

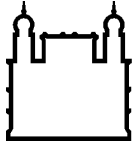
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária

ESTUDO DAS QUASISPÉCIES DE HIV-1 NO CONTEXTO DA
TERAPIA ANTIRRETROVIRAL INICIADA DURANTE A INFECÇÃO
AGUDA E DA TERAPIA DE RESGATE COM MARAVIROQUE

THAYSSE CRISTINA NEIVA FERREIRA LEITE

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

THAYSSE CRISTINA NEIVA FERREIRA LEITE

Estudo das quasispécies de HIV-1 no contexto da terapia antirretroviral iniciada durante a infecção aguda e da terapia de resgate com maraviroque

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador: Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães

RIO DE JANEIRO
Fevereiro de 2019

Leite, Thaysse Cristina Neiva Ferreira.

Estudo das quasispécies de HIV-1 no contexto da terapia antirretroviral iniciada durante a infecção aguda e da terapia de resgate com maraviroque / Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite. - Rio de Janeiro, 2019.

xvi, 134f. ; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientadora: Monick Lindenmeyer Guimarães.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. HIV-1. 2. Reservatório. 3. Diversidade. 4. Quasispécies. 5. Maraviroc. I. Título.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: THAYASSE CRISTINA NEIVA FERREIRA LEITE

**ESTUDO DAS QUASISPÉCIES DE HIV-1 NO CONTEXTO DA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL INICIADA DURANTE A INFECÇÃO AGUDA E DA TERAPIA DE
RESGATE COM MARAVIROQUE**

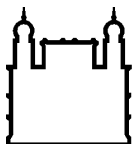
ORIENTADOR: Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães

Aprovada em: 26/02/2019

EXAMINADORES:

Dra. Lara Esteves Coelho - Presidente (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas)
Dr. André Felipe Andrade dos Santos (Universidade Federal do Rio de Janeiro)
Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido (Instituto Adolfo Lutz)
Dra. Natalia Motta de Araujo (Instituto Oswaldo Cruz)
Dra. Luciana Jesus da Costa (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite**, sob orientação da Dr^a. Monick Lindenmeyer Guimarães. Ao vigésimo sexto dia do mês de fevereiro de dois mil e dezenove, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **"Estudo das quasispésies de HIV-1 no contexto da terapia antirretroviral iniciada durante a infecção aguda e da terapia de resgate com Maraviroque"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Genética e Bioquímica, na linha de pesquisa: Genética de Parasita, Vetores e Hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Lara Esteves Coelho - INI/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido - IAL/SP, Dr. Andre Felipe Andrade dos Santos - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Natalia Motta de Araujo - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Luciana Jesus da Costa - UFRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora, Rio de Janeiro, 26 de fevereiro de 2019.



Dr^a. Lara Esteves Coelho (Presidente da Banca):


Dr. Luis Fernando de Macedo Brígido (Membro da Banca):


Dr. Andre Felipe Andrade dos Santos (Membro da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Dedico esta tese aos meus amigos Diogo e Nathalia, por terem sido meus pilares ao longo da minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida ao longo destes quatro anos.

À Dra. Monick Guimarães, pela orientação exemplar desde a iniciação científica, pelos ensinamentos não só científicos, como humanos. Obrigada por sempre confiar em mim, esse trabalho é nosso! Te admiro.

Aos Drs. José Henrique Pilotto, Dra. Sandra Wagner, Dra. Isabel Tavares, Dr. Walter Eyer-Silva, Dra. Ana Cristina Ferreira, Dra. Michele Morata e Dra. Valdilea Veloso, pela colaboração no recrutamento dos indivíduos estudado nesta tese.

À Dra. Mariza Morgado, pelos conselhos científicos sempre enriquecedores e por revisar com carinho o Documento 2.

Às Dra. Aline Moreira, Marília Melo e Beatriz Muller da Plataforma de Sequenciamento de DNA de Nova Geração do IOC (PDTIS/FIOCRUZ), muito obrigada pelo auxílio na preparação das bibliotecas genômicas e no sequenciamento convencional toda vez que o sequenciador resolvia “dar um tempo”.

Ao Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro por permitir o uso do Illumina MiSeq.

Agradeço ao Dr. Edson Delatorre pela parceria no desenvolvimento do Documento 1 desta tese.

Aos amigos MSc. Diogo Caetano e MSc. Nathalia Beatriz por toda ajuda científica e pessoal, motivação e por tornarem o período do doutorado mais leve e divertido.

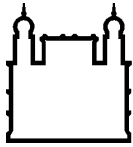
À equipe do Laboratório de aids e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), pela ajuda de sempre e pelas discussões científicas fundamentais para minha formação acadêmica.

Agradeço a Deus por me iluminar, aos meus pais, irmã, meu marido e amigos por todo incentivo, apoio e por me ajudarem a manter o foco.

Agradeço aos voluntários que aceitaram participar do trabalho, sem os mesmos esta tese não seria possível.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DAS QUASISPÉCIES DE HIV-1 NO CONTEXTO DA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL INICIADA DURANTE A INFECÇÃO AGUDA E DA TERAPIA DE RESGATE COM MARAVIROQUE

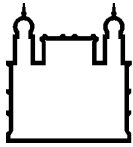
RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite

A recomendação atual do Ministério da Saúde do Brasil é oferecer a terapia antirretroviral combinada (cART) para todos os indivíduos infectados pelo HIV-1 assim que diagnosticados, independente de seu status imunológico e/ou virológico. A cART quando iniciada precocemente visa uma mais rápida e melhor recuperação imunológica e a diminuição da transmissão. No entanto, o seu impacto no tamanho, na composição e na diversidade do reservatório, necessita ser melhor caracterizado. Estudo 1: O primeiro trabalho desta tese teve como objetivos avaliar o efeito do início da cART precoce no tamanho do reservatório proviral e avaliar a complexidade das quasispécies no plasma e nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC). O estudo incluiu dez indivíduos infectados pelo HIV diagnosticados na fase aguda da infecção (Fiebig II-V), e os momentos antes (PRE_{ART}) e 12 meses ($M12_{ART}$) após a cART foram avaliados. O tempo médio para atingir a supressão viral foi de três meses. Em $M12_{ART}$, observamos aumento de ~ 200 células T CD4 + ($P = 0,008$) e normalização da relação CD4/CD8 [1,0 Intervalo interquartil (IIQ): 0,88-1,18], $P = 0,016$], bem como diminuição significativa nos níveis de RNA (~ 4 log, $P = 0,004$) e DNA (~ 1 log, $P = 0,002$) do HIV-1. Também detectamos pequena redução na diversidade proviral, e diminuição significativa na entropia normalizada de Shannon (H_{SN}). Esses resultados sugerem uma redução significativa no tamanho e complexidade do DNA total de HIV-1 no reservatório de PBMC e a restauração imunológica independente da da contagem de RNA viral inicial, da contagem de células T CD4 + ou do subtipo de HIV-1. Diante do surgimento de mutações que conferem resistência aos fármacos, novos alvos terapêuticos foram desenvolvidos. Estudo 2: O maraviroque (MVQ) visa bloquear o correceptor de entrada CCR5, e seu uso no Brasil é como opção resgate nos indivíduos multi-experimentados. Nesse estudo, avaliamos o impacto da cART incluindo MVQ nas quasispécies virais R5 e X4-trópicas em indivíduos com infecção crônica pelo HIV e multi-experimentados. Dos 20 indivíduos recrutados, apenas 8 apresentaram vírus R5 pelo sequenciamento convencional da região V3 e foram incluídos nesse análise. O sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizado para avaliar as quasispécies virais antes (PRE_{MVC}) e 1 ano após a cART contendo MVQ ($POST_{MVC}$). Foi observado recuperação imunológica (média de aumento de ~200 células T CD4+). A

terapia contendo MVQ foi capaz de manter/alcançar o controle virológico para todos os indivíduos estudados, apesar da presença de uma pequena frequência de variantes X4 em PRE_{MVC} (5,4 a 34,4%) em 3/8 indivíduos. Em dois desses, as variantes X4 dominaram na visita POST_{MVC}, apesar da supressão viral ao longo do estudo. Cinco indivíduos apresentaram variantes R5 em ambos momentos. Nossos achados demonstraram que a terapia contendo MVQ foi efetiva para a maioria dos indivíduos estudados e que o uso de NGS antes e durante a terapia contendo MVQ é importante no monitoramento de quasispécies virais. Em conjunto, podemos concluir que os estudos desenvolvidos nessa tese reforçam o conhecimento sobre a dinâmica das quasispécies virais sob a pressão seletiva da cART iniciada precocemente, e do uso da terapia contendo MVQ.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF THE HIV-1 QUASISPECIES IN THE CONTEXT OF THE ANTIRETROVIRAL THERAPY INITIATED DURING ACUTE INFECTION AND THE RESCUE THERAPY WITH MARAVIROC

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITARY BIOLOGY

Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite

The Brazilian Ministry of Health's current recommendation is to offer combination antiretroviral therapy (cART) for all HIV-1 infected individuals as soon as they are diagnosed, regardless of their immunological or virological status. A cART when started early aims for faster and better immune recovery and decreased transmission. However, its impact on the size, composition, and diversity of the reservoir needs to be better characterized. Study 1: The aim of this study was to evaluate the effect of early cART on proviral reservoir size and to evaluate the complexity of quasispecies in plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The study included ten HIV-infected individuals diagnosed in the acute phase of infection (Fiebig II-V), and the moments before (PRE_{ART}) and 12 months (M12_{ART}) after cART were evaluated. The mean time to reach viral suppression was three months. In M12_{ART}, we observed a gain of ~ 200 CD4 + T cells ($P = 0.008$) and a normalization of the CD4 / CD8 ratio [1.0 (Interquartile range (IQR): 0.88-1.18), $P = 0.016$], as well as a significant decrease in HIV-1 RNA (~ 4 log, $P = 0.004$) and DNA (~ 1 log, $P = 0.002$) levels. We also detected a small reduction in proviral diversity and a significant decrease in H_{SN}. These results suggest a significant reduction in the size and complexity of total HIV-1 DNA in the PBMC reservoir and the immune restoration independent of the initial viral RNA count, CD4 + T cell count or HIV-1 subtype. Faced with the emergence of mutations that confer resistance to drugs, new therapeutic targets have been developed. Study 2: The maraviroc (MVC) aims to block the CCR5 input coreceptor, and since its use was being introduced in Brazil as a rescue in the treatment-experienced individuals. Given this, we propose to evaluate the impact of cART including MVC on the viral R5 and X4-tropic quasispecies in chronic and multi-experienced individuals. Of the 20 individuals recruited, only 8 presented R5 viruses by conventional V3 region sequencing and were included in that analysis. New generation sequencing (NGS) was performed to evaluate viral quasispecies before (PRE_{MVC}) and one year after cART containing MVC (POST_{MVC}). Immunologic recovery (mean increase of ~ 200 CD4 + T cells) was observed. MVQ-containing therapy was able to maintain/achieve virological control for all subjects, despite the presence of a small frequency of X4 variants in PRE_{MVC} (5.4 to 34.4%) in 3/8 individuals. In two of these, X4 variants dominated the POST_{MVC} visit despite viral suppression throughout the study. Five individuals presented R5 variants at both times. Our findings demonstrated that MVQ-containing therapy was effective for most of the individuals studied and the use of NGS before and during MVQ-containing therapy is important in monitoring viral quasispecies. Taken together, we can

conclude that the studies developed in this thesis reinforce the knowledge about the dynamics of viral quasispecies under the selective pressure of early-initiated cART and the use of the MVQ-containing therapy.

ÍNDICE

RESUMO	viii	
ABSTRACT	x	
1	Introdução	1
1.1	Histórico e epidemiologia do HIV	1
1.2	Classificação, características estruturais e genoma do HIV	5
1.3	O ciclo replicativo do HIV	8
1.4	Origem e diversidade genética do HIV	9
1.4.1	Epidemiologia molecular do HIV-1	12
1.5	O evento de transmissão do HIV	13
1.6	A história natural da infecção pelo HIV	14
1.7	Estratégia terapêutica e resistência do HIV aos antirretrovirais	18
1.8	Reservatórios do HIV	20
1.9	O tropismo do HIV-1	24
1.9.1	Fatores virais relacionados ao tropismo do HIV-1	26
1.9.2	Antagonistas dos correceptores	28
1.9.3	Determinação do tropismo viral	29
1.9.4	Resistência ao Maraviroque	32
2	JUSTIFICATIVA	34
3	Objetivos	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos Específicos	36
4	DOCUMENTOS	37
4.1	Documento 1 – “Reduction of HIV-1 reservoir size and diversity after one year of cART among individuals starting treatment during early stages of acute infection”	37
4.2	Documento 2 – “Genotypic analysis of HIV-1 V3 env from chronic infected individuals on maraviroc-containing therapy”	67
5	Discussão	88
6	Conclusões	96

7	Referências Bibliográficas	97
8	Anexos	129
9	Apêndice	132
9.1	APÊNDICE 1	133
9.2	APÊNDICE 2	134

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias de prevenção combinada da transmissão e da infecção..	3
Figura 2: Cascata de cuidado contínuo do HIV. Ministério da Saúde do Brasil, 2017.	4
Figura 3: Representação esquemática do genoma proviral do HIV-1.	5
Figura 4: Representação da estrutura secundária da glicoproteína gp120 do envelope viral.	6
Figura 5: Estrutura terciária tridimensional da alça V3 da gp120.	7
Figura 6: Representação esquemática da geração de quasispécies.	11
Figura 7: Gráfico representativo da história natural da infecção aguda e precoce pelo HIV-1 com representação do diagnóstico de acordo com os estágios de Fiebig (Fiebig e cols. 2003)..	16
Figura 8: História natural da infecção pelo HIV..	17
Figura 9: Representação esquemática do tamanho e a composição do reservatório latente do HIV sob influência pela terapia antirretroviral nas infecções crônicas e aguda/recente..	23
Figura 10: Classificação biológica do HIV-1 baseada no tropismo viral.	25
Figura 11: Representação esquemática da evolução das populações R5 e X4 do HIV-1 durante a infecção..	26
Figura 12: Ilustração do trímero das glicoproteínas do envelope em interação com CD4 e correceptor.	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CA	Capsídeo
CCR5	Receptor de alfa-quimiocinas 5
CD4	Grupamento de diferenciação 4
cART	Terapia antirretroviral combinada
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América, do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CRF	Forma Recombinante Circulante, do inglês <i>circulating recombinant forms</i>
CV	carga viral
CXCR4	receptor de beta-quimiocinas 4
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	Deoxiribonucleotídeo trifostato
env	Gene que codifica as proteínas do envelope viral
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gag	Gene do grupo antígeno do HIV
GALT	Tecido Linfóide Associado ao Intestino, do inglês <i>gut-associated lymphoid tissues</i>
gp120	Glicoproteína de 120 Kd
gp41	Glicoproteína de 41 Kd
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSH	Homem que faz sexo com homem
HTLV	vírus T-linfotrópico humano
HSH	Homens que fazem sexo com homens
HXB2	Isolado Viral do HIV-1
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, do inglês <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
INI	inibidor da integrase
INNTR	inibidor não-nucleosídeo da transcriptase reversa
INTR	inibidor nucleosídeo da transcriptase reversa
IST	Infecção sexualmente transmissível
IP	inibidor da protease

IQR	variação interquartil, do inglês <i>Interquartile range</i>
LAV	vírus associado à linfadenopatia
LTNP	Não progressores de longo termo
LTR	Terminações Longas Repetidas, do inglês <i>long terminal repeat</i>
MA	Matriz
MS	Ministério da Saúde
MVQ	Maraviroque
NC	Nucleocapsídeo
Nm	Nanômetros
Pb	Pares de base
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico, do inglês <i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
Pol	Gene da polimerase do HIV
R5	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CCR5
R5X4	Isolado de HIV-1 capaz de utilizar os receptores CCR5 e CXCR4
RNA	Ácido Ribonucléico
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SIVcpz	Vírus da imunodeficiência símia infectando chimpanzés
SIVgor	Vírus da imunodeficiência símia infectando gorilas
SIVsmm	Vírus da imunodeficiência símia infectando macacos mangabey
TR	Transcriptase Reversa
UNAIDS	Programa das Nações Unidas no combate ao HIV/Aids
URF	Forma Recombinante Única, do inglês <i>unique recombinant forms</i>
V3	Terceira região variável da gp120 do envelope do HIV-1
X4	Isolado de HIV-1 que utiliza o receptor CXCR4

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e epidemiologia do vírus da imunodeficiência humana

No início da década de 1980, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC), em Atlanta, foi alertado sobre um grupo de homens que fazem sexo com homens (HSH) que apresentavam sintomas de pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* (anteriormente denominado *Pneumocystis carinii*), um fungo oportunista raro conhecido por infectar pacientes com sistema imune comprometido (1,2), e de outros que apresentavam um câncer de pele raro conhecido com Sarcoma de Kaposi (3), sendo todos anteriormente considerados saudáveis. Esses relatos foram associados a uma provável síndrome que causava imunossupressão e linfadenopatia generalizada. Posteriormente, também observados em outros grupos de pessoas como: usuários de drogas injetáveis, hemofílicos, parceiras sexuais de homens infectados, transfundidos, crianças e indivíduos da região central da África (4–6). Através de esforços do CDC em estudar a origem destes surtos, em 1982, esta síndrome foi denominada como síndrome da imunodeficiência adquirida (aids – do inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome*).

Após dois anos dos primeiros relatos, dois grupos de pesquisa liderados por Gallo e Montaigner descreveram que o agente etiológico desta síndrome poderia ser um retrovírus (7–9). Gallo acreditava ser um isolado do vírus T-linfotrópico humano (HTLV) e o nomeou como HTLV-III (9). Montagnier e colaboradores isolaram o vírus e o denominaram como vírus associado à linfadenopatia (LAV) (7). Em 1986, esse vírus, que exibia características morfológicas e genéticas típicas do gênero lentivírus, se que tratava do mesmo isolado (10), foi então denominado vírus da imunodeficiência adquirida (HIV- do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) (11). Posteriormente, no mesmo ano, um retrovírus semelhante foi recuperado de indivíduos de Guiné-Bissau e Cabo Verde (12), e então, os isolados virais obtidos de Gallo e Montaigner foram renomeados para HIV-1 e este mais recente, para HIV-2, para que pudessem ser distinguidos (12,13). Apesar do HIV ser um dos vírus mais bem estudados e caracterizados, ainda não foi possível obter a cura para a infecção pelo mesmo.

