados Unidos, Austrália, Argentina, China, Sudoeste Asiático, Europa e América Latina) não identificou mutações primárias associadas aos INI, mas identificou a ocorrência de algumas mutações acessórias (T66I, H51I, L74M, E92Q, E138K, G140S, N155S, K160D e V149I) e vários polimorfismos, sendo o

polimorfismo I72V o mais frequente, seguido pelos polimorfismos V201I, T206S, S230N, K156N e V165I.

CECCHERINI-SILBERSTEIN et al., (2010) realizou estudo na Itália com pacientes infectados em uso de TARV (primeira ou segunda linha de tratamento) e pacientes virgens de TARV (ou seja, todos INI-naive) e não foram identificadas mutações primárias ou secundárias. Somente polimorfismos naturais foram detectados: I72V, V201I, V165I, T206s, S230N, e S119G em ambos grupos, o que é similar aos nossos resultados. No Brasil, estudos semelhantes foram realizados para analisar as mutações de resistência associadas à INI, e da mesma maneira que os outros estudos citados, nenhuma mutação de resistência foi observada, apenas polimorfismos foram descritos: I72V, V201I, S230N, I203M, V165I, L101I e V151I (PASSAES et al., 2009; ARRUDA et al., 2010). Estudos mais recentes realizados na Europa e em Taiwan, em populações de pacientes em uso de INI, identificaram algumas mutações primárias, que diminuem a suscetibilidade ao RAL e EVG como Q148H/K/R, N155H, Y143C, E92Q, G140S e T97A e mutações acessórias como L74M, Q95K, T97A, E92Q, E138K, V151I, G163R, E157Q e R263K (DOYLE et al., 2015; CHANG et al., 2016).

Como no Brasil o RAL é utilizado apenas como terapia de resgate, o estudo realizado no estado de São Paulo por CAVALCANTI et al., (2015) avaliou sequências de IN de pacientes em falha virológica durante uso de RAL. As mutações primárias identificadas foram Q148H/K/R, acompanhada na maioria dos casos pela mutação G140S e mutações acessórias L74I e E138K. Esta combinação está associada à resistência cruzada a dois INI (RAL e DTG). O EVG não foi incluído no estudo pois, no Brasil, este ARV não está disponível. Apesar do sucesso do RAL, sua baixa barreira genética compromete a suscetibilidade dos vírus a este ARV. Uma única mutação nos códons 143, 148 ou 155 da IN é suficiente para induzir a falha virológica (COOPER et al, 2008).

A HAART reduziu a mortalidade e melhorou a qualidade de vida dos pacientes, com a supressão da viremia, no entanto, a seleção de isolados resistentes ainda é uma ameaça para o sucesso terapêutico (BARTLETT, 2006; BERTAGNOLIO et al, 2013). No Brasil, estudos multicêntricos demonstraram níveis baixos a altos (4 - 36%) de resistência primária para a primeira (INRTI+INNRTI) ou segunda linha (INRTI + IP) de tratamento (SUCUPIRA et al, 2007; PEDROSO et al, 2007; INOCÊNCIO et al, 2009; SPRINZ et al, 2009).

Sabe-se que o tempo de exposição à terapia está diretamente relacionado ao acúmulo de mutações de resistência, entretanto a população brasileira ainda foi pouco

exposta aos INI. Porém, com o aumento do uso desta classe de ARV, um grande número de mutações podem surgir e se acumular com o passar do tempo no genoma viral. Além disso, a resistência cruzada em decorrência do acúmulo de mutações, pode levar ao aumento da carga viral em indivíduos tratados e conseqüentemente a uma resposta subótima ao tratamento (SHAFER, 2002). A emergência de variantes resistentes durante TARV na infecção pelo HIV-1 tem sérias implicações clínicas e a inclusão de novas drogas que tem como alvo outras etapas do ciclo replicativo viral, além das de transcrição reversa e maturação, vem se tornando essencial para a efetividade da terapia (MENÉNDEZ-ARIAS, 2010).

A falta de mutações primárias em indivíduos virgens de tratamento de INI provavelmente está relacionado ao fato de que o RAL passou a ser utilizado no Brasil somente no ano de 2009, e por ser utilizado somente na terapia de resgate, o tempo de exposição a estes fármacos ainda é relativamente pequeno. Porém, com o aumento da utilização dos INI, até mesmo na terapia inicial, como é o caso do DTG, é possível que em poucos anos este cenário mude, sendo necessário o monitoramento contínuo das mutações de resistência aos INI.

Além disso, o presente trabalho se baseou na metodologia de sequenciamento automatizado pelo método de SANGER et al., (1977) para a identificação de mutações na região da IN. Esta metodologia só é capaz de identificar mutações se estas variantes se encontrarem presentes em uma frequência maior que 20% em relação à população total de vírus. Por esse motivo, a prevalência real de mutações deste estudo pode estar subestimada (BARBOUR et al, 2004). Para aumentar esse poder de detecção, seriam necessárias metodologias mais sensíveis e capazes de detectar populações minoritárias virais, como o PCR em tempo real (RT-PCR) e o sequenciamento de alta performance (deep-sequencing), por exemplo (GÜNTHARD et al, 1998; LI et al, 2012).

No Brasil, testes genotipagem estão disponíveis pela RENAGENO do Programa Nacional DST/AIDS, porém, é solicitado teste de resistência genotípica convencional apenas para ITR e IP (BRASIL, 2015). No entanto, um grande número de pacientes vem se mostrando resistente a estas duas classes de ARVs, demonstrando uma tendência a introdução dos INI no cenário brasileiro. Porém, embora os INI sejam utilizados hoje no esquema ARV de alguns pacientes com falha terapêutica a esquemas anteriores e em pacientes em primeiro uso com o DTG, ainda não é realizado rotineiramente testes que avaliem a resistência a esta classe ARV antes de sua introdução no esquema, ou antes da introdução inicial da terapia em pacientes virgens de tratamento. O teste de resistência

aos INI são indicados apenas para pacientes em falha virológica atual ou pregressa com esquemas estruturados com INI (BRASIL, 2015; SANTORO & PERNO, 2016).

Baseado no recente estudo brasileiro de Luz e colaboradores (2015), os testes de resistência podem apresentar um ótimo custo-benefício, resultando em uma rápida supressão viral, menor risco de falha terapêutica, redução de custos financeiros com a introdução de novas classes de ARVs e aumento da sobrevida das PVHA. Este estudo sugere a incorporação destes testes até mesmo em regiões onde a prevalência de resistência primária seja baixa (à partir de 1,4%) (LUZ et al, 2015).

O painel de orientação dos Estados Unidos, *Guidelines for the Use of Antiretroviral in HIV-1 Infected Adults and Adolescents*, recomenda o início do tratamento de pacientes virgens com a combinação RAL+ TDF + Emcitabina, devido a sua eficácia virológica ideal e durável e por possuir perfis de tolerabilidade e toxicidade favoráveis (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2009). No Brasil, o DTG foi o último INI aprovado pelo FDA, em 2017, foi incorporado ao SUS desde janeiro deste ano, devido a suas vantagens como alta potência, barreira genética elevada e dose única diária, passou a substituir o EFV no esquema terapêutico de primeira linha TDF+3TC+EFV. Pacientes que fazem uso de RAL na terapia de resgate e estiverem em falha terapêutica deste ARV deverão alterar o RAL pelo DTG (Nota Informativa nº 096, de 2016/DDAHV/SVS/MS).

A caracterização da diversidade genética do HIV-1 em municípios dos estados brasileiros é um passo importante para que ocorra progresso nas estratégias de prevenção e controle da infecção pelo HIV-1. O município de Jataí possui uma das maiores taxas de detecção de casos de infecção pelo HIV do estado de Goiás, e, é o município sede da região Sudoeste II (BRASIL, 2016). Portanto, os resultados encontrados neste estudo contribuirão para o mapeamento da diversidade do HIV-1 na região sudoeste goiana.