Desde a sua identificação, o HIV já infectou 77,3 milhões [59,9 –100 milhões] milhões de indivíduos no mundo e, desses, cerca de 35,4 milhões [25,0–49,9 milhões]

foram a óbito por causas associadas ao mesmo, tornando-se assim o patógeno de maior impacto dos últimos tempos (14). No final de 2017, dados estimados pela UNAIDS e Organização Mundial da Saúde (OMS) revelaram que 36,9 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV, e doenças relacionadas a aids foram responsáveis pela morte de 940.000 indivíduos neste mesmo ano. A prevalência mundial da infecção pelo HIV parece ter se estabilizado em 0,8% (0,7-0,9%) (14) na última década, com um aumento do número absoluto de pessoas infectadas devido a diminuição da taxa de mortalidade em decorrência do crescente acesso à terapia antirretroviral combinada de alta potência (cART). O número de pessoas em uso de cART alcançou 21,7 milhões até junho de 2017, o equivalente a 59% dos indivíduos infectados pelo HIV, um grande passo para a redução da mortalidade e as taxas de transmissão afim de se alcançar as metas estabelecidas pela UNAIDS para se obter o fim da epidemia de aids até 2030 (15). Estas metas, chamadas de “90-90-90” estabelecem que até 2020, 90% de todas as pessoas infectadas pelo HIV estarão diagnosticadas; 90% deste grupo receberão cART ininterruptamente; e, 90% das pessoas tratadas alcançarão a supressão da carga viral (16). Quando esta meta tríplice for atingida, ao menos 73% das pessoas infectadas pelo HIV no mundo terão carga viral indetectável, e modelos matemáticos sugerem que o alcance destas metas até 2020 permitirá o fim da epidemia de aids até 2030 (16). De acordo com os dados publicados em 2017, até este ano, 75% das pessoas infectadas têm conhecimento do seu status; entre as pessoas diagnosticadas, 79% estão em uso de cART e dessas, 81% estão suprimidas virologicamente (14). Estes resultados demonstram um grande avanço rumo ao alcance das metas propostas.

No continente americano, o número de pessoas infectadas é crescente na América do Norte principalmente pelo aumento da disponibilidade da cART, mesmo que a incidência esteja estável em cerca de 50.000 novas infecções por ano desde a década de 1990. Os grupos mais afetados são os HSH e usuários de drogas. A região do Caribe possui, depois da África Subsaariana, a maior prevalência de HIV em adultos, com aproximadamente 310.000 pessoas infectadas em 2017. Nesta região há um predomínio da transmissão heterossexual, sendo o grupo HSH importante em alguns países. Já a América Latina apresenta em torno de 1,8 milhões de pessoas infectadas pelo HIV, compondo uma epidemia diversa, porém, a maior parte das transmissões são em HSH e trabalhadores do sexo (15). Mais da metade das pessoas vivendo com HIV na América

Latina se concentram nos quatro maiores países da região: Brasil, Colômbia, México e Argentina.

O Brasil é responsável por 35% das infecções da América Latina, o que corresponde a uma prevalência nacional menor do que 1% (15). Porém, nos grupos de maior vulnerabilidade são observadas taxas de prevalências mais elevadas, como em torno de 25% em mulheres transgênero (17,18), 18,4% em HSH (19), 12% em usuários de drogas (20) e 5,3% em profissionais do sexo (21), por exemplo. A alta prevalência do HIV nessas populações pode ser explicada pelas dificuldades desses grupos no acesso aos serviços de saúde devido a fatores como o preconceito, o estigma e a discriminação, como também a persistência das práticas de sexo anal desprotegido principalmente pelo grupo HSH. (22,23). Atualmente vem sendo utilizada uma estratégia de prevenção combinada pelo Ministério da Saúde principalmente em populações chave e prioritárias. Esta prevê a oferta de testes anti-HIV, anti-hepatites virais e para infecções sexualmente transmissíveis, visando diagnóstico e tratamento cada vez mais precoces, implantando políticas de redução de danos, prevenindo a transmissão vertical e ainda com o uso da terapia como profilaxia pré-exposição (PreP) e pós-exposição (PEP). Esta estratégia tem como intuito conter o avanço da epidemia da aids, um grande desafio à saúde pública brasileira e mundial (Figura 1).



Figura 1: Estratégias de prevenção combinada da transmissão e da infecção. Ministério da Saúde do Brasil, 2017.

De acordo com os dados estimados pelo Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais do Ministério da Saúde, entre 2007 até junho de 2017, 194.217 casos de infecção pelo HIV foram notificados, sendo que a região Sudeste abrange o maior número de casos com 49,7% dos indivíduos, seguida pelas regiões Sul (20,7%), Nordeste (15,6%), Norte (7,4%) e Centro-Oeste (6,7%). Dados coletados no fim de 2017 estimam que cerca de 866 mil indivíduos estavam infectados pelo HIV no país, dos quais 84% estavam diagnosticados; 79% haviam sido vinculados ao serviço de saúde; 63% estavam em uso de cART e desses, 58% apresentavam supressão viral (Figura 2) (24).

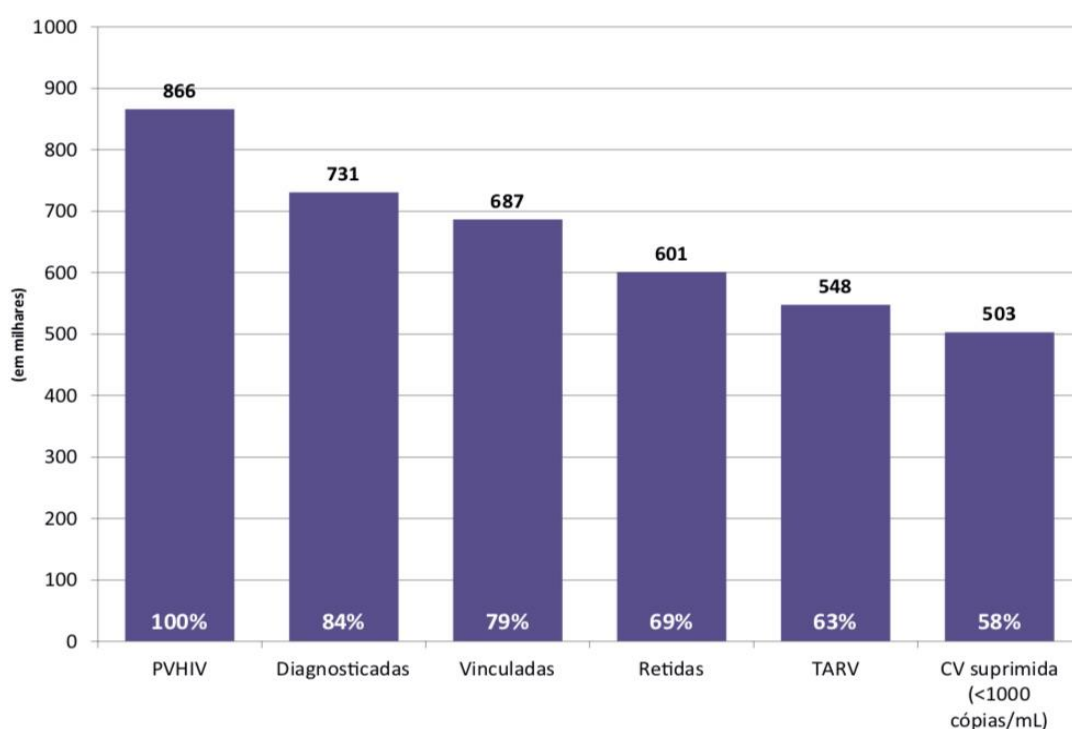


Figura 2: Cascata de cuidado contínuo do HIV. Ministério da Saúde do Brasil, 2017.

1.2 Classificação, características estruturais e genoma do HIV

O HIV é um retrovírus pertencente à ordem *Ortervirales*, à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Lentivirus* (11,25,26). Este vírus é capaz de infectar e replicar-se, principalmente, em linfócitos T e linfócitos B, monócitos, macrófagos e células dendríticas, porém, é a depleção de linfócitos T CD4 auxiliares a principal causa da aids. Sua partícula viral possui cerca de 110nm, apresenta formato esférico e envelope lipoproteico sendo resultante da membrana plasmática da célula hospedeira, obtida por ocasião do brotamento. No envelope estão contidas as glicoproteínas de superfície, gp120; e transmembranar, gp41; que estão envolvidas na etapa de entrada do vírus na célula alvo. Envolto pelo envelope encontra-se a matriz, formada pela proteína p17 e, internamente a esta o capsídeo viral, que apresenta formato icosaédrico e é formado pela proteína p24. No seu interior encontra-se o genoma do HIV associado a proteínas do nucleocapsídeo (p7) e três enzimas: transcriptase reversa (TR; p51), protease (PR; p11) e integrase (IN; p31) (27).

O genoma do HIV é composto por duas fitas simples de RNA similares, com polaridade positiva e medem cerca de 10kb cada. O genoma codifica 9 genes: *gag*, *pol* e *env* (genes estruturais); *tat* e *rev* (genes regulatórios); *vif*, *vpr*, *nef*, *vpu* ou *vpx* (genes acessórios). Além desses genes, na extremidade 3' e 5' do genoma proviral do HIV são encontrados os LTRs (repetições terminais longas, do inglês, *long terminal repeats*), onde estão localizadas as principais sequências promotoras para a transcrição dos genes virais (Figura 3). Os LTRs flanqueiam o genoma, mas não são transcritos, agindo como regiões regulatórias (28).

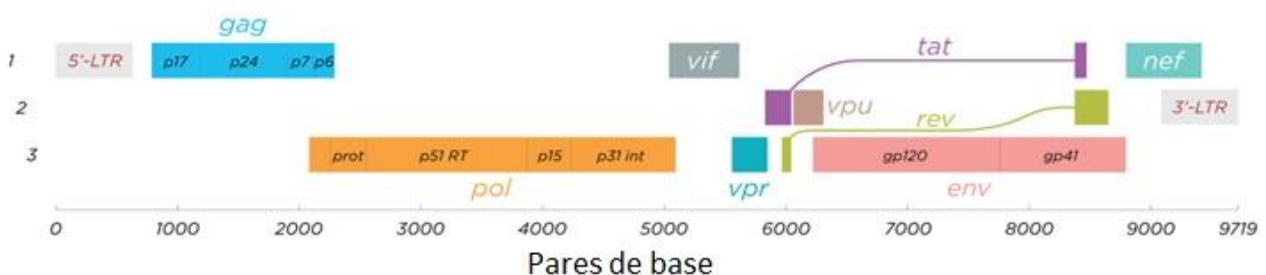


Figura 3: Representação esquemática do genoma proviral do HIV-1. Modificado de Los Alamos HIV Database (www.hiv.lanl.gov).

A região genômica *gag* (antígenos grupo específico, do inglês *group-specific antigens*) origina uma poliproteína precursora denominada p55, que é processada pela protease viral, durante ou após a liberação da progênie viral, em matriz (p17), capsídeo (p24), nucleocapsídeo (p7), proteína p6 e dois peptídeos espaçadores denominados SP1 e SP2. O gene *pol* codifica as enzimas virais PR, TR e IN, responsáveis respectivamente pela: clivagem das poliproteínas virais em produtos proteicos funcionais; sendo essencial à maturação viral; transcrição do RNA genômico em DNA complementar (cDNA) viral; e integração do cDNA viral no cromossomo celular do hospedeiro (29–32).

O gene *env* codifica uma poliproteína precursora, a gp160, que é processada por uma enzima celular, originando a glicoproteína de superfície (gp120) e a glicoproteína transmembranar (gp41). A gp120 é o principal contato entre o vírus e a célula hospedeira, sendo composta por cinco regiões constantes (C1 - C5), que geralmente são semelhantes entre os diferentes subtipos virais, e cinco regiões variáveis (V1 - V5) (Figura 4).

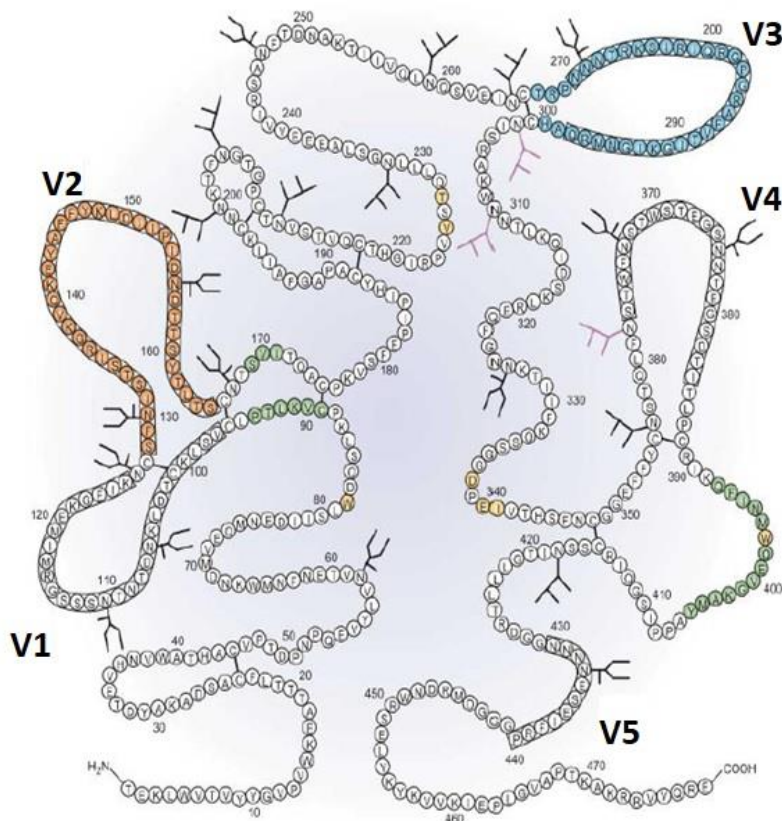


Figura 4: Representação da estrutura secundária da glicoproteína gp120 do envelope viral. As caixas de cor laranja indicam a posição das regiões variáveis (V1-V5) com relação a sequência de referência HXB2. Os sítios de glicosilação estão indicados por estruturas de ramos. Fonte: Zolla-Pazner e cols., 2004.

Dentre as regiões variáveis, os domínios V1 e V2 são interligados através de pontes dissulfeto, formando a alça V1/V2. As demais regiões variáveis, V3, V4 e V5, formam alças independentes (33). A região da terceira alça hipervariável (V3) é a mais conservada em comparação com as demais regiões variáveis da gp120.

A estrutura da V3 pode ser dividida em três regiões: base, haste e ponta. A base conservada está acomodada no núcleo da gp120 com uma ponte dissulfeto, enquanto a haste se estende para fora e é bastante flexível. A ponta consiste em aproximadamente 13 resíduos no centro da sequência da V3, formando uma conformação β no ápice distal (34–36) (Figura 5). O comprimento da região V3 sofre pouca variação e consiste geralmente em 35 aminoácidos, e exibe na ponta da alça um motivo aminoacídico específico conhecido como coroa da alça V3. No geral, a região V3 é conhecida por codificar os principais determinantes de especificidade do uso do correceptor (37,38), assim, variações genéticas podem estar relacionadas com o uso diferencial de correceptores pelo vírus (37,39). Recentemente foi descoberta a proteína Antisenso (ASP), localizada no gene *env*, entre as posições 7942 e 7373, relativas ao HXB2. Essa proteína está presente apenas no grupo M do HIV-1 e pode estar relacionada com o sucesso na dispersão pandêmica deste grupo (40). Além disso, mutações nesta proteína podem estar correlacionadas com tropismo viral (41).

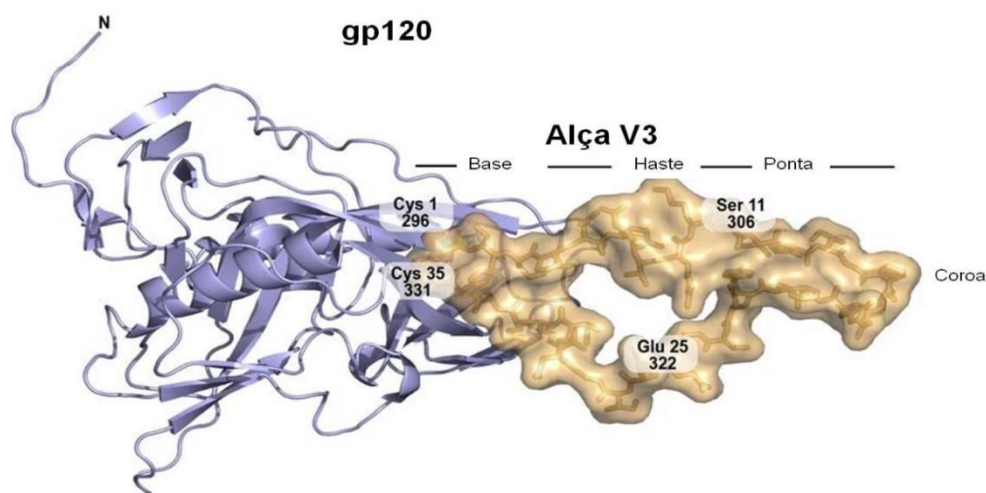


Figura 5: Estrutura terciária tridimensional da alça V3 da gp120.
Fonte: Adaptado de Sander e cols., 2007.

As demais proteínas codificadas pelo HIV são os produtos primários da tradução dos RNA mensageiros que sofreram *splicing*. Tat e Rev são proteínas reguladoras

essenciais para a expressão dos genes do HIV. As proteínas codificadas pelos genes acessórios (Vif, Vpr, Vpu, Vpx e Nef) são importantes para a replicação viral *in vivo*, uma vez que neutralizam o efeito de fatores de restrição do hospedeiro, intensificam a replicação viral e infectividade dos vírions, ou facilitam a evasão viral da resposta imune adaptativa. Vif é responsável pela inibição da função antiviral da proteína APOBEC3, um fator de restrição do hospedeiro que promove um acúmulo de mutações guanina-adenina no genoma viral (42). A proteína Vpr participa na regulação da importação nuclear do complexo de pré-integração do HIV (43). Vpu é encontrada exclusivamente no HIV-1 e SIVcpz, e é responsável pela degradação da molécula de CD4 e promove a liberação da progênese viral das células infectadas pelo HIV-1 através da antagonização do fator de restrição humano Teterina (44). A proteína Vpx é codificada pela linhagem do HIV-2 e é responsável pela inibição de SAMHD1, um fator de restrição responsável pela redução do estoque celular de desoxirribonucleotídeos no citoplasma (44). Nef é responsável na manipulação da maquinaria celular, atua na diminuição da expressão de CD4 na superfície da célula hospedeira, modula vias de sinalização de células T e estabelece o estado de infecção persistente (45).

1.3 O ciclo replicativo do HIV

O ciclo de replicação do HIV se inicia com a etapa de adsorção, através do reconhecimento das moléculas de CD4, presentes na superfície de células susceptíveis ao HIV, pela glicoproteína gp120, juntamente com a subsequente interação com um correceptor de quimiocinas CCR5 ou CXCR4 (46), os mais importantes. Em seguida, o envelope viral se funde com a membrana plasmática da célula com mediação da gp41, que muda sua conformação expondo suas regiões que compõem o peptídeo de fusão (47), ocasionando a fusão das membranas celular e viral (32,46,48,49). As partículas virais parcialmente desencapsuladas são transportadas em direção ao núcleo, e neste momento, o genoma e as proteínas virais são liberados no citoplasma iniciando o processo de transcrição reversa do RNA genômico em DNA, e degradação do RNA. Ao término da etapa de transcrição, são inseridas as sequências LTR nas extremidades do DNA proviral. O LTR na região 5' do provírus atua como um promotor da transcrição do genoma viral, enquanto o LTR da região 3' auxilia a poliadenilação do RNA viral transcrito. Consecutivamente, o cDNA recém-formado se desliga da TR, e se associa a um complexo

composto por proteínas virais e celulares, o complexo pré-integração (CPI). A integrase é uma das enzimas virais que compõe o CPI, e parece mediar a importação desse complexo ao núcleo, auxiliando a integração do cDNA ao DNA cromossômico da célula infectada (43,50). O DNA viral integrado pode ter sua expressão ativada juntamente com a célula hospedeira, podendo servir de molde para sínteses de novos RNAs mensageiros de suas proteínas virais. Os RNAs mensageiros transcritos inalterados ou parcialmente processados são exportados do núcleo para o citoplasma e então ocorrerá a tradução (51).

A poliproteína gp160 é traduzida no retículo endoplasmático, em seguida glicosilada e clivada pelas proteases no complexo de golgi, formando as proteínas do envelope, gp120 e gp41, as quais serão enviadas para a membrana plasmática da célula hospedeira (32). Já as poliproteínas Gag e Gag-Pol são sintetizadas por ribossomos do citosol, e ao se associar com dímeros de RNA genômico, concentram-se na membrana plasmática, resultando na formação das partículas esféricas imaturas contendo as glicoproteínas do envelope. A protease promove o processamento proteolítico de Gag e Pol durante ou logo após a liberação da partícula e então vírions maduros do HIV são gerados (52).

Após a formação da partícula viral madura, o HIV pode infectar novas células susceptíveis na forma de partículas livres ou através de sinapses virológicas pelo contato célula-a-célula. Esta última forma tem sido evidenciada como a mais eficiente por facilitar os mecanismos de evasão da resposta imune e da ação dos antirretrovirais (53,54).

1.4 Origem e diversidade genética do HIV

A hipótese mais aceita para a origem do HIV baseia-se nas múltiplas transmissões zoonóticas a partir do vírus da imunodeficiência símia (SIV), entre primatas não-humanos e humanos na região Oeste e Central da África (55). Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 são oriundos de eventos distintos de introdução na população humana. As duas linhagens não apresentam relação genética entre si, porém estão relacionadas com diferentes linhagens de SIV que circulam na África Centro-Occidental (56–58). O HIV-1 apresenta relação filogenética com o SIVcpz (infecta chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*), que originou os grupos M (major) e N (non-M, non-O), e do SIVgor (infecta gorilas - *Gorilla gorilla*) que originou os grupos O (Outlier) e P (57,59–61). O HIV-2 originou-se a partir do SIVsmm (infecta *Sooty mangabey* - *Cercocebus atys*) (58,62). Desde o isolamento inicial, nove

linhagens (A-I) distintas do HIV-2 foram identificadas, cada uma aparentando se tratar de uma transferência zoonótica independente do SIVsmm para o homem (58). Dentre os oito grupos que o compõem, apenas os grupos A e B se disseminaram na população humana de forma considerável.

O HIV-1 possui uma alta taxa de replicação viral, com o surgimento de aproximadamente 10^{10} novos vírions por dia num mesmo hospedeiro (63), além da alta susceptibilidade a eventos de recombinação homóloga. Outra característica marcante é o elevado grau de variabilidade genética consequente dos erros que ocorrem durante a replicação viral, principalmente durante a retrotranscrição pela TR, uma vez que esta enzima não apresenta mecanismos de correção no momento da transcrição do RNA em DNA (50). A baixa fidelidade do processo replicativo em conjunto aos erros de pareamento durante a replicação viral geram inserções, deleções e substituições na ordem de 10^{-5} por nucleotídeo, por ciclo replicativo (50,64). Essa alta frequência de erros permite que cada novo vírus tenha praticamente um genoma único e diferente de seu parental. O rápido acúmulo de mutações permite que as sequências genômicas do HIV-1 variem consideravelmente, não apenas entre os indivíduos, como também dentro do indivíduo infectado. Este conjunto de variantes virais distintas, porém relacionadas entre si, são denominadas quasispécies (65). A análise filogenética destas é geralmente representada como uma "nuvem", cujo o centro é a sequência "mestre" de um vírus fundador (Figura 6) (66). Para que uma variante viral seja considerada quasispécie, a mesma deve conter os seguintes critérios: se divergir da sequência do vírus fundador através de mutações, gerando um repertório diverso ao longo de algumas gerações e ser selecionada pela pressão seletiva do hospedeiro (67).

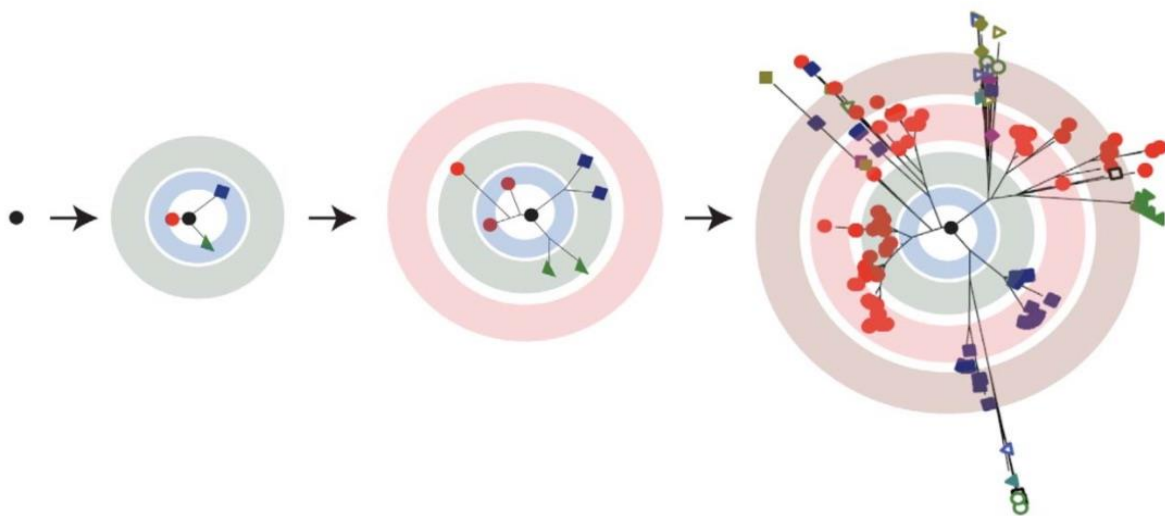


Figura 6: Representação esquemática da geração de quasispécies. As variantes individuais que compõe as quasispécies são geneticamente interligadas à sequência do vírus fundador (marcado em preto). Fonte: Lauring e cols., 2010.

As quasispécies virais, o grande número de indivíduos infectados e a persistência da infecção formam um conjunto de fatores ideais que favorecem a geração e expansão da diversidade do HIV-1. Algumas grandes questões relacionadas à evolução das quasispécies do HIV-1 ainda permanecem parcialmente incompreendidas, como: o aumento do número de mutações de resistência e combinações que conferem diferentes graus de resistência aos antirretrovirais; a interação do vírus com os diferentes tipos de resposta adaptativa, impactando no desenho vacinal; e a dinâmica da troca de correceptores em relação a patogênese viral e a progressão da doença.

O grupo M do HIV-1 foi o primeiro a ser descoberto e representa a forma pandêmica do vírus. Devido ao seu alto grau de diversidade genética e pelo grande número de indivíduos infectados, os vírus deste grupo se diversificaram levando a uma complexa classificação do HIV-1, com base em genomas completos, em subtipos, subsubtipos e genomas recombinantes. A variação genética entre sequências genômicas de um mesmo subtipo intra-hospedeiro em torno de 8%, enquanto que a variação intersubtipo é geralmente cerca de 15%, dependendo de quais subtipos e regiões genômicas são analisadas (68). Este elevado grau de diversidade é um dos principais limitantes para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HIV. Além da resposta vacinal, a

diversidade viral pode afetar a resposta do hospedeiro ao tratamento, o desenvolvimento de resistência, além de influenciar na progressão para a aids, tornando os estudos de diversidade viral fundamentais.

1.4.1 Epidemiologia molecular do HIV-1

Atualmente, o grupo M do HIV-1 é classificado filogeneticamente em nove subtipos (A-D, F-H, J e K), subsubtipos (A1-A4 e A6; F1-F2), além de diversas formas recombinantes circulantes (CRFs, até 27 de janeiro de 2019, 98 CRFs do HIV-1 foram descritas); e formas recombinantes únicas (URFs) (69–71). A disseminação deste grupo na segunda metade do século 20 acarretou em uma distribuição heterogênea dos subtipos e formas recombinantes.

Estudos de epidemiologia molecular indicam que atualmente o subtipo C é a linhagem predominante, responsável por 46,6% das infecções pelo HIV-1 no mundo, seguido pelo subtipo B (12,1%), subtipo A (10,3%), CRF02_AG (7,7%), CRF01_AE (5,3%) e subtipo G (4,6%) (72). Além disso, as formas recombinantes representam 16,7% das infecções, enquanto que os subtipos F, H, J, K e L têm uma disseminação limitada. O subtipo B, apesar de representar 12,1% das infecções, é o mais disperso geograficamente, sendo prevalente em países da Europa, nas Américas, e na Austrália (72), e, portanto, o mais estudado por compor majoritariamente a epidemia de países desenvolvidos. Na América Latina, o subtipo B, e formas recombinantes BF são mais preponderantes, porém, tem-se observado um aumento dos subtipos C e recombinantes BC, especialmente no Brasil, Argentina e Uruguai (73–75). Porém, atualmente, um número crescente da descrição de CRFs vem sendo observado, o que pode mudar este panorama. Em grande parte do Brasil, a epidemia é composta majoritariamente pelos subtipos B (70-90%), subsubtipo F1 (5-24%) e subtipo C (1-10%), além dos recombinantes BF1 e BC (76–85). Dentre as amostras de subtipo B circulantes no Brasil foi descrita a presença de uma variante, denominada BBr, que se caracteriza por apresentar um motivo GWGR no topo da alça V3 da gp120, em vez do motivo GPGR (86,87). Esta variante é detectada em cerca de 17 a 50% das amostras B brasileiras (84,87–93), no entanto possui baixa prevalência fora do país. Apesar de menos frequente, já foram detectados os subtipos D, A e o CRF02_AG (84,94–98).

1.5 O evento de transmissão do HIV

A transmissão do HIV ocorre essencialmente através do contato de um indivíduo não-infectado com o sangue, sêmen, secreção vaginal e leite materno de um indivíduo infectado pelo HIV. Estudos sugerem que até 50% das novas infecções pelo HIV são adquiridas de indivíduos recém-infectados (99–101) devido ao alto nível de viremia durante a fase inicial da infecção e às propriedades específicas do vírus nesta fase. E ainda devido ao fato de que poucos indivíduos são diagnosticados, visto que apenas sintomas inespecíficos e comuns a outras infecções virais ocorrem nesta fase (102,103).

O evento de transmissão é um processo considerado relativamente ineficiente devido as diversas barreiras imunológicas e físicas tanto no indivíduos transmissor, quanto no indivíduo sob risco de infecção. A eficiência da transmissão sexual pode ser modulada por fatores tais como: a presença de infecções sexualmente transmissíveis, particularmente aquelas que resultam em inflamação genital e úlceras, que podem elevar a quantidade de vírus no trato genital e aumentar a suscetibilidade à infecção de duas a onze vezes (104); gravidez, condição em que foi observado um aumento maior que o dobro do risco de aquisição do HIV (105). Em contrapartida, a circuncisão, leva a uma diminuição de 60% do risco de aquisição do vírus no parceiro masculino, conforme demonstrado em diversos ensaios clínicos (106–109). A transmissão sexual, nas relações sem o uso de preservativo, é a via mais comum, sendo responsável por mais de 75% das infecções no mundo (110). Entretanto, a probabilidade de infecção desta é relativamente baixa, variando de 0,1 a 1% em uma relação heterossexual vaginal e até 10% em HSH (111).

A infecção sistêmica após a transmissão heterossexual é estabelecida principalmente a partir da propagação de uma única variante de HIV, o vírus fundador. No entanto, transmissões de múltiplas variantes são descritas em outros modos de transmissão, como em HSH e em usuários de drogas injetáveis, mas sua frequência varia de acordo com o risco de exposição (112–118).

Na transmissão heterossexual, ocorre um potente gargalo genético, do inglês *genetic bottleneck*. Neste, durante a infecção da mucosa é verificada uma população de vírus geneticamente homogênea com maior *fitness* viral, presente nos indivíduos infectados logo após o contágio, quando comparada à população altamente diversa nos transmissores (119). Alguns pontos em relação ao gargalo genético ainda não estão

totalmente elucidados, tais como: se esse gargalo genético atua imediatamente no momento da transmissão ou nos primeiros estágios da infecção; se características virais específicas são seletivamente vantajosas e determinam quais variantes sobrevivem ao gargalo; ou se as variantes transmitidas com sucesso são determinadas por efeitos estocásticos. Provavelmente, este gargalo genético é mediado por múltiplos fatores, os quais limitam que partículas do vírus possam atingir o trato genital, penetrar na barreira mucosa, infectar as células-alvo de forma produtiva e trafegar da mucosa para disseminação sistêmica (111,120). Uma potencial fonte é o ambiente único dos tratos genéticos masculino e feminino, que podem apresentar populações de células-alvo diferentes daquelas que a maioria dos vírus enfrenta na infecção sistêmica (111,120). Têm sido discutido que o uso de géis microbicidas pode selecionar vírus com maior capacidade de transmissão, enquanto que uma inflamação genital exerce um efeito oposto, visto que facilita a transmissão (121).

Estudos comparativos sobre a variabilidade genética da população viral entre doadores e receptores revelaram que variantes específicas são preferencialmente transmitidas. Análises sobre o vírus fundador identificaram assinaturas genéticas, imunológicas e fenotípicas que estão associadas ao aumento do sucesso da transmissão (112,115,121–123). Os vírus fundadores geralmente apresentam carga total negativa da região V3; têm as alças variáveis mais curtas e menos sítios de glicosilação, facilitando a transmissão, mas aumentando o reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (124,125). Estes vírus utilizam predominantemente o coreceptor CCR5 para a entrada na célula, sugerindo uma transmissibilidade reduzida dos vírus CXCR4-trópicos, embora alguns estudos tenham relatado em torno de 20% de infecção por essa população (126–128).

1.6 A história natural da infecção pelo HIV

Assim que a transmissão ocorre, o HIV infecta principalmente células T CD4+, provenientes tanto do sangue periférico quanto de linfonodos iniciando a fase aguda da infecção. A infecção de células T CD4+ ocorre juntamente com uma alta viremia ($>10^7$ cópias de RNA/mL de plasma), levando aos sintomas clínicos conhecidos como síndrome retroviral aguda. Estes sintomas podem mimetizar uma síndrome semelhante à mononucleose e geralmente incluem febre e linfadenopatia, entre outros como cefaleia,

sintomas gastrointestinais e úlceras podem também estar presentes. O período inicial entre o momento em que a primeira célula é infectada e o momento em que o vírus é detectável pela primeira vez no sangue é denominado fase de eclipse e dura aproximadamente de 7 a 21 dias (129–132). Durante este período da infecção, ocorre uma depleção maciça de células T CD4+ (133), que é mais evidente no tecido linfoide associado ao intestino (GALT), que nunca se recupera imunologicamente em sua totalidade, mesmo após a reconstituição do subconjunto de células T CD4+ periféricas. Em resposta à infecção ocorre um aumento significativo de células T CD8+ específicas para o HIV, seguidas pela resposta imune humoral (134–136). Apesar das diversas formas de transmissão do HIV, geralmente há uma aparência ordenada de marcadores virais no plasma do indivíduo infectado. Essa sequência de marcadores laboratoriais foi sistematicamente avaliada por Fiebig e colaboradores (137), que criaram um sistema de classificação da infecção de acordo com a evolução da mesma. Os estágios I-IV refletem o surgimento, no plasma, do RNA viral do HIV-1 (Fiebig I); do antígeno viral p24 (Fiebig II); dos anticorpos específicos do vírus detectáveis por ensaio imunoenzimático (Fiebig III) e por Western Blot indeterminante (Fiebig IV); do padrão de bandas por Western Blot positivo mas negativo para p31 (Fiebig V) e p31 positivo (Fiebig VI) (Figura 7).

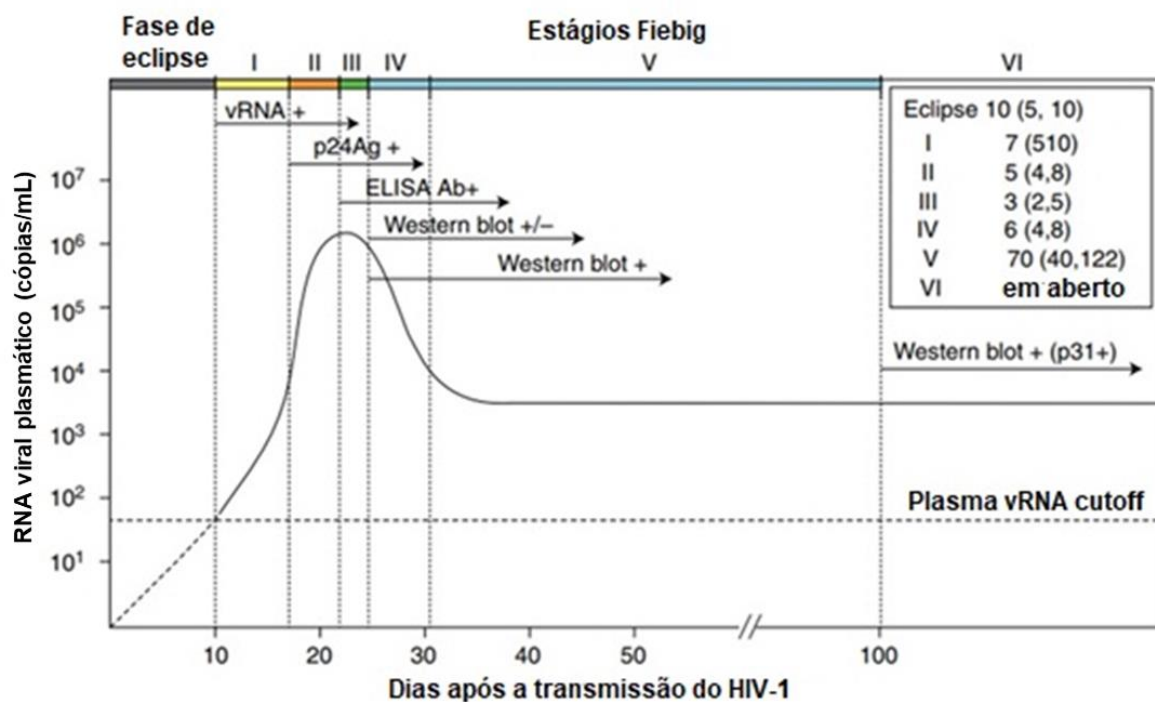


Figura 7: Gráfico representativo da história natural da infecção aguda e precoce pelo HIV-1 com representação do diagnóstico de acordo com os estágios de Fiebig (Fiebig e cols. 2003). Durações médias da fase de eclipse e estágios de Fiebig e seus intervalos de confiança de 95% (apresentados em parênteses). Fonte: Adaptado de Shaw e Hunter, 2012.