Em relação aos subtipos, os resultados obtidos demonstram que o município de Jataí segue o mesmo padrão de prevalência de subtipos do HIV-1 da região Centro-Oeste, assim como no estado de Goiás, onde o subtipo do HIV-1 mais prevalente é o subtipo B, seguido pelo subtipo F1, de formas recombinantes de BF1 e pelo subtipo C. (CARDOSO et al., 2009, 2011; ALCÂNTARA et al., 2012). No entanto, em relação aos isolados recombinantes, observou-se que no município de Jataí, a frequência de isolados recombinantes é mais baixa do que foi observado em outros estudos realizados em Goiânia e região metropolitana, onde a circulação de isolados recombinantes é bem mais frequente, com uma prevalência podendo chegar até 40% (CARDOSO et al., 2009;

CARDOSO; STEFANI, 2009; CARDOSO et al., 2011; ALCÂNTARA et al., 2012, DIAS, 2015; BENTO, 2016).

Portanto, neste estudo foi identificado ausência de mutações de resistência primárias aos INI nos isolados do HIV-1 do município de Jataí e poucas mutações acessórias foram detectadas na região da IN, com a prevalência do subtipo B e a baixa frequência de formas recombinantes do HIV-1 entre pacientes da região Sudoeste Goiano.

Esses resultados demonstram que a região da IN até o momento se mantém conservada, incentivando o uso de INI como alternativa eficaz tanto na terapia de resgate quanto na terapia inicial do tratamento contra o HIV-1. Porém, com o uso dos INI na primeira linha de tratamento, é possível que em um futuro não muito distante, mutações de resistência primária aos INI sejam comumente encontradas.

Dessa maneira, há a necessidade de monitoramento do surgimento de mutações na região da IN do HIV-1 para compreender o impacto destas na TARV, visando a otimização do esquema terapêutico inicial e controle da infecção pelo HIV-1.

7 CONCLUSÕES

- a) Não foram identificadas mutações de resistência primária aos INI em pacientes virgens de tratamento ou em pacientes que fazem uso de TARV (primeira e segunda linha);
- b) Foram identificadas duas mutações acessórias na região da IN em uma frequência de três vezes: T97A (em 2 isolados) e G163K (1 isolado), e ambas mutações conferem baixo nível de resistência ao RAL e EVG;
- c) Entre as sequências de isolados de HIV-1 analisadas, 152 polimorfismos foram descritos, sendo o polimorfismo V201I o mais prevalente, seguido por outros polimorfismos com maiores prevalências como L101I, I72V, V31I, S39C, L28I e S17N;
- d) O subtipo mais prevalente encontrado foi o subtipo B, em 44 de 52 isolados (84,6%), seguido pelo subtipo F, (9,6%), pelo subtipo C (1,9%) e mosaicos recombinantes BF1 (1,9%) e BC (1,9%);
- e) Não foi encontrada associação entre pacientes com frequência de mutações na PR e TR e presença de mutações na IN, nos isolados analisados.

8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology*. 7^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABECASIS, A. B.; WENSING, A. M. J.; PARASKEVIS, D.; et al. HIV-1 subtype distribution and its demographic determinants in newly diagnosed patients in Europe suggest highly compartmentalized epidemics. *Retrovirology*, v. 10, n. 1, p. 7, 2013.
- ABRAM, M. E.; RAM, R. R.; MARGOT, N. A.; et al. Lack of impact of pre-existing T97A HIV-1 integrase mutation on integrase strand transfer inhibitor resistance and treatment outcome. *PLoS ONE*, v. 12, n. 2, p. 1–25, 2017.
- ALCÂNTARA, K. C.; LINS, J. B. A.; ALBUQUERQUE, M.; et al. HIV-1 mother-to-child transmission and drug resistance among Brazilian pregnant women with high access to diagnosis and prophylactic measures. *Journal of Clinical Virology*, v. 54, n. 1, p. 15–20, 2012. Elsevier B.V.
- ANDINO, R.; DOMINGO, E. Viral quasispecies. *Virology*, p. 46–51, 2015.
- ARMENIA, D.; VANDENBROUCKE, I.; FABENI, L.; et al. Study of genotypic and phenotypic HIV-1 dynamics of integrase mutations during raltegravir treatment: A refined analysis by ultra-deep 454 pyrosequencing. *Journal of Infectious Diseases*, v. 205, p. 557–567, 2012.
- ARRUDA, L. B.; FONSECA, L. A. M.; DUARTE, A. J. S.; CASSEB, J. Genetic diversity on the integrase region of the pol gene among HIV type 1-infected patients naive for integrase inhibitors in São Paulo City, Brazil. *AIDS research and human retroviruses*, v. 26, n. 1, p. 105–7, 2010.
- ARTS, E. J.; HAZUDA, D. J. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 2, n. 4, p. a007161, 2012.
- ARYA, S.; LAL, P.; SINGH, P.; KUMAR, A. Recent advances in diagnosis of HIV and future prospects. *Indian Journal of Biotechnology*, v. 14, n. January, p. 9–18, 2015.
- BARBOUR JD, Hecht FM, Wrin T, et al . Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. *AIDS* 18: 1683-9, 2004.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, v. 220, 1983.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. HIV as the cause of AIDS. *The Lancet*, v. 348, p. 31–35, 1996.
- BARTLETT JÁ et al. An updated systematic overview of triple combination therapy in antiretroviralnaive HIV-infected adults, *AIDS*, [S.l.], v. 20, n. 16, p. 2051-64, Oct. 2006.
- BENJELLOUN, F.; LAWRENCE, P.; VERRIER, B.; GENIN, C.; PAUL, S. Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Structure in the Induction of Broadly Neutralizing Antibodies. *Journal of Virology*, v. 86, n. 24, p. 13152–13163, 2012.
- BENTO, L.O. Diversidade E Prevalência De Isolados Do HIV-1 Com Mutações De Resistência Em Pacientes Do Sudoeste Goiano Não Expostos À Terapia Antirretroviral. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás - Regional Jataí, 2016.

- BERTAGNOLIO S et al. The Impact of HIV Drug Resistance on the Selection of First- and Second-Line ART in Resource-Limited Settings. *The Journal of Infectious Diseases* 2013;207(S2):S45-8.
- BHATTI, A. B.; USMAN, M.; KANDI, V. Current Scenario of HIV/AIDS, Treatment Options, and Major Challenges with Compliance to Antiretroviral Therapy. *Cureus*, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2016.
- BLANCO, J. L.; VARGHESE, V.; RHEE, S. Y.; GATELL, J. M.; SHAFER, R. W. HIV-1 integrase inhibitor resistance and its clinical implications. *Journal of Infectious Diseases*, v. 203, p. 1204–1214, 2011.
- BODEN, D.; HURLEY, A.; ZHANG, L.; et al. HIV-1 drug resistance in newly infected individuals. *Jama*, v. 282, n. 12, p. 1135–1141, 1999.
- BOJJA, R. S.; ANDRAKE, M. D.; WEIGAND, S.; et al. Architecture of a full-length retroviral integrase monomer and dimer, revealed by small angle x-ray scattering and chemical cross-linking. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 19, p. 17047–17059, 2011.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico AIDS e DST. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais*, 2011.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais*, 2015.
- BRASIL. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. *Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais*, 2016a.
- BRASIL. Boletim epidemiológico HIV/AIDS do estado de Goiás da Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde. , 2016b.
- BRASIL. Boletim Epidemiológico - Secretaria de Vigilância em Saúde. *Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde*, 2017a.
- BRASIL. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO HIV/ AIDS DO ESTADO DE GOIÁS. *Secretaria de Vigilância em Saúde - Ministério da Saúde.*, v. November20, p. 1–7, 2017b.
- BRASIL. Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos. *Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais*, 2017c.
- BRENCHLEY, J. M.; PRICE, D. A.; SCHACKER, T. W.; et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, v. 12, p. 1365–1371, 2006.
- BRENCHLEY, J. M.; SCHACKER, T. W.; RUFF, L. E.; et al. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine*, v. 200, n. 6, p. 749–59, 2004.
- BRINDEIRO RM et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 17:1063-1069. 2003.
- BUCHACZ, K.; YOUNG, B.; PALELLA, F. J.; et al. Trends in use of genotypic resistance testing and frequency of major drug resistance among antiretroviral-naïve persons in the HIV Outpatient Study, 1999-2011. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 8, p. 2337–2346, 2015.

- BUONAGURO, L.; TORNESELLO, M. L.; BUONAGURO, F. A. Minireview - Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: Pathogenetic and therapeutic implications. *Journal of Virology*, v. 81, n. 19, p. 10209–10219 ST–Minireview–Human immunodeficie, 2007.
- BUTTÒ, S.; SULIOGOI, B.; FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanità*, v. 46, n. 1, p. 66–80, 2010.
- CAMPBELL-YESUFU, O. T.; GANDHI, R. T. Update on human immunodeficiency virus (HIV)-2 infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, p. 780–787, 2011.
- CARDOSO, L. P. V.; QUEIROZ, B. B. DE; ARAÚJO STEFANI, M. M. DE. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. *Journal of Clinical Virology*, v. 46, p. 134–139, 2009.
- CARDOSO, L. P. V.; SILVEIRA, A. A. DA; FRANCISCO, R. B. L.; GUARDA REIS, M. N. DA; ARAÚJO STEFANI, M. M. DE. Molecular Characteristics of HIV Type 1 Infection Among Prisoners from Central Western Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 27, n. 0, p. 1349–1353, 2011.
- CARDOSO, L. P. V.; STEFANI, M. M. D. A. High level of multidrug resistance mutations in HIV type 1 pol gene and resistance-associated mutations to enfuvirtide (T-20) among antiretroviral-experienced patients from central Brazil. *AIDS research and human retroviruses*, v. 25, n. 10, p. 943–950, 2009.
- CARVALHO, B. C.; CARDOSO, L. P. V.; DAMASCENO, S.; STEFANI, M. M. D. A. Moderate Prevalence of Transmitted Drug Resistance and Interiorization of HIV Type 1 Subtype C in the Inland North State of Tocantins, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 27, n. 0, p. 1081–1087, 2011.
- CASADELLÀ, M.; HAM, P. M. VAN; NOGUERA-JULIAN, M.; et al. Primary resistance to integrase strand-transfer inhibitors in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 10, p. 2885–2888, 2015.
- CAVALCANTI, J. DE S.; FERREIRA, J. L. DE P.; GUIMARÃES, P. M. DE S.; VIDAL, J. E.; BRIGIDO, L. F. DE M. High frequency of dolutegravir resistance in patients failing a raltegravir-containing salvage regimen. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 3, p. 926–929, 2015.
- CECCHERINI-SILBERSTEIN, F.; MALET, I.; FABENI, L.; et al. Specific HIV-1 integrase polymorphisms change their prevalence in untreated versus antiretroviral-treated HIV-1-infected patients, all naive to integrase inhibitors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, n. 11, p. 2305–2318, 2010.
- CHAN, D. C.; KIM, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell*, v. 93, p. 681–684, 1998.
- CHANG, S.-Y.; LIN, P.-H.; CHENG, C.-L.; et al. Prevalence of Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTI) Resistance Mutations in Taiwan. *Scientific Reports*, v. 6, p. 35779, 2016.
- CHANG, T. L.; JR, J. V.; DELPORTILLO, A.; KLOTMAN, M. E. Dual role of α - defensin-1 in anti – HIV-1 innate immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 3, p. 765–773, 2005.
- CHEN, T. K.; ALDROVANDI, G. M. Review of HIV Antiviral Drug Resistance. *Paediatric Infectious Disease Journal*, v. 27, n. 8, p. 749–752, 2008.
- CHIN, B. S. Molecular Epidemiology of Human Immunodeficiency Virus. *Infection &*

- chemotherapy*, v. 49, n. 1, p. 1–9, 2017.
- CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Molecular virology and immunology of HIV infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 110, p. 189–198, 2002.
- CLAPHAM, P. R.; MCKNIGHT, Á. HIV-1 receptors and cell tropism. *British Medical Bulletin*, v. 58, p. 43–59, 2001.
- COLEMAN, C. M.; ST GELAIS, C.; WU, L. HIV Interactions with Dendritic Cells: Plasmacytoid Dendritic Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 762, p. 109–130, 2013.
- CONNOR, R. I. Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1-Infected Individuals. *Journal of Experimental Medicine*, v. 185, n. 4, p. 621–628, 1997.
- COOPER, D.A.; STEIGBIGEL, R.T.; GATELL, J.M.; ET AL. Subgroup and resistance analyses of raltegravir for resistant HIV-1 infection. *N Engl J Med*; 359:355-365, 2008.
- CORNETT, J. K.; KIRN, T. J. Laboratory diagnosis of HIV in adults: A review of current methods. *Clinical Infectious Diseases*, v. 57, n. 5, p. 712–718, 2013.
- COSTA, C.; OLIVEIRA, C. M. C. DE; MELO, Y. F. C. DE; et al. High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 32, n. 9, p. 918–922, 2016.
- COSTIN, J. M. Cytopathic mechanisms of HIV-1. *Virology journal*, v. 4, p. 100, 2007.
- D'ARC, M.; AYOUBA, A.; ESTEBAN, A.; et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 11, p. 1343–1352, 2015.
- DAAR, E. S.; KESLER, K. L.; PETROPOULOS, C. J.; et al. Baseline HIV type 1 coreceptor tropism predicts disease progression. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 45, p. 643–649, 2007.
- DAHABIEH, M. S.; BATTIVELLI, E.; VERDIN, E. Understanding HIV latency: the road to an HIV cure. *Annual review of medicine*, v. 66, p. 407–421, 2015.
- DEEKS, S. G.; OVERBAUGH, J.; PHILLIPS, A.; BUCHBINDER, S. HIV infection. *Primer*, v. 1, n. October, p. 1–22, 2015.
- DELATORRE E, COUTO-FERNANDEZ JC, BELLO G. HIV Genetic Diversity in Northeastern Brazil: High Prevalence of Non-B Subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses*, Jul;33(7):639-647, 2017.
- DERBY, N.; MARTINELLI, E.; ROBBIANI, M. Myeloid DCs in HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, v. 6, n. 5, p. 379–384, 2011.
- DIAS, R.F.G. Perfil Clínico-Epidemiológico de Paciente HIV+/AIDS de Municípios do Sudoeste Goiano e Resistência aos Antirretrovirais. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás - Regional Jataí, 2015
- DIAZ, R. S.; INOCÊNCIO, L. A.; SUCUPIRA, M. C. A.; et al. The virological and immunological characteristics of the HIV-1-infected population in Brazil: From initial diagnosis to impact of antiretroviral use. *PLoS ONE*, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.
- DIVINO, F.; CORADO, A. L. G. DE; NAVECA, F. G.; STEFANI, M. M. A.; BELLO, G. High prevalence and onward transmission of non-pandemic HIV-1 subtype B clades in northern and northeastern brazilian regions. *PLoS ONE*, v. 11, n. 9, p. 1–14, 2016.
- DOYLE, T.; DUNN, D. T.; CECCHERINI-SILBERSTEIN, F.; et al. Integrase inhibitor