Após esta fase inicial, a viremia começa a declinar, e, eventualmente, atinge um *set point* viral após 8 a 24 semanas, marcando o início da fase crônica da infecção. Consequentemente, há a recuperação do número de linfócitos T CD4+ que se mantém estável ou sofre um declínio gradual (111,138). Nesta fase, a maioria dos indivíduos se mantém assintomática, porém, os níveis de viremia embora baixos, não são totalmente controlados. Esse período de latência clínica é extremamente variável e distintos perfis de progressão podem ser observados entre os indivíduos infectados pelo HIV não tratados. A maioria, denominados progressores típicos, progride para a aids entre seis e dez anos. De 10-15% dos indivíduos infectados evolui para a aids entre três a cinco anos após a infecção, denominados progressores rápidos. Por outro lado, uma pequena fração (até 5%) dos indivíduos infectados, denominados não-progressores de longo termo (LTNP, *long term non progressors*), permanece, mesmo na ausência de tratamento, clinicamente assintomática e com altos valores de células T CD4+ por mais de dez anos de infecção

(139–142). Uma pequena parte dos indivíduos LTNPs (<1%) apresenta persistência de carga viral plasmática indetectável por 10 anos ou mais, e são denominados Controladores de Elite (143). Durante o período de latência, a contagem periférica de linfócitos T CD4+ diminui lentamente, em grande parte como resultado da morte de células T induzida por ativação e exaustão imune causada pela inflamação crônica secundária à infecção viral em curso. Assim, o progressivo declínio de linfócitos T CD4+ bem como o aumento da replicação viral culminam na fase de aids, na qual o organismo fica vulnerável ao desenvolvimento de infecções oportunistas, podendo levar o indivíduo a morte, na ausência de tratamento (Figura 8).

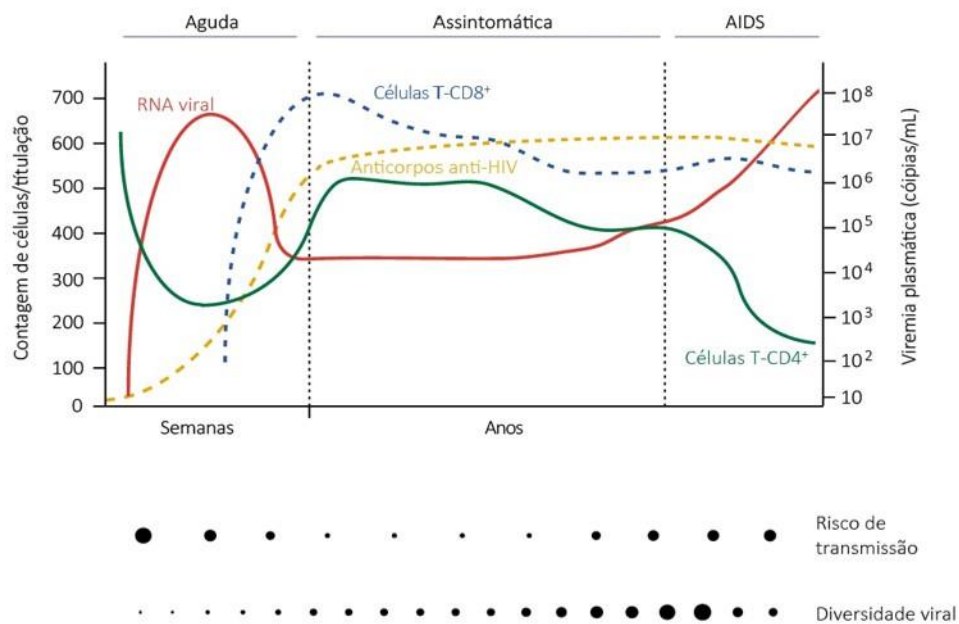


Figura 8: História natural da infecção pelo HIV. As mudanças na viremia plasmática (vermelho), na contagem de linfócitos T CD4+ (verde) e CD8+ (azul) e na titulação de anticorpos anti-HIV(amarelo) durante a progressão para a aids estão indicadas no gráfico em função do tempo. A variação no risco de transmissão e na diversidade viral ao longo da infecção estão representados na forma de círculos pretos, cujo diâmetro é diretamente proporcional aos valores observados. Adaptado de Simon e cols., 2006.

1.7 Estratégia terapêutica e resistência do HIV aos antirretrovirais

Em 1985 surgiram os primeiros ensaios clínicos para avaliar opções terapêuticas para a infecção pelo HIV. O primeiro fármaco com propriedade antirretroviral a ser testado foi o AZT (zidovudina), um análogo de nucleosídeo inibidor da enzima transcriptase reversa (ITRN), aprovado para uso pelo *Food and drug administration* (FDA) em 1987 (144). Em 1996 teve início a era da terapia antirretroviral de alta potência, atualmente denominada terapia antirretroviral combinada (cART, do inglês *combined antiretroviral therapy*) com a administração conjunta de ITRN, além dos inibidores de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN; transcrição reversa do RNA viral em DNA) e de protease (IP; maturação da partícula viral), permitindo assim uma supressão viral mais duradoura. A partir de 2003 novos medicamentos, e novas classes de antiretrovirais foram desenvolvidos com intuito de oferecer não só alternativas para tratamento dos pacientes multi-experimentados, como apresentar menor toxicidade, comodidade posológica e maior barreira genética, como os inibidores de fusão (IF; fusão das membranas viral e celular), inibidores de integrase (INI; integração do cDNA ao genoma do hospedeiro), inibidores de entrada (antagonista de CCR5; adsorção e entrada) (145,146). Além destes, um novo medicamento da classe dos ITRN está em fase de desenvolvimento clínico (147).

O objetivo da cART é suprimir a replicação do HIV através da inibição das enzimas e/ou etapas do ciclo viral, prevenindo a infecção de novas células e permitindo a reconstituição do sistema imunológico, evitando o aparecimento de doenças oportunistas e melhorando a qualidade de vida do indivíduo infectado. O Ministério da Saúde (MS) do Brasil atualmente recomenda que o esquema terapêutico inicial preferencial seja composto por dois ITRN (lamivudina e tenofovir) associados ao INI (dolutegravir) (148). Com os esquemas antirretrovirais mais modernos, cerca de 80% dos pacientes sob uso da terapia antirretroviral apresentam carga viral inferior a 50 cópias/mL em até um ano após início de tratamento, e a grande maioria mantém a supressão viral nos anos seguintes. Porém, alguns indivíduos apresentam falha ao tratamento inicial, principalmente devido a falha virológica, seja pela baixa adesão à terapia, a esquemas inadequados, a fatores farmacológicos ou a transmissão de vírus resistentes (149).

A habilidade do HIV em acumular mutações, e, portanto, ser altamente variável, o torna capaz de evadir do sistema imune do hospedeiro. Entretanto, frente à pressões seletivas das drogas antirretrovirais, o HIV pode tornar-se resistente. De maneira geral, as

mutações não são vantajosas para o vírus, uma vez que podem causar códons de parada em regiões iniciais de sequências codificadoras de proteínas ou alterações nas próprias proteínas que são essenciais para que a replicação do vírus ocorra. Porém, estas linhagens são rapidamente eliminadas, à medida que novos vírus com melhor *fitness* viral surgem. A emergência de uma variante melhor adaptada às novas condições pode acarretar na mudança da população selvagem original. Desta maneira, durante o tratamento antirretroviral, a replicação residual do HIV pode ocorrer, e com isso, o surgimento de variantes virais carreando mutações de resistência é um fenômeno constante (150,151). Mutações que reduzem a susceptibilidade viral já foram descritas para quase todas as drogas antirretrovirais já desenvolvidas e utilizadas na prática clínica. Tornando importante o monitoramento da falha virológica, definida como não-obtenção ou não-manutenção do estado de supressão viral após seis meses do início ou da modificação do tratamento antirretroviral.

Desta maneira, a utilização de drogas de outras classes, como IP ou INI são importantes componentes do esquema de resgate para indivíduos que apresentam falha terapêutica aos esquemas anteriores. Caso estas combinações não alcancem a supressão viral, o indivíduo pode ser classificado como multirresistente. A multirresistência é definida como a presença de resistência fenotípica ou genotípica às três classes de antirretrovirais em uso (INI, IPs, ITRNs e ITRNNs), uma condição que diminui consideravelmente as opções terapêuticas disponíveis, o que está associado a um maior risco da progressão clínica e aumento na mortalidade. Nestes casos, o inibidor de entrada antagonista de CCR5, Maraviroque (MVQ), é recomendado para compor a terapia de resgate, desde que o indivíduo possua o teste de genotropismo recente (6 meses) para verificação de elegibilidade ao uso deste medicamento, ou seja, que seu vírus seja R5 trópico.

Vale ressaltar que o tratamento de indivíduos portadores do HIV no Brasil continua sendo considerado uma referência mundial, devido ao acesso universal aos medicamentos antirretrovirais desde 1996. Além disso, em 2013, o Brasil foi o primeiro país em desenvolvimento a adotar a recomendação de início da terapia logo após o diagnóstico, independente da contagem de células T CD4+, objetivando uma melhor restauração do sistema imunológico e conseqüentemente da saúde do paciente, bem como uma medida de controle da transmissão do HIV (148).

Apesar dos esforços para o controle da epidemia no Brasil, o número de casos novos de aids continuou aumentando nos últimos anos (15). O diagnóstico tardio é uma

grande preocupação devido ao potencial de transmissão por um maior tempo. De acordo com os dados epidemiológicos da América Latina do ano de 2014, o início precoce e a melhora na adesão ao tratamento seriam boas estratégias para o alcance das metas 90-90-90 estabelecidas pela UNAIDS. Neste contexto, a oferta de testagem visando o diagnóstico recente do HIV, seguido da vinculação ao serviço da saúde tornou-se fundamental para que a cART possa ser oferecida e iniciada precocemente, com intuito de reduzir/eliminar os reservatórios celulares e eliminar o estabelecimento de santuários de HIV, que é um dos fatores que possibilita o reestabelecimento da viremia após a falha ou interrupção do tratamento.

1.8 Reservatórios do HIV

Os reservatórios celulares persistentes de HIV-1 são estabelecidos precocemente durante a fase aguda da infecção. As células T CD4+ de memória central e transitória são consideradas o principal reservatório do HIV abrigando vírus integrados ao genoma, o provírus (152). O DNA viral pode ser encontrado em diversos subconjuntos dessas células que são identificadas de acordo com marcadores de superfícies celular. O primeiro estágio de diferenciação das células de memória é a célula T CD4+ *naive* (TNA). Quando o receptor de células TNA é estimulado por células apresentadoras de antígeno, ele se diferencia em uma linhagem de células efetoras de vida curta, que incluem células T auxiliares e T reguladoras. Um pequeno subconjunto dessas células efetoras se diferenciam em células T de memória de vida longa, que são consideradas as células primárias que abrigam o HIV-1 de forma latente. Essas células são divididas em células tronco de memória (TSCM), memória central (TCM), memória transicional (TTM), memória efetora (TEM), memória migratória (TMM), memória residente tecidual (TRM) e células de diferenciação terminal (TTD) (153–155).

As células capazes de reverter para o estado de memória apresentam grande longevidade em relação as outras ativadas após o reconhecimento do antígeno, e podem permanecer latentes durante anos até que reencontrem seu antígeno específico levando a ativação, e a um novo ciclo de proliferação clonal. Juntamente com a permissividade dessas células à infecção pelo HIV, que pode ocorrer durante o estágio *naive* ou em estágios diferenciados, estas são consideradas reservatórios ideais para o vírus, uma vez

que integrado, o provírus entra em estado de latência junto com a célula, e volta a ser transcricionalmente ativo apenas durante a próxima ativação do linfócito (153,156,157).

Além dos subconjuntos de células T de memória, algumas células T efetoras hospedam o HIV-1 competente para replicação em indivíduos sob cART a longo prazo. As células T auxiliares, que são uma parte importante do sistema imune adaptativo, também podem ser infectadas pelo HIV-1. Além disso, o DNA do HIV-1 foi detectado em células CD4 + T *helper* em indivíduos infectados pelo HIV sob terapia a longo prazo (158). A maioria destas células morre dentro de 1-2 semanas, no entanto, um subconjunto destas persiste por muitos anos. Os monócitos e macrófagos também demonstraram conter DNA de HIV-1 em indivíduos infectados com HIV-1 em terapia (159–161). Macrófagos são amplamente resistentes aos efeitos citopáticos do HIV-1 e demonstraram longos períodos de vida *in vitro*. Portanto, se os macrófagos são permissivos à infecção produtiva após a interrupção do tratamento, eles podem ser um importante reservatório do HIV-1. Um estudo em primatas não humanos, no entanto, sugere uma meia-vida consideravelmente mais curta para esse tipo de célula *in vivo* (162). As células T auxiliares de memória folicular são também células alvo e contêm níveis significativos de provírus em indivíduos infectados pelo HIV-1 que não estão em tratamento (163). Devido à sua proximidade com as células dendríticas foliculares das células B do linfonodo, essas células podem servir como um potencial alvo para uma nova infecção durante a cART. Embora as células dendríticas foliculares não contenham provírus latentes do HIV-1, elas podem servir como uma fonte importante de vírions infecciosos durante e após a terapia, tornando-as um contribuinte crítico para a persistência do HIV-1.

Estudos sobre reservatórios do HIV-1 concentraram-se em grande parte no sangue periférico, uma vez que este contém a maioria dos subconjuntos de células T de memória discutidos acima e também por ser a fonte mais acessível de células contendo o HIV-1 latente, sendo este o reservatório mais bem estudado e melhor compreendido. As sequências de HIV-1 associadas a células do sangue periférico se misturam com sequências isoladas do GALT e dos linfonodos, indicando que as células contendo provírus trafegam entre esses tecidos (164). O GALT também contém células T de memória com HIV-1 persistente em indivíduos infectados em terapia eficaz a longo prazo, e contém níveis 2-4 vezes mais elevados de DNA do HIV-1 do que as populações de células do sangue periférico (164). Estudos estão em andamento para determinar até que ponto o GALT contribui após a interrupção do tratamento.

De maneira geral, os dados demonstram o grande obstáculo que os reservatórios representam para a remissão da infecção pelo HIV. O longo tempo necessário para morte das células latentes dificultam a extinção passiva dos reservatórios celulares. Ao mesmo tempo, as células com replicação ativa podem estar localizadas em locais cuja penetração dos antirretrovirais é subótima, como já foi demonstrado para o linfonodo, cérebro e trechos do intestino de alguns pacientes (165–168) . Os esforços para obtenção da cura, seja esterilizante (sem detecção do vírus) ou funcional (baixa detecção de carga viral mesmo após a interrupção da cART), se concentram na ideia de tentar eliminar esses reservatórios virais latentes. Até o momento, o único caso documentado de um paciente infectado pelo HIV-1 que obteve a cura foi o conhecido “Paciente de Berlim”, demonstrando a única evidência de que a cura da aids é possível (169). Este indivíduo foi diagnosticado também com leucemia mielóide aguda, e então recebeu um transplante com células tronco hematopoiéticas CCR5 Δ 32/ Δ 32, ou seja, que não codificavam o CCR5, um dos principais correceptores de entrada do HIV (169). Assim, após o transplante, a replicação viral neste paciente permaneceu indetectável mesmo depois da descontinuação da terapia antirretroviral, há quase dez anos. A reconstituição de células T CD4 originadas do doador e a ausência de material genético do vírus em qualquer compartimento indicam que o indivíduo foi aparentemente curado, constituindo o único caso descrito até o momento de cura esterilizante da infecção pelo HIV (não-deteção do vírus) (170). Seguindo este propósito, os “pacientes de Boston” também passaram por tentativas para se obter a cura através do transplante de células tronco hematopoiéticas, em conjunto com a cART em paciente infectados pelo HIV-1. Uma redução considerável dos níveis de DNA proviral foi observada, entretanto, alguns meses após a interrupção da terapia, a carga viral plasmática foi retomada (171). Neste contexto, a terapia antirretroviral para a redução dos reservatórios do HIV é de extrema importância, porém, o tamanho e tipo dos reservatórios virais parecem ser cruciais para o controle bem sucedido da replicação viral na ausência de terapia.

Diante disto, o principal objetivo é tentar mimetizar o perfil de controle espontâneo da infecção em pacientes LTNPs ou controladores de elite, considerados modelos naturais para a cura funcional. Uma das maneiras encontradas atualmente para tentar alcançar esse controle da viremia e redução do tamanho dos reservatórios virais em indivíduos não-controladores é iniciar a cART durante a fase aguda da infecção (Figura 9).

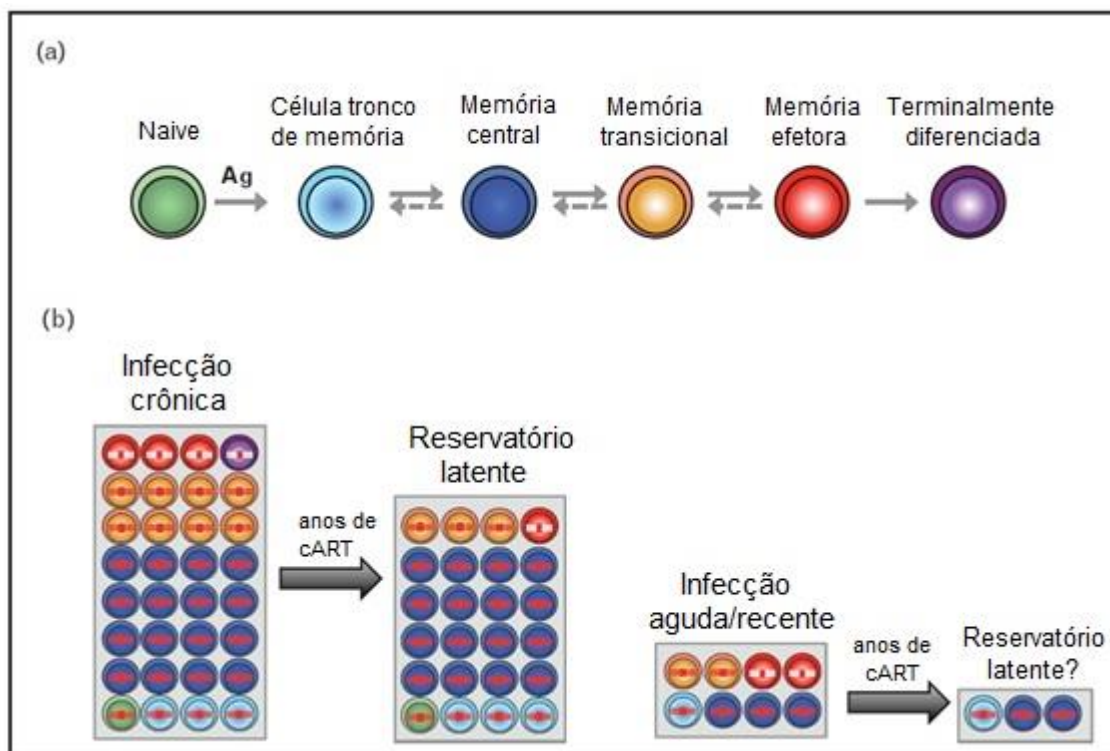


Figura 9: Representação esquemática do tamanho e a composição do reservatório latente do HIV sob influência pela terapia antirretroviral nas infecções crônicas e aguda/recente. (a) Diferenciação das linfócitos T CD4. (b) Indivíduos com infecção crônica apresentam o reservatório maior, com mais células de vida longa, e aqueles com infecção aguda apresentam um reservatório menor. Adaptado de Ananworanich e cols., 2015.