- (INI) genotypic resistance in treatment-naive and raltegravir-experienced patients infected with diverse HIV-1 clades. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 70, n. 11, p. 3080–3086, 2015.
- ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. Retroviral integrase structure and dna recombination mechanism. *Microbiol. Spectrum*, v. 2, p. 1–22, 2014.
- EVERING, T. H. HIV-1 Integrase Inhibitors. *Clinical Trials*, v. 13, n. June, p. 1–9, 2008.
- FANALES-BELASIO, E.; RAIMONDO, M.; SULIGOI, B. Molecular aspects of tumor cell migration and invasion. *Ann Ist Super Sanità*, v. 46, p. 66–80, 2010.
- FEARON, M. The laboratory diagnosis of HIV infections. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology*, v. 16, n. 1, p. 26–30, 2005 .
- FETTIG, J.; SWAMINATHAN, M.; MURRILL, C. S.; et al. Global Epidemiology of HIV. *HHS Public Acces*, v. 28, n. 3, p. 323–337, 2016.
- FINZI, D.; BLANKSON, J.; SILICIANO, J. D.; et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature medicine*, v. 5, n. 5, p. 512–517, 1999.
- FITZKEE, N. C.; MASSE, J. E.; SHEN, Y.; DAVIES, D. R.; BAX, A. Solution conformation and dynamics of the HIV-1 integrase core domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 23, p. 18072–18084, 2010.
- FOUDA, G. G.; JAEGER, F. H.; AMOS, J. D.; et al. Tenascin C is an innate broad spectrum HIV-1 – neutralizing protein in breast milk. *Pnas*, v. 110, n. 45, p. 18220–18225, 2013.
- FRANSEN, S.; GUPTA, S.; DANOVICH, R.; et al. Loss of Raltegravir Susceptibility by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Conferred via Multiple Nonoverlapping Genetic Pathways. *Journal of Virology*, v. 83, n. 22, p. 11440–11446, 2009.
- GATELL, J. M.; D, P.; ROCKSTROH, J. K.; et al. Prevention of HIV-1 Infection with Early Antiretroviral Therapy. *The New England Journal of Medicine*, v. 365, p. 493–505, 2011.
- GEIJTENBEEK, T. B.; KWON, D. S.; TORENSMA, R.; et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, v. 100, p. 587–597, 2000.
- GOMEZ, C.; HOPE, T. J. The ins and outs of HIV replication. *Cellular Microbiology*, v. 7, p. 621–626, 2005.
- GRÄF, T.; PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology*, v. 435, n. 1, p. 170–178, 2013.
- GREENE, W. C. A history of AIDS: Looking back to see ahead. *European Journal of Immunology*, v. 37, p. 94–102, 2007.
- GROOT, F.; GEIJTENBEEK, T. B. H.; SANDERS, R. W.; et al. Lactoferrin Prevents Dendritic Cell-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission by Blocking the DC-SIGN gp120 Interaction Lactoferrin Prevents Dendritic Cell-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Transmission by Blocking the DC-S. *JOURNAL OF VIROLOGY*, v. 79, n. 5, 2005.
- GUNTARD, H.F., WONG, J.K., IGNACIO, C.C., HAVLIR, D.V., AND RICHMAN, D.D.. Comparative performance of high-density oligonucleotide sequencing and

- dideoxynucleotide sequencing of HIV type 1 pol from clinical samples. *AIDS Res. Hum. Retrov.*, 1998.
- HEMELAAR, J.; GOUWS, E.; GHYS, P. D.; OSMANOV, S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS (London, England)*, v. 25, n. 5, p. 679–689, 2011.
- HEMELAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, Issue 3, p182–192, 2012.
- HICKS, C.; GULICK, R. M. Raltegravir: The First HIV Type 1 Integrase Inhibitor. *Clinical Infectious Diseases*, v. 48, p. 931–939, 2009 .
- HOENIGL, M.; GREEN, N.; CAMACHO, M.; et al. Signs or symptoms of acute HIV infection in a cohort undergoing community-based screening. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 3, p. 532–534, 2016.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/>. Acesso: 12/04/2018 às 13:14.
- INOCÊNCIO LA et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance: a survey of individuals recently diagnosed with HIV. *J Int AIDS Soc*, London;v.12,p.1220.2009.
- JASKOLSKI, M.; ALEXANDRATOS, J. N.; AND, G. B.; WLODAWER, A. Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy. *Aids*, v. 276, n. 11, p. 2926–2946, 2010.
- JOHNSON, V. A; BRUN-VÉZINET, F.; CLOTET, B.; et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA*, v. 15, n. 4, p. 119–125, 2007.
- JOHNSON, V. A; CALVEZ, V.; GUNTARD, H. F.; et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: March 2013. *Topics in antiviral medicine*, v. 21, n. 1, p. 6–14, 2013.
- JUNQUEIRA, D. M.; ALMEIDA, S. E. DE M. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. *Virology*, v. 495, n. July, p. 173–184, 2016. Elsevier.
- KAHN, J.; WALKER, B. D.; M.D. Acute Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, p. 33–39, 1998.
- KOPPENSTEINER, H.; WU, L. Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*, v. 9, n. 1, p. 82, 2012.
- KORBER, B. T.; FOLEY, B. T.; KUIKEN, C. L.; PILLAI, S. K.; SODROSKI, J. G. Numbering positions in HIV relative to HXB2CG. *Human retroviruses and AIDS*, v. 3, p. 102–111, 1998.
- LATAILLADE, M.; CHIARELLA, J.; KOZAL, M. J. Natural polymorphism of the HIV-1 integrase gene and mutations associated with integrase inhibitor resistance. *Antiviral Therapy*, v. 12, n. 1, p. 563–570, 2007.
- LEPIK, K. J.; YIP, B.; ROBBINS, M.; et al. Prevalence and Incidence of Integrase Drug Resistance in BC , Canada 2009-2015. *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI)*, v. February 2, 2016.
- LI, M.; STONEKING, M. A new approach for detecting low-level mutations in next-generation sequence data. *Genome Biol* 13(5), 2012.
- LIBRELOTTO, C. S.; GRÄF, T.; SIMON, D.; ALMEIDA, S. E. M. DE; LUNGE, V. R. HIV-1 epidemiology and circulating subtypes in the countryside of South Brazil. *Journal*

- of the Brazilian Society of Tropical Medicine, v. 48, n. May, p. 249–257, 2015.
- LORÉ, K.; SMED-SÖRENSEN, A.; VASUDEVAN, J.; MASCOLA, J. R.; KOUP, R. A. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4⁺ T cells. *The Journal of experimental medicine*, v. 201, n. 12, p. 2023–2033, 2005.
- LOW, A.; MUESING, M. Understanding and Inhibiting Integrase in the Treatment of HIV Disease. *Physicians' Research Network Notebook*, v. 11, n. 3, 2006.
- LOW, A.; PRADA, N.; TOPPER, M.; et al. Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 10, p. 4275–4282, 2009.
- LUZ et al. Cost-Effectiveness of Genotype Testing for Primary Resistance in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 68(2):152-161.2015.
- MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: Epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, v. 384, n. 9939, p. 258–271, 2014.
- MARCELLO, A. Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology*, v. 3, p. 7, 2006.
- MARCHETTI, G.; TINCATI, C.; SILVESTRI, G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 26, n. 1, p. 2–18, 2013.
- MCCUNE, J. M. Viral latency in HIV disease. *Cell*, v. 82, p. 183–188, 1995.
- MENÉNDEZ-ARIAS, L. Special issue: Retroviral enzymes. *Viruses*, v. 2, n. 5, p. 1181–1184, 2010.
- MIKULAK J; ORIOLO F; ZAGHI E; DI VITO C; MAVILIO D. Natural Killer Cells in HIV-1 Infection and Therapy. *AIDS*, 13;31(17):2317-2330, 2017.
- MULDER, L. C. F.; CHAKRABARTI, L. A.; MUESING, M. A. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 30, p. 27489–27493, 2002.
- NÁJERA, R.; DELGADO, E.; PÉREZ-ALVAREZ, L.; THOMSON, M. M. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. *Aids*, v. 16, n. supplement 4, p. S3–S16, 2002.
- NKEZE, J.; LI, L.; BENKO, Z.; LI, G.; ZHAO, R. Y. Molecular characterization of HIV - 1 genome in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell & Bioscience*, p. 1–13, 2015.
- OLIVEIRA T et al. An Automated Genotyping System for Analysis of HIV-1 and other Microbial Sequences. *Bioinformatics*.21:3797-3800.2005.
- OSTERHOLZER, D. A.; GOLDMAN, M. Dolutegravir: A next-generation integrase inhibitor for treatment of HIV infection. *Clinical Infectious Diseases*, v. 59, n. 2, p. 265–271, 2014.
- PANCERA, M.; MAJEED, S.; BAN, Y.-E. A.; et al. Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 3, p. 1166–71, 2010.
- PASSAES, C. B.; GUIMARÃES, M. L.; FERNANDEZ, S. L. C.; et al. Lack of primary mutations associated with integrase inhibitors among HIV-1 subtypes B, C, and F

- circulating in Brazil. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, v. 51, n. 1, p. 7–12, 2009.
- PATIÑO-GALINDO, J. Á.; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The substitution rate of HIV-1 subtypes: a genomic approach. *Virus Evolution*, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2017.
- PEDERSEN, C.; LINDHARDT, B. O.; JENSEN, B. L.; et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. *BMJ*, v. 299, n. July, p. 154–157, 1989.
- PEDROSO et al. High Prevalence of Primary Antiretroviral Resistance Among HIV-1-Infected Adults and Children in Bahia, a Northeast State of Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 251-253.2007.
- PERNAS, B.; GRANDAL, M.; MENA, A.; et al. High prevalence of subtype F in newly diagnosed HIV-1 persons in northwest Spain and evidence for impaired treatment response. *Aids*, v. 28, n. 12, p. 1837–1840, 2014.
- QUARANTA, M. G.; MATTIOLI, B.; VELLA, S. Glances in immunology of HIV and HCV infection. *Advances in Virology*, v. 2012, 2012.
- RAJARAPU, G. Genes and Genome of HIV-1. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2014.
- REIS, M. N. D. G.; BELLO, G.; GUIMARÃES, M. L.; STEFANI, M. M. A. Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. *PLoS ONE*, v. 12, n. 6, p. 1–16, 2017.
- REZAEI, S. D.; CAMERON, P. U. Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 Integration Sites in Viral Latency. *Current HIV/AIDS Reports*, v. 12, p. 88–96, 2015.
- RUELAS, D. S.; GREENE, W. C. An integrated overview of HIV-1 latency. *Cell*, v. 155, n. 3, p. 519–529, 2013.
- SAEZ-CIRION, A; JACQUELIN, B.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; MÜLLER-TRUTWIN, M. Immune responses during spontaneous control of HIV and AIDS: what is the hope for a cure? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 369, n. figure 1, p. 20130436, 2014.
- SANABANI, S. S.; PESSÔA, R.; SOARES DE OLIVEIRA, A. C.; et al. Variability of HIV-1 Genomes among Children and Adolescents from São Paulo, Brazil. *PLoS ONE*, v. 8, n. 5, 2013.
- SANGER F; NICKLEN S; COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; Vol.74.n12pp5463-5467,December 1977.
- SANTORO, M. M.; PERNO, C. F. HIV-1 Genetic Variability and Clinical Implications. *ISRN microbiology*, v. 2013, n. August, p. 481314, 2013.
- SANTORO, M. M.; PERNO, C. F. Clinical relevance of genotypic resistance testing today. *NEW MICROBIOLOGICA*, v. 39, n. 2, p. 91–92, 2016.
- SANTOS, A. F.; SOARES, M. A. HIV genetic diversity and drug resistance. *Viruses*, v. 2, n. 2, p. 503–531, 2010.
- SEITZ, R. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 43, n. 3, p. 203–222, 2016.
- SHAFER, R. W. Genotypic Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. *Society*, v. 15, n. 2, p. 247–277, 2002.
- SHAFER, R. W. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance Mutations

- Update. *The Journal of infectious diseases*, v. 216, n. 9, p. S843–S846, 2017.
- SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2011.
- SHIMURA, K.; KODAMA, E. N. Elvitegravir: A new HIV integrase inhibitor. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, v. 20, n. 2, p. 79–85, 2009.
- SIERRA, S.; KUPFER, B.; KAISER, R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*, v. 34, p. 233–244, 2005.
- SILICIANO, R. F.; GREENE, W. C. Hiv Latency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, p. 1–19, 2011.
- SILVEIRA, A. A.; CARDOSO, L. P. V.; FRANCISCO, R. B. L.; ARAÚJO STEFANI, M. M. DE. HIV Type 1 Molecular Epidemiology in pol and gp41 Genes Among Naive Patients from Mato Grosso do Sul State, Central Western Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 28, n. 0, p. 304–307, 2012.
- SIMON, V.; HO, D.; KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment. *The Lancet*, v. 368, n. 9534, p. 489–504, 2006.
- SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. HIV-1 infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 111, p. S582–S592, 2003.
- SMITH, D. E.; WALKER, B. D.; COOPER, D. A.; ROSENBERG, E. S.; KALDOR, J. M. Is antiretroviral treatment of primary HIV infection clinically justified on the basis of current evidence? *Aids*, v. 18, n. August 2003, p. 709–718, 2004.
- SPIRA, S.; WAINBERG, M. A.; LOEMBA, H.; TURNER, D.; BRENNER, B. G. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, n. 2, p. 229–240, 2003.
- SPRINZ et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(9): 861-867.2009.
- STABILE, H.; NISTI, P.; MORRONE, S.; et al. Multifunctional human CD56^{low}CD16^{low}natural killer cells are the prominent subset in bone marrow of both healthy pediatric donors and leukemic patients. *Haematologica*, v. 100, n. 4, p. 489–498, 2015.
- STADELI, K. M.; RICHMAN, D. D. Rates of emergence of HIV drug resistance in resource-limited settings: a systematic review. *Antivir Ther*, v. 257, n. 18, p. 115–123, 2013.
- SUCUPIRA et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. *AIDS Patient Care STDS* 21: 116128.2007.
- SUNDQUIST, W.; KRAUSSLICH, H. HIV-1 Assembly , Budding , and Maturation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, v. 2, 2012.
- SUZUKI, Y.; CRAIGIE, R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nature reviews. Microbiology*, v. 5, n. 3, p. 187–96, 2007.
- TAYLOR, B.; SOBIESZCZYK, M.; M.D; et al. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 15, p. 1590–1602, 2008.
- TROTTER, A. B.; HONG, S. Y.; SRIKANTIAH, P.; et al. Systematic Review of HIV Drug Resistance in the World Health Organization Southeast Asia Region. *AIDS Rev*, v. 15, n. 3, p. 162–170, 2013.
- TUPINAMBÁS, U.; RIBEIRO, F. A.; ALEIXO, A.; GRECO, D. Treatment switch

guided by HIV-1 genotyping in Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 10, n. 2, p. 82–8, 2006.

VELASCO-DE-CASTRO, C. A.; GRINSZTEJN, B.; VELOSO, V. G.; et al. HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014.

VLADAR, E. K.; LEE, Y. L.; STEARNS, T.; AXELROD, J. D. RETROVIRAL INTEGRASE: THEN AND NOW. *Annual Rev Virology*, v. 2, n. 1, p. 37–54, 2015.

WARES, M.; MESPLÈDE, T.; QUASHIE, P. K.; et al. The M50I polymorphic substitution in association with the R263K mutation in HIV-1 subtype B integrase increases drug resistance but does not restore viral replicative fitness. *Retrovirology*, v. 11, n. 1, p. 7, 2014.

WENSING, A. M.; MD, PHD; VINCENT CALVEZ; MD, P. H. F.; et al. Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. *Topics in Antiviral Medicine*, p. 6–14, 2017.

WILLIAMS, S. A.; GREENE, W. C. Regulation of HIV-1 Latency by T-cell Activation. *Cytokine*, v. 39, n. 1, p. 63–74, 2007.

WU, L.; KEWALRAMANI, V. N. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 11, p. 859–68, 2006.

ZHANG, Z.; CHENG, L.; ZHAO, J.; et al. Plasmacytoid dendritic cells promote HIV-1 – induced group 3 innate lymphoid cell depletion. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 125, n. 9, p. 3692–703, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você/Sr./Sra. está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**Estudo de Resistência aos Antirretrovirais e Diversidade Genética em Pacientes HIV+/Aids do Interior do Estado de Goiás**”. Meu nome é **Ludimila Paula Vaz Cardoso**, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é Doenças Infecciosas e Parasitárias. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas *sobre a pesquisa* poderão ser esclarecidas pela pesquisadora responsável, via e-mail (**ludimilacardoso@gmail.com**) e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, através do(s) seguinte(s) contato(s) telefônico(s): **(64) 3603-8130/(64) 9602-1135/(62) 8405-0042**. Ao persistirem as dúvidas *sobre os seus direitos* como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa** da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

1. Informações Importantes sobre a Pesquisa:

- 1.1 **Título da Pesquisa:** Estudo de Resistência aos Antirretrovirais e Diversidade Genética em Pacientes HIV+/Aids do Interior do Estado de Goiás
- 1.2 **Justificativa e objetivos:** O vírus que causa a aids é chamado de HIV-1. Vários estudos realizados em diferentes países e no Brasil indicam que este vírus é muito variável e apresenta várias formas genéticas diferentes chamadas de subtipos. Além disto o HIV pode mudar seu material genético e ficar resistente a drogas que são normalmente utilizadas no tratamento da infecção. O objetivo deste estudo é identificar o tipo de HIV-1 responsável pela sua infecção e analisar se este vírus apresenta alterações que fazem com que o vírus não seja destruído pelas drogas usadas para combatê-lo.
- 1.3 **Procedimentos utilizados da pesquisa:** Se você concordar em participar desse estudo, nós iremos fazer perguntas sobre fatores que podem levar a maior risco para infecção pelo HIV e coletar uma única amostra de sangue que não apresenta risco grave à saúde. Os riscos da coleta de sangue são mínimos e podem incluir dor local, formação de pequenos hematomas (manchas roxas) no local da coleta e eventual tontura e vertigem. A coleta será realizada dentro de um ambiente hospitalar e na presença de médico participante da pesquisa para atender à qualquer intercorrência.
Tudo o que soubermos sobre você através do estudo e análise de prontuário médico (resultados de exames, entrevista) será confidencial. A sua identidade jamais será revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado de nenhuma maneira.
Os resultados sobre o tipo de HIV-1 que causou sua infecção e se este vírus sofreu alteração e pode não responder ao tratamento serão repassados ao laboratório onde você faz seus

exames de carga viral e contagem de CD4 ou ao médico responsável pelo seu acompanhamento.