Um estudo realizado em 2015 por Laanani e colaboradores demonstraram que, quanto mais precoce for o início da terapia após a infecção pelo HIV, mais acelerada é a redução do reservatório proviral em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*) nos primeiros oito meses após o início da cART (172). Alguns estudos já demonstraram que em alguns pacientes que recebem tratamento precocemente durante a fase aguda, mesmo após a interrupção da terapia, há a manutenção do controle viral, sugerindo que o reservatório não seja completamente reestabelecido após a suspensão da terapia. A coorte CASCADE, composta por 11 indivíduos, demonstrou que a cART iniciada em até três meses após a soroconversão e com duração em torno de 1 ano e 3 meses foi capaz de inibir o reestabelecimento

viroológico por dois anos após a interrupção do tratamento (173). No estudo VISCONTI, uma coorte de 14 indivíduos tratados em até dez semanas após infecção primária foi capaz de manter o controle da replicação viral por anos após a suspensão do tratamento, além de manter níveis altos de linfócitos TCD4+ e redução do reservatório viral (174). Estes trabalhos comprovam que é possível alcançar um controle imunoviroológico sustentado após a interrupção da terapia iniciada na fase inicial da infecção. Entretanto, foram estudos retrospectivos, e, os efeitos do início precoce do tratamento na evolução da diversidade viral, tamanho e distribuição celular do reservatório viral foram pouco explorados e ainda necessitam ser melhor caracterizados.

1.9 O tropismo do HIV-1

O tropismo viral pode ser definido como a habilidade de isolados virais em entrar e infectar diferentes tipos celulares através da sua ligação aos receptores presentes na superfície da célula alvo (175). A primeira denominação para o tropismo do HIV-1 foi empregada para designar vírus que apresentavam a capacidade de indução de sincícios em linhagens de células T (vírus T-trópicos), enquanto vírus que não formavam sincícios, e tinham capacidade de infectar células monocíticas, mas não a maioria das linhagens de células T, foram denominados vírus M-trópicos (176). Em 1996, uma proteína de sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, chamada de fusina, e atualmente conhecida como o receptor de quimiocina CXCR4, foi descrita como correceptor do HIV-1 em linhagens de células T (177). A descoberta de que as β -quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β atuavam como agentes supressores da infecção pelo HIV-1 levou a identificação do receptor de quimiocina CCR5 como correceptor para os vírus M-trópicos (178). Deste modo, uma nova classificação para o HIV-1 foi proposta com base no uso do correceptor de entrada, definindo como vírus R5 os isolados capazes de utilizar o CCR5, vírus X4 os que utilizam apenas o CXCR4, e aqueles com capacidade de utilizar simultaneamente os dois correceptores são denominados vírus R5/X4 ou duo-trópicos (49,179) (Figura 10). Os vírus R5 são menos patogênicos e infectam predominantemente células T CD4+ ativadas e macrófagos; já os vírus X4 têm como alvo células T CD4+ em repouso, e apresentam alto poder replicativo e alta patogenicidade (39,91).

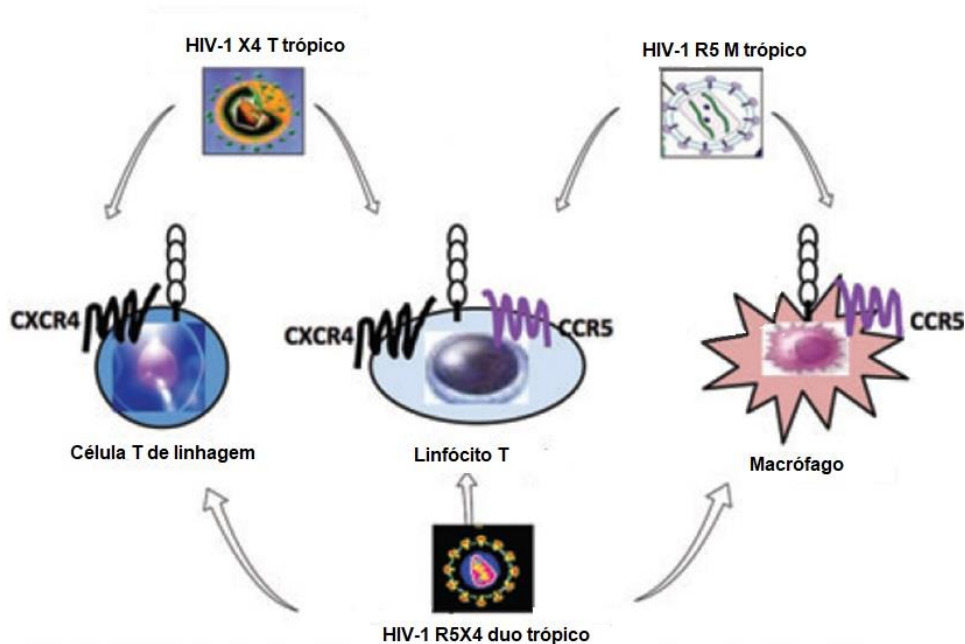


Figura 10: Classificação biológica do HIV-1 baseada no tropismo viral. Fonte: Adaptado de Naif e cols. 2013.

Estudos demonstram que, em geral, os vírus R5 predominam na infecção aguda, enquanto que os vírus X4 emergem somente no estágio mais avançado da infecção, sendo correlacionados com a progressão acelerada para a doença (49,179,180) (Figura 11). A evidência de que o correceptor CCR5 desempenha um importante papel na transmissão é decorrente da presença de alelos CCR5 com uma deleção de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) em cerca de 10% dos caucasianos (181). Esta mutação em homozigose apresenta um efeito protetor contra o HIV, codificando para a proteína truncada e impedindo a entrada de variantes virais M-trópicas nas células, as quais necessitam da utilização do CCR5 como correceptor.

Os mecanismos exatos envolvidos na troca do tropismo, e se o surgimento do vírus X4 é uma causa ou consequência da progressão da aids ainda não estão bem estabelecidos. A alta taxa de mutação do HIV-1 e a rápida renovação da população viral, combinada ao fato de que ocorre um processo gradual de acúmulo de mutações durante a infecção que culminam na troca do uso do correceptor CCR5 por CXCR4, sugerem que os vírus X4 podem emergir em qualquer momento durante a infecção (182–184). Os vírus X4

podem emergir como consequência da progressão, devido ao número reduzido de células que expressam CCR5 ou pela superexpressão de CXCR4 no momento mais avançado da infecção (185). Outra hipótese é que variantes X4 são reconhecidas de forma mais eficiente pelo sistema imunológico e, portanto, eliminadas, só emergindo após a exaustão deste sistema (186–188).

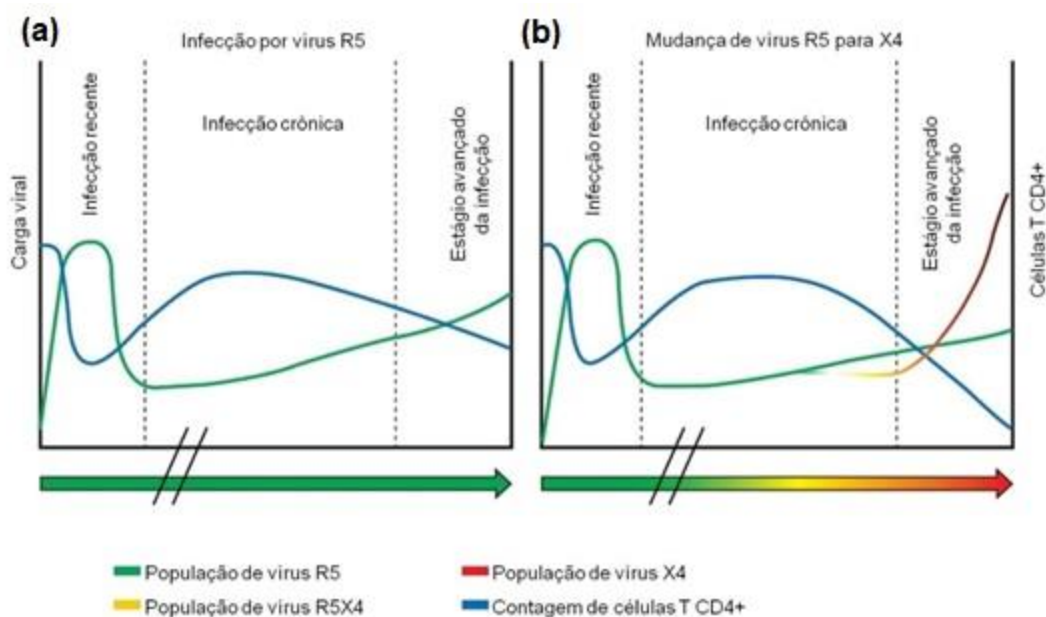


Figura 11: Representação esquemática da evolução das populações R5 e X4 do HIV-1 durante a infecção. (a) indivíduos infectados com vírus R5. (b) indivíduos infectados com vírus R5 e a emergência de vírus X4 associado com aumento acelerado da carga viral e diminuição de células T CD4+. Adaptado de Verhofstede e cols., 2012.

1.9.1 Fatores virais relacionados ao tropismo do HIV-1

Conforme descrito no tópico 1.2, a região V3 é uma das 5 regiões variáveis da gp120 do envelope viral do HIV-1, e com base na sua análise estrutural, foi considerada a principal responsável pela interação seletiva com os correceptores (37,38,189). Além do V3, outras regiões da gp120 como V1, V2 e C4 também podem modular o tropismo, contudo em um menor grau (190,191), assim como o número de sítios de glicosilação, a variação no comprimento das regiões variáveis e a carga elétrica total desta glicoproteína também podem estar correlacionados (192–194).

Variantes R5 usualmente apresentam carga elétrica aminoacídica mais baixa na região V3 em comparação a isolados X4 (195,196). A ligação entre o V3 e o correceptor é mediada pela presença de aminoácidos básicos (Arginina, R; ou Lisina, K), aminoácidos ácidos (Ácido glutâmico, E; Ácido aspártico, D) ou modificações pós-traducionais (geralmente N ou O-glicosilações ou sulfatação da tirosina), por consequência, mutações que afetam estes fatores estão correlacionadas com a seletividade do correceptor (196,197). Estudos determinaram alterações covariantes nas sequências de aminoácidos de V3 e compararam com sequências de cepas com tropismo conhecido, e foi observado que variações de aminoácidos das posições 11 e 25 se mostraram mais condizentes com as variações da carga total do V3, fator relevante para a determinação do fenótipo viral (198). Caso um aminoácido carregado positivamente esteja localizado na posição 11 e/ou 25 da alça V3, e a carga total de aminoácidos estiver entre 5 e 8, o vírus tende a apresentar preferência pelo uso do correceptor CXCR4. Em contrapartida, se o aminoácido na posição 11 e/ou 25 for negativamente carregado ou neutro, o vírus tende a usar o CCR5 como correceptor de entrada. Vírus duotrópicos possuem a habilidade de usar tanto o CXCR4 quanto o CCR5, esses vírus geralmente pontuam como sendo um vírus X4 quando as regras 11/25 e carga total do V3 são utilizadas (196).

A maioria dos estudos de tropismo são realizados em coortes com predomínio do subtipo B, e estes relatam que a maior proporção dos infectados apresentam variantes R5 no início da infecção e que os vírus X4 emergem com a progressão para a aids (49,180). Com relação ao B_{BR}, estudos relacionados à progressão da infecção sugeriram uma evolução mais lenta para aids em infectados por esta variante do subtipo B com uso exclusivo do correceptor CCR5 (199,200). Em contrapartida, recentemente nosso grupo observou um perfil similar de progressão para aids entre infectados pelo subtipo B e infectados pela variante B_{Br} (84), e além disso, Sucupira e colaboradores detectaram variantes X4 no início da infecção por B_{Br} (201). Alguns estudos demonstraram uma grande proporção de vírus X4 em recém infectados pelo subtipo D (202,203). Outros, demonstraram que infectados pelo subtipo C utilizam majoritariamente o correceptor CCR5, sendo rara a ocorrência de variantes X4 mesmo após a progressão para doença (204–207). A reduzida incidência de vírus X4 nesses indivíduos pode ser atribuída ao fato deste requerer mais mutações para que ocorra a troca de R5 para X4, tanto na região V3 como em outras regiões da gp120 em comparação com o subtipo B. Desta forma, os

diferentes subtipos podem desenvolver estratégias distintas na utilização do correceptor (207,208).

1.9.2 Antagonistas dos correceptores

Os antagonistas de correceptores são uma classe de antirretrovirais que têm como alvo os correceptores CCR5 e CXCR4. O bloqueio da interação CCR5-gp120 foi sugerido como uma possível estratégia terapêutica após a descoberta que pacientes que apresentavam homozigose para a CCR5 Δ 32 eram resistentes à infecção pelo HIV e que os ligantes naturais do CCR5 eram capazes de bloquear a infecção (209–211). A partir deste achado, foram desenvolvidas algumas pequenas moléculas capazes de bloquear os correceptores de entrada, porém, nenhum fármaco visando a inibição do CXCR4 foi aprovado para uso clínico até o momento.

As moléculas inibidoras de CCR5 se ligam à região hidrofóbica dos domínios transmembrana do CCR5 e alteram a conformação das alças extracelulares que interagem com o HIV durante a entrada na célula (Figura 12). Fármacos como o Aplaviroc, o Vicriviroc e o Cenicriviroc alcançaram a fase de testes clínicos (212–215), porém, o Maraviroc (UK-4278857), foi o único aprovado para uso clínico, em 2007 (216,217). Conhecido no Brasil como Maraviroque (MVQ), este medicamento é efetivo, mesmo em baixos níveis nanomolares, contra variantes R5 do HIV-1.

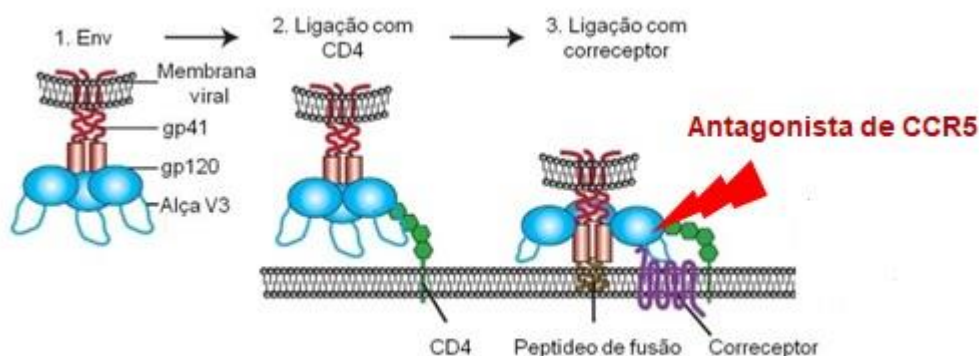


Figura 12: Ilustração do trímero das glicoproteínas do envelope em interação com CD4 e correceptor. Observa-se também a interação das alças da gp120 com CCR5, que acarretará a fusão membranar e conseqüentemente a entrada do vírus na célula; e a ação dos Antagonistas de CCR5. Adaptado de Shcherbakov e cols., 2015.

Para determinar a eficácia e segurança do MVQ em pacientes infectados pelo HIV-1 com tropismo para CCR5, foram realizados ensaios clínicos de fase 3, os estudos MOTIVATE 1 e 2 (Maraviroc Therapy in Antiretroviral Treatment- Experienced HIV-1- Infected Patients) (218,219). Os indivíduos receberam MVQ oral ou placebo, uma ou duas vezes ao dia, com doses ajustadas com base em outras drogas da cART do paciente. Após 48 semanas de uso do MVC, um número significativo de pacientes apresentaram menos de 50 cópias de RNA/mL em comparação ao grupo que recebeu placebo. Mais de 80% destes indivíduos mantiveram a supressão virológica até a semana 96, demonstrando a durabilidade da resposta deste antirretroviral. Os indivíduos que exibiam vírus não-R5 e que receberam o MVQ, não apresentaram uma diminuição significativa da carga viral quando comparado com o grupo placebo. A maioria desses indivíduos em falha virológica apresentaram vírus X4 (218), porém, o surgimento destes vírus sob pressão seletiva do medicamento geralmente tem origem de uma população minoritária já existente, e não devido a uma troca no tropismo viral (220).

Além da boa resposta virológica, já foi relatado que indivíduos sob uso do MVQ das coortes MOTIVATE e MERIT, entre outros trabalhos, também exibiram uma melhora imunológica, com aumento nas contagens de células T (221–223). O estudo MERIT ainda avaliou a mesma coorte após cinco anos de uso do MVQ, e os indivíduos mantiveram a eficácia antiviral e segurança a longo prazo (224).

No Brasil, o MVQ é comercializado desde 2013 como Celsentri (ViiV Healthcare, Reino Unido) e é utilizado em indivíduos multi-experimentados como terapia de resgate, ou seja, o mesmo é empregado quando os inibidores de transcriptase reversa, de protease e de integrase não suprimem a carga viral (conforme descrito na sessão 1.6). No entanto, para sua inclusão na terapia combinada, preconiza-se a realização prévia do teste de tropismo viral, e somente indivíduos com vírus R5 serão elegíveis para o uso deste antirretroviral.

1.9.3 Determinação do tropismo viral

Para a determinação do tropismo do HIV-1 já foram desenvolvidos ensaios fenotípicos e genotípicos. Os fenotípicos são considerados padrão-ouro em estudo clínicos com antagonistas de correceptores e baseiam-se na habilidade do vírus em se replicar em linhagens celulares correceptores-específicas e na sua capacidade de formação de sincícios, determinando o fenótipo X4 ou R5 (225). Após a descoberta dos correceptores,

várias linhagens celulares foram desenvolvidas para expressar em sua superfície diversas combinações de receptores de HIV-1. A maioria destes ensaios utilizam linhagens celulares de glioma humano (U87, U373 ou NP-2), que expressam CD4, CCR5 ou CXCR4. A linhagem celular GHOST também é bastante utilizada (226). Existem também os ensaios fenotípicos recombinantes (RVA – *Recombinant Viral Assays*), que utilizam vírus recombinantes ou pseudovírus construídos com sequências do envelope amplificadas por *real time* PCR (RT-PCR), provenientes do plasma do paciente. Estes fragmentos de *env* amplificados preservam a diversidade da população viral presente no plasma, prevenindo qualquer seleção que possa ocorrer durante a passagem *in vitro* (226). O *Trofile* é o ensaio comercial amplamente utilizado em estudos clínicos (Monogram Biosciences) (227) e apresenta uma versão melhorada, Trofile de sensibilidade aumentada (ESTA) (228), que aumentou a sensibilidade para a detecção de variantes X4 minoritárias. Este ensaio é capaz de detectar vírus X4 presentes em até 0,3% da população com 100% de sensibilidade (228). No entanto, todos estes ensaios fenotípicos são laboriosos, demorados e/ou onerosos.

Neste sentido, os testes genotípicos têm sido utilizados amplamente na prática clínica devido ao seu menor custo e rapidez na obtenção dos resultados. Os mesmos são fundamentados no princípio de que a alça V3 é o principal determinante do tropismo viral. O algoritmo mais simples é baseado na regra das posições 11 e/ou 25, em que a presença de aminoácidos básicos nestas posições estão relacionados ao uso do correceptor CXCR4 e na carga total da alça V3, na qual um vírus X4 está associado a uma carga total de aminoácidos maior que +6 (37,39), como já descrito anteriormente. Com intuito de aperfeiçoar a genotipagem, várias abordagens de bioinformática para interpretação de sequências de aminoácidos da alça V3 foram desenvolvidas. Essas ferramentas utilizam métodos computadorizados de aprendizado e são baseadas nas duas regras principais de previsão do tropismo. Dentre as ferramentas online disponíveis, destacam-se o WebPSSM e a plataforma Geno2pheno.