Os procedimentos e testes laboratoriais desta pesquisa não apresentam nenhum custo financeiro a você participante.

Sua participação pode ser descontinuada a qualquer tempo, sem riscos de penalidade e sem prejuízo ao seu cuidado ou à continuidade de seu tratamento ou perda de benefícios.

- 1.4 **Confidencialidade:** Todos os dados da pesquisa serão confidenciais, somente usados pelos pesquisadores para fins científicos. Nenhum nome ou resultado individual será divulgado, permanecendo em sigilo. O paciente terá acesso aos resultados a qualquer tempo. Tudo o que soubermos sobre você através do estudo e análise de prontuário médico (resultados de exames, entrevista) será confidencial. A sua identidade jamais será revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado de nenhuma maneira.

1.2 Consentimento da Participação da Pessoa como Sujeito da Pesquisa:

Eu,, inscrito(a) sob o RG/CPF/n.º de prontuário/n.º de matrícula, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado “Estudo de Resistência aos Antirretrovirais e Diversidade Genética em Pacientes HIV+/Aids do Interior do Estado de Goiás”. Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informado (a) e esclarecido(a), pela pesquisadora responsável Dra. Ludimila Paula Vaz Cardoso, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Jataí, de de

Assinatura por extenso do(a) participante

Assinatura por extenso do(a) pesquisador(a) responsável

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica

APÊNDICE 2 – Questionário

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS - REGIONAL JATAÍ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA – CÂMPUS RIACHUELO

Rua Riachuelo, CP 03, CEP 75804-020
Telefone: (64) 3606-8130



QUESTIONÁRIO SOBRE FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HIV

DADOS GERAIS

UNIDADE:..... **Data:**...../...../.....

Nome do (a) Médico (a):.....

Nome do Paciente:..... **ID:**.....

N° do Prontuário:.....

Data de Nascimento:...../...../..... **Idade:**..... anos **Sexo:** () F () M

Endereço:.....

.....

Bairro:..... **Cidade:**..... **UF:**.....

Cidade de Residência nos Últimos Dez Anos:.....

Telefones para Contatos:.....

Escolaridade:..... **Profissão:**.....

Tipo de Exposição:

() parceiro heterossexual HIV +/-aids () parceiro homossexual HIV +/-aids

() usuário de drogas injetáveis () transfusão de sangue

() transmissão vertical (mãe/filho) () outro

Ano, Local e Unidade de Diagnóstico da Infecção pelo HIV:.....

Tem Filhos? () Não () Sim **Quantos?**.....

Tem Algum Filho com HIV/aids? () Não () Sim **Quantos?**..... **Qual Idade?**.....

Em Esquema Anti-retroviral? () Não-Naive:.....

() Sim- Início do Tratamento:.....

Município e Unidade da realização do tratamento:.....

NNRT:.....

NRT:.....

IP:.....

Último Resultado da Carga Viral:..... **Data:**...../...../.....

Último Resultado da Contagem de CD4:..... **Data:**...../...../.....

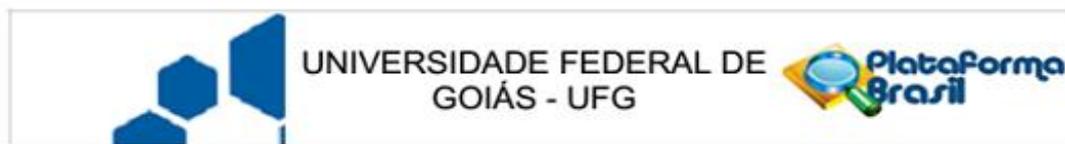
Último Resultado da Contagem de CD8:..... **Data:**...../...../.....

Observações:.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Assinatura do responsável pelo Questionário

Data/...../.....

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de Resistência aos Antirretrovirais e Diversidade Genética em Pacientes HIV+/Aids do interior do Estado de Goiás

Pesquisador: Ludimila Paula Vaz Cardoso

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39631114.1.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.009.763

Data da Relatoria: 06/04/2015

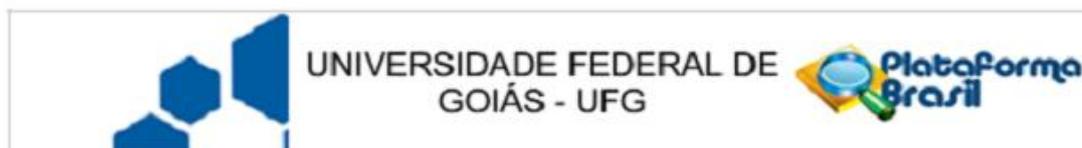
Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: Estudo de Resistência aos Antirretrovirais e Diversidade Genética em Pacientes HIV+/Aids do interior do Estado de Goiás. Pesquisadora responsável: Ludimila Paula Vaz Cardoso. CAAE: 39631114.1.0000.5083. Pesquisadores participantes: Camila Tavares; Mariane Martins de Araújo Stefani; Mônica Nogueira da Guarda Reis; Regyane Ferreira Guimarães Dias; Simone Gonçalves da Fonseca. Serão coletadas 200 amostras está prevista a coleta de 200 amostras de sangue de pacientes infectados pelo HIV-1 (cerca de 80 amostras de sangue de pacientes virgens de tratamento e cerca de 120 amostras de pacientes em TARV) atendidos no SAE do município de Jataí/Go que recebe praticamente todos os casos novos de HIV e pacientes em TARV do município de Jataí e de outros municípios da região sudoeste de Goiás, como Rio Verde, Mineiros, Caiapônia, Itarumã, Aparecida do Rio Doce, Caçu, Cachoeira Alta, Serranópolis e Perolândia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a prevalência de mutações do HIV-1 às drogas antirretrovirais e o perfil de resistência transmitida e secundária no gene pol e env do HIV-1 em amostras de pacientes HIV+/Aids provenientes de municípios do sudoeste do estado de Goiás e caracterização de possíveis novas formas recombinantes (CRF) pela análise do genoma completo.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.009.763

Objetivo Secundário:

1.Descrever as mutações de resistência primária e secundária no gene pol do HIV-1 associada aos antirretrovirais INRT, INNRT, IP e Raltegravir (inibidor de integrase);2.Descrever as mutações de resistência primária e secundária no gene env do HIV-1 associada ao antirretroviral T-20 (inibidor de fusão); 3.Associar o perfil de resistência (baixo, intermediário e alto nível de resistência) das mutações aos antirretrovirais;4.Descrever os polimorfismos no gene pol e env de isolados do HIV-1; 5.Descrever os subtipos no gene pol e env do HIV-1;6.Associar os subtipos e a frequência de mutações de resistência e polimorfismos;7. Caracterizar, por sequenciamento do genoma completo, alguns isolados com subtipos discordantes nos genes pol e env do HIV-1 para identificação de possíveis CRF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Relatam que: Aproximadamente 10 mL de sangue venoso serão coletados no momento do recrutamento do paciente em dois tubos contendo o anticoagulante EDTA. Esta coleta de sangue não apresenta risco à saúde e integridade física dos pacientes.Relatam ainda que os pacientes terão o resultado dos exames.