O webPSSM (*Position specific scoring matrices*, disponível em: <https://indra.mullins.microbiol.washington.edu/webpssm/>), avalia a sequência V3 frente ao alinhamento com sequências com fenótipos conhecidos através da experimentação funcional utilizadas durante o treinamento da ferramenta. Um sistema de pontuação compara a sequência do paciente com sequências X4 atribuindo uma pontuação para as semelhanças encontradas. Esta ferramenta apresenta algumas limitações, visto que

apenas sequências V3 com 35 aminoácidos são consideradas (sequências com inserções ou deleções não são analisadas) e possui apenas matrizes disponíveis para sequências pertencentes aos subtipos B e C (125).

O sistema Geno2pheno (disponível em: <https://coreceptor.geno2pheno.org>) é um algoritmo avançado baseado na análise das correções fenótipo-genótipo utilizando árvores de decisão e máquinas de vetores de suporte (SVM – *Support Vector Machines*) para prever a ligação do correceptor. Este sistema gera múltiplos alinhamentos contra mais de mil sequências referências conhecidas de V3 contendo representativos dos tipos de correceptores (R5, X4 e duotrópicas) oriundas da base de dados de Los Alamos e da literatura (229). A ferramenta Geno2pheno é amplamente utilizada e recomendada na prática clínica por ter uma boa concordância (86,5%) com o *Trofile* (230), por apresentar uma interface de fácil uso e ainda por permitir a inclusão de dados adicionais como carga viral e contagem de linfócitos T CD4+, por exemplo. Os valores de razão de falso positivo (FPR – *false positive ratio*) relativos a previsão de uso do CXCR4 podem ser ajustados pelo usuário, implicando em uma rigorosidade maior ou menor do teste. Essa pontuação pode ser entendida como a probabilidade de uma amostra negativa (R5) ser classificada como positiva (X4 ou duotrópica) pela ferramenta. Assim, quanto menor for o FPR da amostra, menor é a chance de classificar uma amostra R5 em X4 erroneamente. Resumindo, quanto maior for o FPR da sequência, maior a chance da mesma ser CCR5-trópica.

Os testes de genotipagem podem ser realizados com amostras de plasma e DNA proviral presente em PBMC, sendo este último importante para casos de indivíduos com carga viral indetectável e que necessitem da genotipagem prévia para inclusão do MVQ no esquema terapêutico. Além disso, a população de DNA proviral pode ser mais heterogênea do que a do RNA viral circulante no plasma (218,231). Alguns estudos por exemplo detectaram vírus X4 mais frequentemente em DNA do que RNA em estágios iniciais da infecção (232,233), enquanto outros só verificam esta diferença de linhagens nos estágios mais avançados (234–236). Este fato pode estar correlacionado ao subtipo viral envolvido (232,237), como também a metodologia de sequenciamento utilizada.

O sequenciamento viral para obtenção de sequências para o genotropismo pode ser realizado através do método de terminação de cadeia (Sanger) ou por uma das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS – *Next sequencing Generation*). As variantes minoritárias, presentes em frequências inferiores a 10-20%, geralmente

permanecem indetectáveis pelo método convencional por Sanger (238–240). Para alcançar essa população minoritária através deste tipo de sequenciamento, pode ser executada a metodologia de clonagem previamente ao sequenciamento ou a amplificação única do genoma (SGA – *Single Genome Amplification*) para obtenção de *amplicons* únicos, e por consequência, a detecção das quasispécies. Já a abordagem por NGS facilita esse processo, visto que é possível sequenciar milhares de sequências de uma só vez, com uma baixa taxa de erro e portanto, maior sensibilidade, permitindo não só estudos de evolução de subpopulações virais como também a detecção de variantes resistentes aos antirretrovirais em baixa proporção, e que podem levar a falha terapêutica.

1.9.4 Resistência ao Maraviroque

O surgimento de resistência ao MVQ pode estar associado à propagação, durante seu uso, de uma população minoritária de vírus X4 preexistente (218,241,242) ou pode resultar do aparecimento de mutações de resistência em variantes R5, levando à falha ao tratamento (241,243).

Alguns estudos relataram que indivíduos que não respondiam ao tratamento frequentemente apresentavam vírus X4 no momento da falha virológica, e destes, a maioria já exibia essas variantes em proporções baixas antes do tratamento com MVQ, demonstrando a capacidade em selecioná-las durante a terapia (218,241,244,245). Ou seja, provavelmente o aumento da detecção de variantes X4 estava relacionado à inibição do vírus R5, não sendo esta resultante da pressão seletiva contínua do MVQ para a mudança de R5 para X4. Em contrapartida, um estudo com o uso do MVQ por 24 semanas relatou uma não seleção de vírus X4 (246).

Consistente com o fato que MVQ atua através de um mecanismo alostérico de ligação celular, a expressão fenotípica de resistência nos vírus R5 *in vitro* é uma redução na inibição máxima (MPI), com a maioria dos vírus resistentes apresentando 80-95% de MPI, ao invés de um aumento na concentração inibitória de 50% (IC50) (247). Os mecanismos responsáveis pelo surgimento de resistência ao MVQ não foram completamente elucidados, mas envolvem mutações que resultam em maior afinidade da gp120 ao CCR5 ligado ao fármaco, permitindo a ligação apesar das mudanças conformacionais de ligação ao MVQ. Apesar de outras regiões da gp120 também apresentarem potenciais mutações de resistência, a região V3 é a que apresenta mais

assinaturas. *In vitro*, a seleção de duas mutações (21T e 28V) foram associadas a resistência ao MVQ (182).

Por outro lado, dados de indivíduos incluídos nos ensaios MOTIVATE e em outro estudos identificaram alterações únicas (13H, 16A, 20L, G15_P16INSA, N24_I25INSI e G18DEL) e vários padrões de mutação (11S + 26V, 18G + 22T, 19S + 26V, 20F + 21I, 20F + 25D + 26V e G15_P16INSG + 25D), todos localizados no V3, em pacientes com variantes R5 que falharam com MVQ (182,220,243,248).

2 JUSTIFICATIVA

A bem-sucedida política de acesso ao tratamento antirretroviral do Brasil contribui consideravelmente na melhoria da qualidade de vida do indivíduo infectado pelo HIV pois resulta em controle virológico, reduz a morbidade e mortalidade associadas ao HIV, mas não possui a capacidade de cura para a infecção. A recomendação atual do Ministério da Saúde é que para todos os indivíduos infectados, assim que diagnosticados seja oferecida terapia antirretroviral, independente de seu status imunológico e/ou virológico.

O início da cART durante a fase aguda da infecção é uma das formas encontradas atualmente para tentar se alcançar o controle da viremia e redução do tamanho do reservatórios virais em indivíduos infectados e que não possuem controle virológico natural, sendo estes fatores fundamentais na busca pela cura funcional. No entanto, o diagnóstico do HIV na fase aguda é raro, visto que os indivíduos de modo geral apresentam sintomas inespecíficos, dificultando a busca por serviço de saúde. Outro fator importante é que os testes rápidos de triagem utilizados como rotina só detectam anticorpos contra o vírus entre 12-14 dias após a infecção, sendo necessários exames sorológicos e moleculares complementares para detecção de indivíduos nesta fase. Diante disso, em colaboração com o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), estabelecemos e acompanhamos a primeira coorte de indivíduos tratados durante a fase aguda infecção no Brasil, visando alcançar maior entendimento a respeito do impacto da entrada da terapia precoce, ainda na fase aguda da infecção, com relação a dinâmica e evolução das quasispécies virais, visto que os efeitos desta entrada precoce da terapia ainda não foram totalmente elucidados.

O presente trabalho possui ainda uma segunda vertente, que se fundamentou em um momento mais tardio da infecção. Após anos em uso de terapia, o polimorfismo do vírus e a emergência de variantes virais de resistência sob a pressão seletiva das drogas limitam a eficácia da cART em suprimir a replicação viral, o que acarreta um número crescente de indivíduos infectados por variantes de HIV multiresistentes aos inibidores correntes. Deste modo, novos alvos terapêuticos foram testados, dentre eles, o MVQ, que é utilizado na fase crônica compondo a terapia de resgate no Brasil. Porém, para seu uso é necessário o conhecimento prévio das variantes R5 e X4, bem como a evolução destas populações virais após o início do medicamento. Assim, de modo a obtermos maior

conhecimento sobre a dinâmica e evolução genética destas populações no reservatório PBMC, empregamos a metodologia de NGS em indivíduos infectados pelo HIV-1 multiexperimentados submetidos à cART contendo MVQ. Para o recrutamento dos indivíduos deste segundo eixo da tese, além do INI, contamos com a colaboração do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI) e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG).

Diante deste cenário, o estudo das duas casuísticas propostas neste trabalho visou ampliar o conhecimento sobre a dinâmica das quasispecies virais sob a pressão seletiva da cART iniciada precocemente, e do uso da terapia contendo MVQ.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estudar a dinâmica das quasiespécies de HIV-1 no contexto do tratamento antirretroviral precoce em indivíduos na infecção aguda e da terapia de resgate com Maraviroque em indivíduos na infecção crônica.

3.2 Objetivos Específicos

Documento 1:

- Avaliar a resposta virológica/imunológica dos indivíduos infectados pelo HIV-1 que iniciaram a cART na infecção aguda.
- Avaliar o impacto da cART implementada na fase aguda da infecção no tamanho do reservatório do HIV-1
- Avaliar o impacto da cART implementada na fase aguda da infecção no diversidade e complexidade filogenética do HIV-1.

Documento 2:

- Avaliar a resposta virológica/imunológica dos indivíduos crônicos infectados pelo HIV-1 diante da inclusão do MVQ na cART de resgate.
- Avaliar a distribuição das populações virais R5 e/ou X4 presentes antes e após o início da cART com MVQ;
- Verificar a emergência de possíveis mutações de resistência ao MVQ ao longo da cART contendo este fármaco.

4 DOCUMENTOS

4.1 Documento 1 – “Reduction of HIV-1 reservoir size and diversity after one year of cART among individuals starting treatment during early stages of acute infection”

Autores: Thaysse Ferreira Leite, Edson Delatorre, Fernanda Heloise Côrtes, Ana Cristina Garcia Ferreira, Sandra Wagner Cardoso, Beatriz Grinsztejn, Michelle Morata de Andrade, Valdilea Gonçalves Veloso, Mariza Gonçalves Morgado, Monick Lindenmeyer Guimarães

Periódico: Trabalho aceito em 21 Jan 2019 para publicação na *Frontiers in Microbiology – Virology* | doi: 10.3389/fmicb.2019.00145

Resumo:

O objetivo da cART precoce do HIV é limitar a semeadura do reservatório viral durante a fase inicial da infecção e, conseqüentemente, diminuir a diversidade viral intra-hospedeiro. Neste trabalho, avaliamos o efeito do início da cART no tamanho e complexidade do reservatório proviral. Foram obtidas amostras de PBMC e plasma de dez indivíduos infectados pelo HIV diagnosticados na fase aguda da infecção, antes (PreART) e 12 meses (M12ART) após a cART supressiva. O tamanho do reservatório proviral do HIV foi determinado por PCR quantitativo em tempo real; a diversidade viral intra-hospedeiro da região *env* C2-V3 foi avaliada por amplificação genômica única ou sequenciamento de próxima geração em PBMC e plasma, respectivamente. A diversidade média de nucleotídeos (π) e a entropia de Shannon normalizada (H_{SN}) foram usadas para inferir a complexidade da população viral. Comparado ao PreART, o M12ART obteve uma recuperação imunológica com um ganho de ~ 200 células T CD4 + ($P = 0,008$) e uma normalização da relação CD4 / CD8 [1,0 (IQR: 0,88-1,18), $P = 0,016$], bem como uma diminuição significativa nos níveis de RNA (~ 4 log, $P = 0,004$) e DNA (~ 1 log, $P = 0,002$) do HIV-1. O tempo médio para atingir a supressão viral foi de três meses (IQR: 2,8-5,8 meses). A alta mistura entre seqüências de ambas as visitas sugere que o reservatório de DNA do HIV-1 permaneceu notavelmente estável durante a cART. Após um ano de cART, houve uma pequena redução na π proviral (PreART = 0,20 vs M12ART = 0,10; $P = 0,156$),

mas uma diminuição significativa na H_{SN} ($Pre_{ART} = 0,41$ vs $M12_{ART} = 0,25$; $P = 0,019$). Não encontramos correlação entre π ou H_{SN} no Pre_{ART} e a taxa de decaimento do DNA do HIV, contagem de linfócitos T CD4 +, ou relação CD4 / CD8 no $M12_{ART}$. Um ano de início da cART levou a uma redução significativa no tamanho e complexidade do DNA total do HIV-1 no reservatório de PBMC e alcançou a restauração imunológica independentemente da carga viral inicial do HIV-1, contagem de células T CD4 + ou subtipo de HIV-1.

Reduction of HIV-1 reservoir size and diversity after one year of cART among Brazilian individuals starting treatment during early stages of acute infection

Running title: HIV-1 reservoir in acute infection

Thaysse Ferreira Leite^{1*}, Edson Delatorre^{1*#†}, Fernanda Heloise Côrtes¹, Ana Cristina Garcia Ferreira², Sandra Wagner Cardoso², Beatriz Grinsztejn², Michelle Morata de Andrade², Valdilea Gonçalves Veloso², Mariza Gonçalves Morgado¹, Monick Lindenmeyer Guimarães¹

¹ Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratório de Pesquisa Clínica em DST e AIDS, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

* Joint first authors

Corresponding author: Edson Delatorre. Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil Phone: +55 21 3865 8228. E-mail: delatorre.ioc@gmail.com or edsonod@ioc.fiocruz.br.

† Present address: Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos. Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Rio de Janeiro. Brazil.

Keywords: HIV-1, reservoir, diversity, early cART, acute infection

Abstract

The aim of early combined antiretroviral treatment (cART) of HIV is to limit the seeding of the viral reservoir during the initial phase of infection and, consequently, decrease intrahost viral diversity. Here, we assessed the effect of early cART on size and complexity of the proviral reservoir. Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and plasma samples were obtained from ten HIV-infected Brazilian individuals diagnosed at the acute phase of infection, before (Pre_{ART}) and 12 months (M12_{ART}) after suppressive cART. HIV proviral reservoir size was determined by quantitative real-time PCR; intrahost viral diversity of the env C2-V3 region was assessed by single genome amplification or next-generation sequencing in PBMC and plasma, respectively. Mean nucleotide diversity (π) and normalized Shannon entropy (HSN) were used to infer the complexity of the viral population. Compared to Pre_{ART}, M12_{ART} saw an immunological recovery with a gain of ~200 CD4⁺ T cells ($P=0.008$) and a normalization of the CD4/CD8 ratio [1.0 (IQR: 0.88–1.18), $P=0.016$], as well as a significant decrease in HIV-1 RNA (~4 log, $P=0.004$) and DNA (~1 log, $P=0.002$) levels. The median time to achieve viral suppression was three months (IQR: 2.8–5.8 months). The high intermixing between sequences from both visits suggests that the HIV-1 DNA reservoir remained remarkably stable under cART. After one year of cART, there was a minor reduction in proviral π (Pre_{ART}=0.20 vs M12_{ART}=0.10; $P=0.156$) but a significant decrease in HSN (Pre_{ART}=0.41 vs M12_{ART}=0.25; $P=0.019$). We found no correlation between π or HSN at Pre_{ART} and the rate of HIV DNA decay, T CD4⁺ counts, or CD4/CD8 ratio at M12_{ART}. Based on a small cohort of Brazilian infected individuals under early cART and analyses of the env region, one year of follow-up suggested a reservoir size reduction, allowed a significant decrease of HIV-1 complexity, and achieved immunological restoration regardless of the initial HIV-1 plasma viral load, CD4⁺ T cell counts, or HIV-1 subtype. However, further studies in the Brazilian setting aiming a longer follow-up and larger cohort are required in this field.

Introduction

Combined antiretroviral therapy (cART) suppresses HIV-1 replication and reduces morbidity and mortality, but does not eradicate HIV-1 infection, as a low but persistent level of HIV-1 can still be detected in plasma and cell reservoirs (Chun et al., 1997; Ghosn et al., 2018; Kiselina et al., 2015). Latent infected resting memory CD4⁺ T lymphocytes are the best known HIV-1 reservoir, which is established already during early infection. This

reservoir includes cells with an integrated copy of the HIV-1 genome that is not expressed while the cells remain in a resting state (Chun et al., 2002; Douek et al., 2002) and is maintained mainly by the cells' clonal expansion (Chomont et al., 2009, 2011; Von Stockenstrom et al., 2015). However, it has been suggested that persistent virus replication may be an important contributor to its maintenance (J Buzón et al., 2010; Yukl et al., 2010), particularly in lymphoid tissue sanctuary sites (Lorenzo-Redondo et al., 2016). Elimination/reduction of this latent reservoir represents a great hope for curing HIV-1 infection. As the reservoir is established during the acute phase of infection, early cART has been proposed as a means to restrict reservoir size and genetic complexity (Chomont et al., 2009; Josefsson et al., 2013; Lori et al., 1999; Strain et al., 2005).

HIV-1 sequence diversity is limited by the “genetic bottleneck effect” during sexual transmission, which selects viruses with the highest overall fitness (Carlson et al., 2014) but results in a more homogeneous viral population. However, in cohorts of men who have sex with men (MSM), the selection for fitter variants appears less stringent, resulting in infection being established by multiple founding viruses (Gottlieb et al., 2008; Li et al., 2010). Accordingly, the complexity of sequence diversity during early HIV-1 infection may affect the efficacy of cART in decreasing the reservoir, mainly due to immune and therapeutic escape mutations. Another potential escape route is through viral recombinants (Abrahams et al., 2009; Bar et al., 2010; Batorsky et al., 2011; Kearney et al., 2009; Li et al., 2010; Novitsky et al., 2011). Therefore, investigating the diversity of viral variants during primary infection may help evaluate viral evolution and predict clinical outcomes.

Residual replication has been proposed as a mechanism that maintains the HIV-1 reservoir during cART. Failure to block the viral replication cycle, enables renewed cellular infections and continuous replenishment of the HIV-1 DNA reservoir (Josefsson et al., 2013). Individuals who initiated cART during early infection, may present low viral diversity in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) and plasma reservoirs after years on suppressive therapy, and the slight sign of viral replication indicates that the reservoir was maintained by homeostatic cell proliferation (Josefsson et al., 2013). A recent study demonstrated a faster decline in HIV DNA levels in early cART-treated patients with homogeneous viral populations after six months of therapy (Wang et al., 2017).

Understanding the dynamics of long-lived cellular HIV-1 reservoirs in individuals treated during primary infection, can direct the choice of long-term treatment regimens to achieve post-treatment control of HIV-1 in Brazil. Here, we investigated the effect of early

cART during the initial Fiebig stages of HIV-1 acute infection on the size, diversity, and complexity of HIV-1 total DNA in the PBMC reservoir by examining HIV-1 populations prior and one year after cART initiation.

Material and Methods

Subject characteristics

A cohort of Brazilian individuals presenting recent HIV-1 infection has been followed-up since August 2013 at the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ). These individuals initiated cART immediately after diagnosis and have been described elsewhere (Ferreira et al., 2017). For the present study, we selected only individuals, who started cART during the acute phase (Fiebig II–V) (Fiebig et al., 2003) of HIV-1 infection (n=10). Participants were recruited between December 2014 and October 2015, and had at least one year of successful cART after that. PBMC and plasma samples were obtained at the baseline visit (Pre_{ART}) and 12 months after cART onset (M12_{ART}), and were stored until use. The processing of all HIV samples was performed in accordance with institutional standard biosecurity and safety procedures at biosafety level 2. The study was approved by the INI Ethical Review Board (approval number 36859614.8.0000.5262), and all subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

CD4+ and CD8+ T cell counts and HIV-1 RNA quantification

Peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell counts were determined by flow cytometry using the MultiTest TruCount-Kit and MultiSet software on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). HIV-1 RNA in plasma was measured by the Abbot Real-Time HIV-1 Assay, whose lower limit of detection was 40 copies/mL (Abbott Laboratories, Germany).