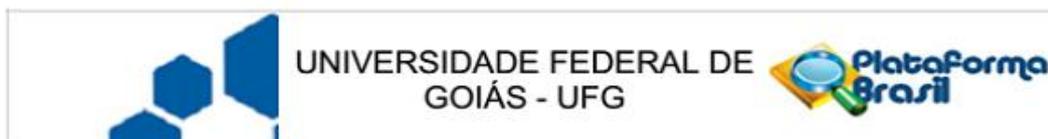
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O cronograma está adequado à execução do projeto. Informam que os participantes da pesquisa são maiores de 18 anos e a coleta das amostras de sangue será realizada na presença do médico. Os currículos dos pesquisadores são compatíveis com a pesquisa proposta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentam os seguintes documentos: PB XML INTERFACE REBEC.xml; PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 439141.pdf; Folha Rosto.pdf; Questionário CEP.docx; Projeto Pesquisa 2014 CEP.doc; TCLE - 2014 - CEP.doc; Ata do Conselho Diretor.2014.pdf; Termo Anuência.pdf; Termo Compromisso.pdf; TALE 2014 - CEP.doc; PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 439141.pdf; PB XML INTERFACE REBEC.xml; termo aceite financiamento.pdf. O TCLE encontra-se adequado, com linguagem clara, garante o sigilo, a confidencialidade e possibilita ao participante a desistência e informa contatos. PB PARECER COLEGIADO 970585.pdf; PB PARECER CONSUBSTANCIADO CEP 970592.pdf; Projeto Pesquisa 2014 CEP.doc; PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 439141.pdf; PB XML INTERFACE REBEC.xml.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.009.763

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados verifica-se que houve a adequação do cronograma quanto ao início da coleta de dados para 20/04/2015 a 30/11/2016. Somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que a Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS nº. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para 29/12/2017.

GOIANIA, 02 de Abril de 2015

Assinado por:
João Batista de Souza
 (Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com

ANEXO 2 – Localização Dos Primers

INTEGRASE

4081 4140
 atcaaaagtgaatcagaagttagtcaatcaataatagagcaortaatataaaaaggaaaagg
 D Q S E S E L V N Q I I E Q L I K K E K
 I K V N Q S - S I K - - S S - - K R K R
 S K - I R V S Q S N N R A V N K K G K G

4141 4200
 tctatctggcatgggtaccagcaca caaaggatctggaggaaatgaacaagtatgaat
 V Y L A W V P A H K G I G G N E Q V D K
 S I W H G Y Q H T K E L E E M N K - I N
 L S G M G T S T Q R N W R K - T S R - I

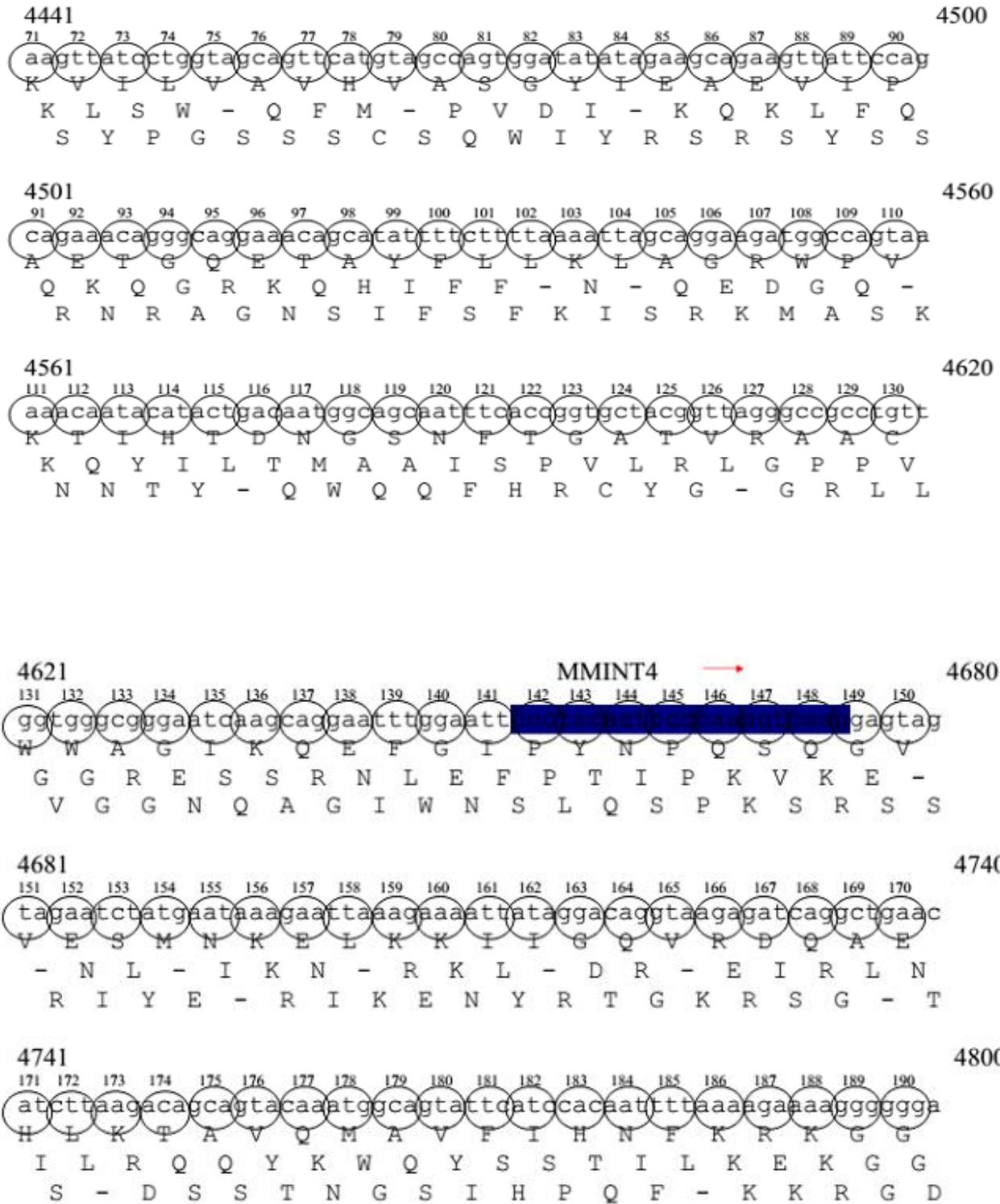
Pol 31 Integrase

4201 4260
 tagtcaagtctggaatcagcaaaactactat¹t²tttagat³gg⁴aat⁵ag⁶ata⁷agg⁸cc⁹ca¹⁰agatg
 L V S A G I R K V L F L D G I D K A Q D
 - S V L E S G K Y Y F - M E - I R P K M
 S Q C W N Q E S T I F R W N R - G P R -

4261 4320
¹¹a¹²ac¹³at¹⁴g¹⁵ag¹⁶aa¹⁷at¹⁸at¹⁹c²⁰ac²¹ag²²ta²³at²⁴t²⁵gg²⁶ag²⁷ag²⁸ca²⁹at³⁰gg³¹ct³²ag³³tg³⁴at³⁵tt³⁶ta³⁷aa³⁸ct³⁹g⁴⁰cc⁴¹ac⁴²ct⁴³g
 E H E K Y H S N W R A M A S D F N L P P
 N M R N I T V I G E Q W L V I L T C H L
 T - E I S Q - L E S N G - - F - P A T C

4321 4380
³¹tag³²tag³³ca³⁴aa³⁵aga³⁶aat³⁷ag³⁸tag³⁹cc⁴⁰ag⁴¹ct⁴²gt⁴³g⁴⁴ata⁴⁵aa⁴⁶at⁴⁷gt⁴⁸c⁴⁹ag⁵⁰ct⁵¹aa⁵²aa⁵³gg⁵⁴aga⁵⁵ag⁵⁶cc⁵⁷at⁵⁸gc
 V V A K E I V A S C D K C Q L K G E A M
 - - Q K K - - P A V I N V S - K E K P C
 S S K R N S S Q L - - M S A K R R S H A