HIV-1 total DNA measurement in PBMCs

Total cellular DNA was extracted from cryopreserved PBMCs (1×10^7 cells) obtained at Pre_{ART} and M12_{ART} using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany). Cell-associated HIV-1 DNA was quantified using the Generic HIV® DNA Cell Kit (Biocentric, France), following the manufacturer's instructions. The assay's lower limit of detection was 40 HIV DNA copies/10⁶ cells.

HIV-1 DNA single genome amplification (SGA)

Proviral DNA was extracted from PBMCs using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. HIV-1 quasispecies was obtained by SGA of a 552-bp fragment from the C2-V3 env region through nested PCR using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) as described elsewhere (Delwart et al., 1993). Considering a Poisson distribution, at a dilution in which approximately 30% of amplicons are positive, a single amplifiable molecule is present about 80% of the time (Palmer et al., 2005). The PCR products were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK). Sequences were obtained using the ABI BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, USA) on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited using SeqMan 7.0 software (DNASTAR Inc., USA). APOBEC3G/F-mediated hypermutations were revealed by Hypermut software (Rose and Korber, 2000) and sequences showing ambiguous bases were excluded.

HIV-1 env RNA haplotypes reconstruction from NGS data

Viral RNA from plasma samples collected at PreART (baseline) was extracted using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany). The cDNA was obtained by reverse-transcribed PCR using the SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) and was then subjected to nested PCR for amplification of the env gene as described above. The resulting amplicons were made into a library using the Nextera® XT DNA Library Prep Kit with unique barcodes from the Nextera® XT Index Kit (Illumina, USA), following the manufacturer's instructions. DNA sequencing was performed on a MiSeq instrument using MiSeq Reagent Nano Kit, v2 (500 cycles; Illumina, USA). Demultiplexed reads were trimmed to remove adaptors, low-quality bases ($Q < 25$), and short reads (< 100 bp), and then mapped against single-genome amplification consensus sequences from each patient using Geneious software v.9.1.8 (Kearse et al., 2012) with high mapping quality ($MAQ \geq 30$). Alignment regions with at least 500x coverage were used for haplotype reconstruction with QuasiRecomb 1.2 (Marz et al., 2014), employing the flag '-conservative' to increase specificity. Only haplotypes with frequencies $\geq 1\%$ were used for further analysis.

HIV-1 subtyping

Sequences were aligned with HIV-1 reference sequences from the Los Alamos database (<http://hiv-web.lanl.gov>) using ClustalW in MEGA 6 and were manually edited. The final env alignment covered positions 6,840–7,372 relative to the HXB2 genome. Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed with PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) using the most appropriate nucleotide substitution model selected with jModeltest v. 3.7 (Darriba et al., 2012). The approximate likelihood-ratio test (aLRT) was used to estimate the confidence of branching on the tree.

Analyses of viral diversity

Complexity of the intrahost viral population was assessed through two diversity measures. The mean nucleotide diversity (π), an abundance-based functional index representing the average number of nucleotide differences between any two representatives of the population, was calculated in MEGA7 (Kumar et al., 2016). The normalized Shannon entropy (HSN), an abundance-based index that measures viral population diversity based on haplotype frequencies, was calculated in the R package vegan (Oksanen et al., 2017), after sample rarefaction to correct for bias in sample size (Gregori et al., 2016).

Phenotypic prediction of co-receptor usage

The quasispecies viral tropism was predicted based on the V3 amino acid sequence through the Geno2pheno algorithm (available at <http://coreceptor.geno2pheno.org>). The false positive rate cut-off was 10% for DNA, whereas RNA sequences were classified as CCR5 or non-CCR5-using viruses as described previously (Hayashida et al., 2017; Lengauer et al., 2007).

Statistical analyses

All statistical analyses were performed in GraphPad Prism v6 (GraphPad Software, USA). Variables between groups (unpaired) or from the same group from different visits (paired) were compared using the Mann-Whitney U test or Wilcoxon test, respectively. Association between variables was evaluated using the Spearman's rank correlation. Linear regression was used to calculate the rate of HIV-1 DNA variation between visits in each subject. P values <0.05 were considered statistically significant.

Sequence availability

SGA env sequences have been submitted to GenBank under accession numbers MH765045–MH765329. NGS data have been deposited to the NCBI BioProject database under accession number PRJNA487221.

Results

Clinical, epidemiological, and immunological characteristics of early-treated individuals

The study included ten HIV-1-infected Brazilian individuals diagnosed during the acute phase of infection, with a median age at diagnosis of 28 years [interquartile range (IQR): 26–42 years]. All participants were MSM and started cART immediately after HIV-1 diagnosis. The cART regimen varied among participants, however all included two co-formulated nucleoside reverse transcriptase inhibitors (lamivudine plus tenofovir) in combination with a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (efavirenz, n=5), a protease inhibitor (fosamprenavir/atazanavir, n=2 each), or an integrase inhibitor (raltegravir, n=1).

Prior to cART initiation (Pre_{ART} visit), median CD4⁺ and CD8⁺ T cell counts of all individuals were 634 and 1473 cells/mm³ (IQR: 420–886 for CD4⁺ and 526–1840 for CD8⁺ cells), respectively, and the CD4/CD8 ratio was 0.52 (IQR: 0.42–0.83). After 12 months on cART (M12_{ART}), we observed a significant immunological recovery, with median CD4⁺ counts of 836 cells/mm³ (IQR: 719–1122) (Figures 1A and 2). This meant an average increase of ~200 CD4⁺ T cells (P=0.008) and a significant rise in the CD4/CD8 ratio [median of 1.0 (IQR: 0.88–1.18), P=0.016] (Figures 1B and 2).

The immunological improvement observed 12 months after cART initiation was accompanied by a significant decrease in the median levels of HIV-1 total DNA in PBMCs and HIV-1 RNA in plasma (Figures 1C and 1D). The plasma HIV-1 viral load decreased drastically (~4 log) between Pre_{ART} and M12_{ART} visits (from 5.86 to <1.6 log copies/mL, P=0.004), whereas HIV-1 DNA in the PBMC compartment displayed a modest yet significant reduction (~1 log, from 3.04 to 2.18 log copies/10⁶ PBMC, P=0.002). The median time to achieve viral suppression (<1.6 log HIV RNA copies/mL) after the onset of cART was approximately three months (IQR: 2.8–5.8 months), and only one individual (IVA41) exhibited a minor viral rebound (2.66 log HIV RNA copies/mL) within the 12 months

of follow-up (Figure 2). It should be noted, however, that sustained viral loads were recovered after that (data not shown).

Sequence analysis

To understand the effect of early cART initiation on HIV-reservoir diversity and complexity, we analyzed the intrahost viral population by SGA of the HIV-1 *env* gene before and after cART. Similar quantities of SGA HIV-1 proviral sequences were obtained from both visits' samples: 15 (IQR: 15–16) in Pre_{ART} and 14.5 (IQR: 11–16) in M12_{ART} (P=0.14). Additionally, we used NGS to evaluate HIV diversity in the individuals' plasma samples at the Pre_{ART} visit. The median coverage per sample was 8,182 (IQR: 4,755–10,904) reads per base (Figure S1), and after assembly between one to eight HIV-1 *env* haplotypes were reconstructed per sample.

All sequences obtained from proviral DNA and plasma RNA branched together in highly supported monophyletic clusters (aLRT=1) by subject (Figure 3A); suggesting that in all subjects infection resulted from a single or limited number of closely related viral variants. It is noteworthy that in four subjects (IVA32, IVA21, IVA17, and IVA37), the HIV-1 RNA sequences were the closest to the common ancestor of the subjects' HIV-1-infecting lineage and outside the main cluster comprising the proviral variants. In the remaining subjects, the HIV-1 RNA sequences were intermixed with proviral DNA sequences. HIV-1 subtype B was the most frequent variant detected (n=6), followed by subtypes F1 and C (n=2 in each). R5-tropic viruses dominated the intrahost HIV-1 population in plasma and PBMCs at both visits, with only two individuals (IVA21 and IVA40) presenting a low frequency (6%) of X4-tropic viral clones in PBMCs at Pre_{ART} (Table 1 and Figure 3A). APOBEC3G/F-induced hypermutations were identified at Pre_{ART} in proviral sequences from only three individuals (IVA09, IVA36, and IVA40), with frequencies of 6–12%.

To address the influence of early cART on reservoir complexity, we measured the average pairwise nucleotide differences of the viral population (π) and the uniformity of the haplotype distribution (HSN) of viral DNA and RNA from each visit. Hypermutated sequences were excluded from these analyses. All individuals exhibited low π values (<1.5%) despite the Fiebig stage at cART initiation. We observed a minor decline in median proviral π after one year of cART (Pre_{ART} = 0.20, IQR: 0.10–0.58 vs. M12_{ART} = 0.10, IQR: 0.20–0.33; P=0.156) (Figure 3B). There was, however, a strong positive correlation between proviral and plasma π values before cART onset ($r=0.77$; P=0.0157, Figure S2),

which was not observed at M12_{ART} nor when comparing π values from HIV DNA between visits. The overall median HSN estimated for the HIV-1 proviral population decreased significantly between Pre_{ART} and M12_{ART} visits (0.41, IQR: 0.28–0.56 vs. 0.25, IQR: 0.14–0.30; $P=0.019$) (Figure 3B). However, no correlation was found when comparing the HSN values calculated from different compartments or visits.

In spite of relatively low π values at Pre_{ART}, the values varied among participants (range: 0.1 to 1.5%). A comparison revealed no significant correlation between π or HSN at Pre_{ART} with immunological and virological parameters, such as rate of HIV DNA decay, T CD4⁺ cell change, or the CD4/CD8 ratio, at M12_{ART} (Figure 4).

Discussion

A latent HIV-1 reservoir in resting memory CD4⁺ T cells is recognized as the major barrier to HIV-1 eradication, as its establishment and long-term persistence enables renewed viremia after treatment failure or interruption (Richman et al., 2009). Early cART has been proposed as a means for achieving long-term control of viral replication upon cART interruption, by delaying the viral rebound and potentially inducing a post-treatment controller status (Archin et al., 2012; Avettand-Fènoel et al., 2016). Here, we analyzed ten acutely HIV-infected patients starting cART during the early Fiebig stages, before and one year after treatment, to investigate the effect of early therapy on the size and complexity of HIV-1 total DNA in the PBMC reservoir.

Benefits of early cART include a reduction in residual viral replication, a restraint of viral diversity and reservoir development, and accelerated immune restoration (Delwart et al., 2002; Hecht et al., 2006; Ngo-Giang-Huong et al., 2001; Yerly et al., 2000). We observed significant immunological restoration in all subjects one year after cART onset during acute HIV infection, with increases of both CD4⁺ T cell counts and the CD4/CD8 ratio (~1.0), in agreement with previous results (Hoenigl et al., 2016). The rise of the CD4/CD8 ratio was previously linked with reduced levels of HIV DNA in peripheral blood cells (Chun et al., 2002), mainly if cART was established during primary HIV-1 infection (Hocqueloux et al., 2013). Thus, initiating cART during the acute phase of HIV infection offers an opportunity to reduce HIV reservoirs and achieve optimal immune reconstitution. Nevertheless, a recent study (Colby et al., 2018) has demonstrated that a CD4/CD8 ratio <1 is associated with a rapid viral rebound following treatment interruption, in spite of early cART initiation and sustained undetectable viral load along treatment follow-up. The

immunological recovery was accompanied here by a reduction in both HIV RNA and DNA levels. The median viral load decay time to undetectable levels was about three months after cART start, similar to previous studies (Hoenigl et al., 2016; Pilcher et al., 2004), indicating that a rapid and efficient virologic suppression was achieved in this cohort. The median HIV-1 DNA load of our subjects at baseline visit was ~3 log copies/106 PBMCs, similar to the one described in the ANRS PRIMO cohort (Schiffer et al., 2004). After one year of suppressive cART, HIV-1 DNA levels in PBMCs were reduced to ~2 log copies/106 PBMCs, reaching similar levels as those of HIV-1-infected patients, who had started intensive and standard cART during primary HIV-1 infection (Chéret et al., 2015; Hocqueloux et al., 2013).

A reduction of the HIV-1 latent reservoir may help HIV-1-infected patients reach at least a transient drug-free remission of their disease (Hocqueloux et al., 2013; Sáez-Cirión et al., 2013). Lower levels of HIV DNA in PBMCs at antiretroviral treatment interruption have been associated with a longer time to treatment resumption (Piketty et al., 2010). Despite the reduction in HIV-1 total DNA in the PBMC reservoir observed in our study, the values were still higher (median 2.18 log copies/106 PBMCs) than in post-treatment controllers (PTC) from the VISCONTI cohort (median 1.71 log copies/106 PBMCs), for whom long-term viral control was maintained after treatment interruption (Sáez-Cirión et al., 2013). The PTC's median time to plasma viral load becoming undetectable was similar to the one calculated in this study; however, median cART duration was much longer (36.5 months in PTC vs. 12 months in this study). Moreover, a study conducted in Thailand showed that total HIV DNA mean values in PBMCs from early-treated acutely HIV-infected individuals decreased over time achieving very low levels after three years of cART (Ananworanich et al., 2016). Thus, with longer follow-up of the patients included in this study, total HIV DNA may reduce even further in the PBMC reservoir.

Here, analysis of HIV env sequences from plasma and PBMCs revealed very high population intermixing between the clones obtained before and after cART onset, indicating that the HIV-1 DNA reservoir remained remarkably stable. This result agrees with the findings of Josefsson et al. (Josefsson et al., 2013), whereby viral populations in both pre-therapy plasma and cells isolated after suppressive cART initiated during early/acute infection were nearly monomorphic. The absence of genetic changes indicates that maintenance of the HIV reservoir during suppressive cART, as observed in this study, was the result of homeostatic cell proliferation rather than of ongoing viral replication. This is

consistent with the results of other studies analyzing HIV reservoir sequences but from longer time intervals than those reported here (Brodin et al., 2016; Chomont et al., 2009; Kearney et al., 2014; Van Zyl et al., 2017; Von Stockenstrom et al., 2015). However, the absence of divergence in the PBMC HIV DNA reservoir does not exclude the possibility that ongoing residual replication could be occurring in sanctuary sites, especially in lymphoid tissue (Lorenzo-Redondo et al., 2016). A more robust sampling scheme, assessing distinct compartments and over a longer time frame should be performed to increase the chances of identifying putatively evolving viruses.

Recent studies have demonstrated that patients, who were treated early during primary HIV-1 infection, had low viral diversity in both plasma or cells isolated after years on therapy (Josefsson et al., 2013; Kearney et al., 2014). Even though diversity values were low at the baseline visit, we detected a slight decline in HIV DNA diversity in PBMCs and a significant decline in proviral population complexity after 12 months on cART. As we found no evidence of ongoing viral replication, the reduction in intrahost proviral complexity following cART may be explained by the clearance of HIV-infected cells, probably long-lived T cells (Palmer et al., 2008), and coincided with a reduction in HIV DNA levels. Interestingly, the diversity indices exhibited by these subjects after one year of suppressive cART, were similar to those found in a subgroup of rare individuals capable of naturally controlling HIV-1 replication and maintaining it at low levels (named elite controllers). The diversity indices exhibited by elite controllers are associated with the presence of a putative more efficient mechanism to control HIV-1 replication and disease progression (Azevedo et al., 2017). A previous study found an association between HIV genetic diversity during the early phase of infection and a faster HIV DNA decline following cART (Wang et al., 2017). In contrast, we did not find any significant correlation between immunological recovery or virologic control achieved after one year of suppressive cART and HIV diversity before cART initiation.

We detected three HIV-1 env subtypes (B, C, and F1) among the ten patients included in this study. This subtype distribution is in accordance with the molecular epidemiology found in Brazil (Bello et al., 2011). The different HIV-1 clades seem not to have influenced cART outcomes observed in the different subjects. However, it is noteworthy that IVA05 and IVA38, both infected with HIV-1 subtype C strains, presented the highest values of viral diversity and complexity in both PBMC and plasma compartments. This finding agrees with a previous study showing that subtype C displays

higher median diversity than subtype B (Rieder et al., 2011). Additionally, the majority of HIV-1 variants were R5-tropic during the entire follow-up period. The only exceptions were two subjects infected with HIV-1 subtype B, who exhibited a low frequency of X4-tropic clones even at the very beginning of HIV-1 infection, in agreement with previous studies (Chalmet et al., 2012; Raymond et al., 2010; Sheppard et al., 2002).

Despite the intensification of offering rapid tests for HIV detection inside and outside the health services, covering key populations at risk, and the ongoing follow-up of cohorts of serodiscordant couples conducted by our institution (INI-FIOCRUZ), the identification of individuals in the early primary infection phases, according to the Fiebig classification, and their follow-up are still hard tasks, as well as, the obtaining of high quality cryopreserved PMBC samples from long term storage to perform the laboratory analyses. Consequently, most of the studies addressing this group, considering the complex strategies for characterizing the early stages of HIV-acute infection, management of early cART starting and the clinical follow-up at specific time points limits the scope, mainly in developing countries where resources to closely following clinical cohorts are more restricted. Thus, the effects of early treatment initiation on the viral evolution, size and distribution of the viral reservoir are still poorly explored and need to be better characterized and, although having a relatively small number of individuals included in our study, we still justified conducting the present analyzes. As of our knowledge, this is the first Brazilian study discussing the viral evolution and reservoir size overtime in a cohort of HIV infected individuals starting cART in the early Fiebig stages of HIV primary infection. Further studies with larger cohorts and longer follow-up periods should be performed to identify better predictive markers for individuals, who might reach the PTC status after cART interruption. Assessment of HIV DNA level and diversity in different T cell subsets and/or compartments would substantially improve our understanding of the effect early cART has in these subjects and would likely add to the growing body of evidence indicating the contribution of each cell population to maintaining the HIV reservoir (Buzon et al., 2014).

In summary, we demonstrate that based on this small cohort and analyses of only the envelope region, one year of suppressive cART initiated in the early stages of HIV infection suggested a reduction of the size and complexity of HIV-1 total DNA in the PBMC reservoir, as well as achieve immunological restoration. Immunological recovery and virologic suppression were not associated with proviral diversity before cART onset. The early initiation of cART in HIV-acutely infected individuals in current Brazilian setting may

favor strategies to achieve post-treatment control of HIV and, ultimately, a functional cure by restricting the pool of variants and allowing a more focused targeting with therapeutic vaccines or other immune approaches. However, further studies are required to determine the follow-up time necessary to achieve the lowest viral endpoints for clinical management.

Acknowledgments

We thank Soraia Moura and Sandro Nazer from Laboratório de Pesquisa Clínica em DST e AIDS for their assistance. ED was financed by a Postdoctoral fellowship from the “Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD)” by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. MLG and MGM are recipients of a CNPq Fellowship, and TFL is funded by a CAPES Ph.D. fellowship.