4381 4440
⁵¹at⁵²gg⁵³aca⁵⁴ag⁵⁵tag⁵⁶act⁵⁷gt⁵⁸agt⁵⁹cc⁶⁰ag⁶¹ga⁶²ata⁶³tg⁶⁴g⁶⁵ca⁶⁶act⁶⁷ag⁶⁸at⁶⁹gt⁷⁰ac⁷¹ac⁷²at⁷³ct⁷⁴aga⁷⁵agg⁷⁶aa
 H G Q V D C S P G I W Q L D C T H L E G
 M D K - T V V Q E Y G N - I V H I - K E
 W T S R L - S R N M A T R L Y T F R R K



4801 ← XXXXXXXXXX 4860
 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210
 ttggggggg XXXXXXXXXX gtagacataatagcaacagacatacaacta
 I G G Y S A G E R I V D I I A T D I Q T
 L G G T V Q G K E - - T - - Q Q T Y K L
 W G V Q C R G K N S R H N S N R H T N -

4861 4920
 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230
 aagaactaca~~aa~~aaacaaattaca~~aa~~aat~~tc~~aaaat~~ttt~~cggtttattacagggacagca
 K E L Q K Q I T K I Q N F R V Y Y R D S
 K N Y K N K L Q K F K I F G F I T G T A
 R I T K T N Y K N S K F S G L L Q G Q Q

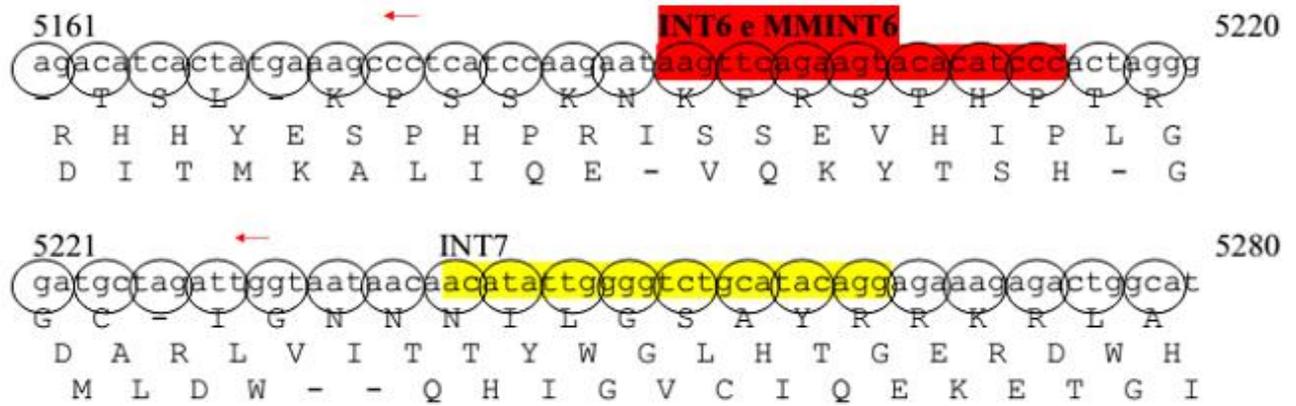
4921 4980
 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250
 gaatccactttggaaggaccagcaagctctctggaagggtgaaggggcagtagtaa
 R N P L W K G P A K L L W K G E G A V V
 E I H F G K D Q Q S S S G K V K G Q - -
 K S T L E R T S K A P L E R - R G S S N

Vif

4981 5040
 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270
 tacaagataatagtgcacataaaagttagtgccaagaagaaaagcaagatcattaggggatt
 I Q D N S D I K V V P R R K A K I I R D
 Y K I I V T - K - C Q E E K Q R S L G I
 T R - - - H K S S A K K K S K D H - G L

5041 5100
 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289
 atggaaaacagatggcaggtgatgatgtgtgccaagttagacaggatgaggattacaaca
 Y G K Q M A G D D C V A S R Q D E D - N
 M E N R W Q V M I V W Q V D R M R I R T
 W K T D G R - - L C G K - T G - G L E H

5101 5160
 ttgaaaagttagtaaaacacccatagtatgttttcagggaaagctaggggatggttttat
 M E K F S K T P Y V C F R E S - G M V L
 W K S L V K H H M Y V S G K A R G W F Y
 G K V - - N T I C M F Q G K L G D G F I



ANEXO 3 - Lista De Polimorfismos

POLIMORFISMO	Nº DE AMOSTRAS	%
V201I	41	79
L101I	26	50
I72V	25	48
V31I	20	38,5
S39C	18	34,6
L28I	18	34,6
S17N	17	32,7
T125A	13	25
T124N	13	25
A265V	13	25
T124A	13	25
E11D	13	25
D256E	12	23
D232E	9	17,3
T206S	9	17,3
T122I	9	17,3
K136Q	9	17,3
S119P	9	17,3
K211R	7	13,5
R284G	7	13,5
S283G	7	13,5
T218I	7	13,5
S119T	7	13,5
I203M	6	11,5
L74I	6	11,5
I84L	6	11,5
R269K	6	11,5
S230N	6	11,5
V37I	6	11,5
L234V	5	9,6
K14R	5	9,6
I135V	5	9,6
T218S	4	7,8
D6N	4	7,8
L45V	4	7,8
D167E	4	7,8
T112I	4	7,8
A23V	4	7,8

F181L	4	7,8
D7E	4	7,8
M50I	4	7,8
I208L	4	7,8
E10D	4	7,8
K156N	4	7,8
A205S	4	7,8
L234I	4	7,8
K111T	3	5,8
V165I	3	5,8
A91T	3	5,8
T125V	3	5,8
T218TS	3	5,8
K7Q	3	5,8
D288N	3	5,8
Y227F	3	5,8
N222K	3	5,8
T112V	3	5,8
I251L	3	5,8
R20K	2	3,8
S119R	2	3,8
G163T	2	3,8
Q216H	2	3,8
V32I	2	3,8
G163Q	2	3,8
L63I	2	3,8
K215N	2	3,8
D6T	2	3,8
T125M	2	3,8
D253H	2	3,8
D279G	2	3,8
A21S	2	3,8
I72IV	2	3,8
K103R	2	3,8
K111R	2	3,8
G193E	2	3,8
TD207E	2	3,8
T210I	2	3,8
V151I	2	3,8
K219N	2	3,8
D25E	2	3,8
D6E	2	3,8

K188R	2	3,8
I60M	2	3,8
I220L	2	3,8
V31IV	1	1,9
G189K	1	1,9
S17S	1	1,9
L45Q	1	1,9
L234Q	1	1,9
D253E	1	1,9
K211Q	1	1,9
Q214H	1	1,9
N254K	1	1,9
D278G	1	1,9
D286N	1	1,9
N27H	1	1,9
S119G	1	1,9
T124TN	1	1,9
A265AV	1	1,9
I200L	1	1,9
I91M	1	1,9
G192W	1	1,9
I217V	1	1,9
E287A	1	1,9
I191G	1	1,9
Q221N	1	1,9
G193D	1	1,9
K211T	1	1,9
T124E	1	1,9
G163E	1	1,9
A91E	1	1,9
I191S	1	1,9
Q221G	1	1,9
K71Q	1	1,9
I89IV	1	1,9
I191K	1	1,9
S39SCNY	1	1,9
K111KQ	1	1,9
K188KR	1	1,9
T206TS	1	1,9
K111Q	1	1,9
Q216H	1	1,9
V26I	1	1,9

I141V	1	1,9
E13D	1	1,9
T210I	1	1,9
G277DY	1	1,9
V281VM	1	1,9
K14KR	1	1,9
Q95H	1	1,9
L45I	1	1,9
I60V	1	1,9
G70N	1	1,9
T122TI	1	1,9
D232N	1	1,9
V32I	1	1,9
M145L	1	1,9
P30H	1	1,9
D278N	1	1,9
N254S	1	1,9
S255G	1	1,9
P90S	1	1,9
H171Q	1	1,9
G70E	1	1,9
T124S	1	1,9
K160Q	1	1,9
G70GE	1	1,9
K173R	1	1,9
V126M	1	1,9
L234L	1	1,9
V126L	1	1,9
K111R	1	1,9
D265V	1	1,9
M275V	1	1,9
S263G	1	1,9