Author Contributions Statement

MG, MM, VV, FC, and BG conceived and designed the study. TL, ED, and FC performed the experiments. AF, SC, and MA participated in patient recruitment. TL, ED, and MG analyzed the data and drafted the manuscript. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest

References

Abrahams, M.-R., Anderson, J. A., Giorgi, E. E., Seoghe, C., Mlisana, K., Ping, L.-H., et al. (2009). Quantitating the Multiplicity of Infection with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C Reveals a Non-Poisson Distribution of Transmitted Variants. *J. Virol.* 83, 3556–3567. doi:10.1128/JVI.02132-08.

Ananworanich, J., Chomont, N., Eller, L. A., Kroon, E., Tovanabutra, S., Bose, M., et al. (2016). HIV DNA Set Point is Rapidly Established in Acute HIV Infection and Dramatically Reduced by Early ART. *EBioMedicine* 11, 68–72. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.024.

Archin, N. M., Vaidya, N. K., Kuruc, J. D., Liberty, A. L., Wiegand, A., Kearney, M. F., et al. (2012). Immediate antiviral therapy appears to restrict resting CD4+ cell HIV-1

infection without accelerating the decay of latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 9523–9528. doi:10.1073/pnas.1120248109.

Avettand-Fènoel, V., Hocqueloux, L., Ghosn, J., Cheret, A., Frange, P., Melard, A., et al. (2016). Total HIV-1 DNA, a marker of viral reservoir dynamics with clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* 29, 859–880. doi:10.1128/CMR.00015-16.

Bar, K. J., Li, H., Chamberland, A., Tremblay, C., Routy, J. P., Grayson, T., et al. (2010). Wide Variation in the Multiplicity of HIV-1 Infection among Injection Drug Users. *J. Virol.* 84, 6241–6247. doi:10.1128/JVI.00077-10.

Batorsky, R., Kearney, M. F., Palmer, S. E., Maldarelli, F., Rouzine, I. M., and Coffin, J. M. (2011). Estimate of effective recombination rate and average selection coefficient for HIV in chronic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5661–5666. doi:10.1073/pnas.1102036108.

Bello, G., Soares, M. A., and Schrago, C. G. (2011). The Use of Bioinformatics for Studying HIV Evolutionary and Epidemiological History in South America. *AIDS Res. Treat.* 2011, 1–13. doi:10.1155/2011/154945.

Brodin, J., Zanini, F., Thebo, L., Lanz, C., Bratt, G., Neher, R. A., et al. (2016). Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife* 5, 1–15. doi:10.7554/eLife.18889.

Buzon, M. J., Martin-Gayo, E., Pereyra, F., Ouyang, Z., Sun, H., Li, J. Z., et al. (2014). Long-Term Antiretroviral Treatment Initiated at Primary HIV-1 Infection Affects the Size, Composition, and Decay Kinetics of the Reservoir of HIV-1-Infected CD4 T Cells. *J. Virol.* 88, 10056–10065. doi:10.1128/JVI.01046-14.

Carlson, J. M., Schaefer, M., Monaco, D. C., Batorsky, R., Claiborne, D. T., Prince, J., et al. (2014). Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck. *Science* (80-.). 345, 1254031–1254031. doi:10.1126/science.1254031.

Chalmet, K., Dauwe, K., Foquet, L., Baatz, F., Seguin-Devaux, C., Van Der Gucht, B., et al. (2012). Presence of CXCR4-Using HIV-1 in Patients With Recently Diagnosed Infection: Correlates and Evidence for Transmission. *J. Infect. Dis.* 205, 174–184. doi:10.1093/infdis/jir714.

Chéret, A., Nembot, G., Mélard, A., Lascoux, C., Slama, L., Mialhes, P., et al. (2015). Intensive five-drug antiretroviral therapy regimen versus standard triple-drug therapy during primary HIV-1 infection (OPTIPRIM-ANRS 147): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Infect. Dis.* 15, 387–396. doi:10.1016/S1473-3099(15)70021-6.

Chomont, N., DaFonsecaa, S., Vandergeetena, C., Ancuta, P., and Sékaly, R. P. (2011). Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: Keeping memory, keeping HIV. *Curr. Opin. HIV AIDS* 6, 30–36. doi:10.1097/COH.0b013e3283413775.

Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F. A., Yassine-Diab, B., et al. (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* 15, 893–900. doi:10.1038/nm.1972.

Chun, T.-W., Justement, J. S., Pandya, P., Hallahan, C. W., McLaughlin, M., Liu, S., et al. (2002). Relationship between the Size of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Reservoir in Peripheral Blood CD4 + T Cells and CD4 + :CD8 + T Cell Ratios in Aviremic HIV-1–Infected Individuals Receiving Long-Term Highly Active Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.* 185, 1672–1676. doi:10.1086/340521.

Chun, T.-W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A. M., Baseler, M., et al. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 13193–13197. doi:10.1073/pnas.94.24.13193.

Colby, D. J., Trautmann, L., Pinyakorn, S., Leyre, L., Pagliuzza, A., Kroon, E., et al. (2018). Rapid HIV RNA rebound after antiretroviral treatment interruption in persons durably suppressed in Fiebig i acute HIV infection brief-communication. *Nat. Med.* 24, 923–926. doi:10.1038/s41591-018-0026-6.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. (2012). jModelTest2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772. doi:10.1038/nmeth.2109.

de Azevedo, S. S. D., Caetano, D. G., Côrtes, F. H., Teixeira, S. L. M., dos Santos Silva, K., Hoagland, B., et al. (2017). Highly divergent patterns of genetic diversity and evolution in proviral quasispecies from HIV controllers. *Retrovirology* 14, 29. doi:10.1186/s12977-017-0354-5.

Delwart, E. L., Shpaer, E. G., Louwagie, J., McCutchan, F. E., Grez, M., Rübsamen-Waigmann, H., et al. (1993). Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* (80-.). 262, 1257–1261.

Delwart, E., Magierowska, M., Royz, M., Foley, B., Peddada, L., Smith, R., et al. (2002). Homogeneous quasispecies in 16 out of 17 individuals during very early HIV-1 primary infection. *AIDS* 16, 189–195. doi:10.1097/00002030-200201250-00007.

Douek, D. C., Brenchley, J. M., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Okamoto, Y., et al. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 417, 95–98. doi:10.1038/417095a.

Ferreira, A. C. G., Coelho, L. E., Grinsztejn, E., Jesus, C. S. d., Guimarães, M. L., Veloso, V. G., et al. (2017). Transmitted drug resistance in patients with acute/recent HIV infection in Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* 21, 396–401. doi:10.1016/j.bjid.2017.03.013.

Fiebig E.W., Wright D.J., Rawal B.D., Garrett P.E., Schumacher R.T., Peddada L., et al. (2003). Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *AIDS*. 5;17(13):1871-9. doi: 10.1097/01.aids.0000076308.76477.b8

Ghosn, J., Taiwo, B., Seedat, S., Autran, B., and Katlama, C. (2018). Hiv. *Lancet* 6736. doi:10.1016/S0140-6736(18)31311-4.

Gottlieb, G. S., Heath, L., Nickle, D. C., Wong, K. G., Leach, S. E., Jacobs, B., et al. (2008). HIV-1 Variation before Seroconversion in Men Who Have Sex with Men: Analysis of Acute/Early HIV Infection in the Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Infect. Dis.* 197, 1011–1015. doi:10.1086/529206.

Gregori, J., Perales, C., Rodriguez-Frias, F., Esteban, J. I., Quer, J., and Domingo, E. (2016). Viral quasispecies complexity measures. *Virology* 493, 227–237. doi:10.1016/j.virol.2016.03.017.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. doi:10.1093/sysbio/syq010.

Hayashida, T., Tsuchiya, K., Kikuchi, Y., Oka, S., and Gatanaga, H. (2017). Emergence of CXCR4-tropic HIV-1 variants followed by rapid disease progression in hemophiliac slow progressors. *PLoS One* 12, e0177033. doi:10.1371/journal.pone.0177033.

Hecht, F. M., Wang, L., Collier, A., Little, S., Markowitz, M., Margolick, J., et al. (2006). A multicenter observational study of the potential benefits of initiating combination antiretroviral therapy during acute HIV infection. *J. Infect. Dis.* 194, 725–733. doi:10.1086/506616.

Hocqueloux, L., Avettand-Fènoël, V., Jacquot, S., Prazuck, T., Legac, E., Mélard, A., et al. (2013). Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key

to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1169–1178. doi:10.1093/jac/dks533.

Hoeningl, M., Chaillon, A., and Little, S. J. (2016). CD4/CD8 Cell Ratio in Acute HIV Infection and the Impact of Early Antiretroviral Therapy: Table 1. *Clin. Infect. Dis.* 63, 425–426. doi:10.1093/cid/ciw293.

J Buzón, M., Massanella, M., Llibre, J. M., Esteve, A., Dahl, V., Puertas, M. C., et al. (2010). HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat. Med.* 16, 460–465. doi:10.1038/nm.2111.

Josefsson, L., von Stockenstrom, S., Faria, N. R., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., et al. (2013). The HIV-1 reservoir in eight patients on long-term suppressive antiretroviral therapy is stable with few genetic changes over time. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, E4987–E4996. doi:10.1073/pnas.1308313110.

Kearney, M. F., Spindler, J., Shao, W., Yu, S., Anderson, E. M., O’Shea, A., et al. (2014). Lack of Detectable HIV-1 Molecular Evolution during Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog.* 10, e1004010. doi:10.1371/journal.ppat.1004010.

Kearney, M., Maldarelli, F., Shao, W., Margolick, J. B., Daar, E. S., Mellors, J. W., et al. (2009). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Population Genetics and Adaptation in Newly Infected Individuals. *J. Virol.* 83, 2715–2727. doi:10.1128/JVI.01960-08.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199.

Kiselinova, M., Geretti, A. M., Malatinkova, E., Vervisch, K., Beloukas, A., Messiaen, P., et al. (2015). HIV-1 RNA and HIV-1 DNA persistence during suppressive ART with PI-based or nevirapine-based regimens. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 3311–3316. doi:10.1093/jac/dkv250.

Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.

Lengauer, T., Sander, O., Sierra, S., Thielen, A., and Kaiser, R. (2007). Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat. Biotechnol.* 25, 1407–1410. doi:10.1038/nbt1371.

Li, H., Bar, K. J., Wang, S., Decker, J. M., Chen, Y., Sun, C., et al. (2010). High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS Pathog.* 6, e1000890. doi:10.1371/journal.ppat.1000890.

Lorenzo-Redondo, R., Fryer, H. R., Bedford, T., Kim, E. Y., Archer, J., Kosakovsky Pond, S. L., et al. (2016). Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* 530, 51–56. doi:10.1038/nature16933.

Lori, F., Jessen, H., Lieberman, J., Finzi, D., Rosenberg, E., Tinelli, C., et al. (1999). Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection with Hydroxyurea, Didanosine, and a Protease Inhibitor before Seroconversion Is Associated with Normalized Immune Parameters and Limited Viral Reservoir. *J. Infect. Dis.* 180, 1827–1832. doi:10.1086/315113.

Marz, M., Beerenwinkel, N., Drosten, C., Fricke, M., Frishman, D., Hofacker, I. L., et al. (2014). Challenges in RNA virus bioinformatics. *Bioinformatics* 30, 1793–1799. doi:10.1093/bioinformatics/btu105.

Ngo-Giang-Huong, N., Deveau, C., Da Silva, I., Pellegrin, I., Venet, A., Harzic, M., et al. (2001). Proviral HIV-1 DNA in subjects followed since primary HIV-1 infection who suppress plasma viral load after one year of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 15, 665–673. doi:10.1097/00002030-200104130-00001.

Novitsky, V., Wang, R., Margolin, L., Baca, J., Rossenkhan, R., Moyo, S., et al. (2011). Transmission of single and multiple viral variants in primary HIV-1 subtype C infection. *PLoS One* 6. doi:10.1371/journal.pone.0016714.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2017). *Vegan: community ecology package*.

Palmer, S., Kearney, M., Maldarelli, F., Halvas, E. K., Bixby, C. J., Bazmi, H., et al. (2005). Multiple, linked human immunodeficiency virus type 1 drug resistance mutations in treatment-experienced patients are missed by standard genotype analysis. *J. Clin. Microbiol.* 43, 406–13. doi:10.1128/JCM.43.1.406-413.2005.

Palmer, S., Maldarelli, F., Wiegand, A., Bernstein, B., Hanna, G. J., Brun, S. C., et al. (2008). Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 3879–3884. doi:10.1073/pnas.0800050105.

Piketty, C., Weiss, L., Assoumou, L., Burgard, M., Mélard, A., Ragnaud, J. M., et al. (2010). A high HIV DNA level in PBMCs at antiretroviral treatment interruption predicts a

shorter time to treatment resumption, independently of the CD4 nadir. *J. Med. Virol.* 82, 1819–1828. doi:10.1002/jmv.21907.

Pilcher, C. D., Eron, J. J., Galvin, S., Gay, C., and Cohen, M. S. (2004). Acute HIV revisited: New opportunities for treatment and prevention. *J. Clin. Invest.* 113, 937–945. doi:10.1172/JCI21540.

Raymond, S., Delobel, P., Mavigner, M., Cazabat, M., Encinas, S., Souyris, C., et al. (2010). CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* 24, 1. doi:10.1097/QAD.0b013e32833e50bb.

Richman, D. D., Margolis, D. M., Delaney, M., Greene, W. C., Hazuda, D., and Pomerantz, R. J. (2009). The Challenge of Finding a Cure for HIV Infection. *Science* (80-.). 323, 1304–1307. doi:10.1126/science.1165706.

Rieder, P., Joos, B., Scherrer, A. U., Kuster, H., Braun, D., Grube, C., et al. (2011). Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Diversity and Tropism in 145 Patients With Primary HIV-1 Infection. *Clin. Infect. Dis.* 53, 1271–1279. doi:10.1093/cid/cir725.

Rose, P. P., and Korber, B. T. (2000). Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G → A hypermutation. *Bioinformatics* 16, 400–401. doi:10.1093/bioinformatics/16.4.400.

Sáez-Ciri3n, A., Bacchus, C., Hocqueloux, L., Avettand-Fenoel, V., Girault, I., Lecuroux, C., et al. (2013). Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 9. doi:10.1371/journal.ppat.1003211.

Schiffer, V., Deveau, C., Meyer, L., Iraqui, I., Nguyen-Wartel, A., Chaix, M.-L., et al. (2004). Recent changes in the management of primary HIV-1 infection: results from the French PRIMO cohort. *HIV Med.* 5, 326–333. doi:10.1111/j.1468-1293.2004.00231.x.

Sheppard, H. W., Celum, C., Michael, N. L., O'Brien, S., Dean, M., Carrington, M., et al. (2002). HIV-1 Infection in Individuals With the CCR5-Δ32/Δ32 Genotype: Acquisition of Syncytium-Inducing Virus at Seroconversion. *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29, 307–313. doi:10.1097/00126334-200203010-00013.

Strain, M. C., Little, S. J., Daar, E. S., Havlir, D. V., Günthard, H. F., Lam, R. Y., et al. (2005). Effect of Treatment, during Primary Infection, on Establishment and Clearance of Cellular Reservoirs of HIV-1. *J. Infect. Dis.* 191, 1410–1418. doi:10.1086/428777.

Van Zyl, G. U., Katusiime, M. G., Wiegand, A., McManus, W. R., Bale, M. J., Halvas, E. K., et al. (2017). No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *J. Clin. Invest.* 127, 3827–3834. doi:10.1172/JCI94582.

Von Stockenström, S., Odevall, L., Lee, E., Sinclair, E., Bacchetti, P., Killian, M., et al. (2015). Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool during Effective HIV Therapy. *J. Infect. Dis.* 212, 596–607. doi:10.1093/infdis/jiv092.

Wang, N., Li, Y., Han, Y., Xie, J., and Li, T. (2017). HIV sequence diversity during the early phase of infection is associated with HIV DNA reductions during antiretroviral therapy. *J. Med. Virol.* 89, 982–988. doi:10.1002/jmv.24723.

Yerly, S., Kaiser, L., Perneger, T. V., Cone, R. W., Opravil, M., Chave, J. P., et al. (2000). Time of initiation of antiretroviral therapy: impact on HIV-1 viraemia. The Swiss HIV Cohort Study. *AIDS* 14, 243–249. doi:10.1097/00002030-200002180-00006.

Yukl, S. A., Shergill, A. K., McQuaid, K., Gianella, S., Lampiris, H., Hare, C. B., et al. (2010). Effect of raltegravir-containing intensification on HIV burden and T-cell activation in multiple gut sites of HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *AIDS* 24, 2451–2460. doi:10.1097/QAD.0b013e32833ef7bb.

Table 1: Virological characteristics of HIV-1 early-infected individuals.

Patient ID	Fiebig stage	Subtype	Visit ¹	PBMC						Plasma				
				Log ₁₀ HIV DNA ²	<i>env</i> clones	π (%)	H _{SN}	Unique sequences (%)	R5 tropic (%)	Log ₁₀ HIV RNA ³	<i>env</i> haplotypes	π (%)	H _{SN}	R5 tropic (%)
IVA05	II	C	Pre _{ART}	<1.6	14	1.6	0.6	46.6	100	6.9	7	2.7	0.2	100
			M12 _{ART}	<1.6	1	-	0.0	100	100	<1.6	-	-	-	-
IVA09	V	F1	Pre _{ART}	2.8	17	0.5	0.4	26.6	100	4.1	2	1.0	0.0	100
			M12 _{ART}	1.7	15	0	0.0	6.7	100	<1.6	-	-	-	-
IVA17	V	B	Pre _{ART}	4.0	15	0.1	0.3	26.6	100	6.5	2	0.3	0.1	100
			M12 _{ART}	2.5	15	0.5	0.2	26.6	100	<1.6	-	-	-	-
IVA21	V	B	Pre _{ART}	2.9	16	0.6	0.2	25	93.7	4.7	2	0.3	0.1	100
			M12 _{ART}	1.9	14	0	0.1	14.3	100	<1.6	-	-	-	-
IVA32	V	B	Pre _{ART}	3.4	15	0.1	0.3	20	100	6.6	1	-	0.0	100
			M12 _{ART}	2.4	18	0.1	0.3	22.2	100	<1.6	-	-	-	-
IVA36	IV	B	Pre _{ART}	2.9	15	0.1	0.4	21.4	100	4.8	1	-	0.0	100
			M12 _{ART}	1.9	11	0.1	0.3	27.3	100	<1.6	-	-	-	-
IVA37	V	B	Pre _{ART}	3.1	17	0.2	0.6	41.2	100	50	1	-	0.0	100
			M12 _{ART}	2.7	16	0.1	0.2	25	100	<1.6	-	-	-	-
IVA38	IV	C	Pre _{ART}	3.5	18	0.6	0.7	50	100	6.1	8	0.5	0.4	100
			M12 _{ART}	2.4	16	0.2	0.4	37.5	100	<1.6	-	-	-	-
IVA40	IV	B	Pre _{ART}	3.8	17	0.2	0.6	37.5	94.1	7	2	0.3	0.1	100
			M12 _{ART}	2.3	10	0	0.1	20	100	<1.6	-	-	-	-
IVA41	V	F1	Pre _{ART}	2.3	15	0.1	0.2	26.6	100	4.7	2	0.3	0.1	100
			M12 _{ART}	<1.6	13	0.1	0.3	30.8	100	2.7	-	-	-	-

¹Pre_{ART}: before cART start, M12_{ART}: 12 months on suppressive cART; ²expressed as HIV-1 DNA copies/10⁶ PBMC; ³expressed as HIV-1 RNA copies/mL

FIGURES

Fig 1:

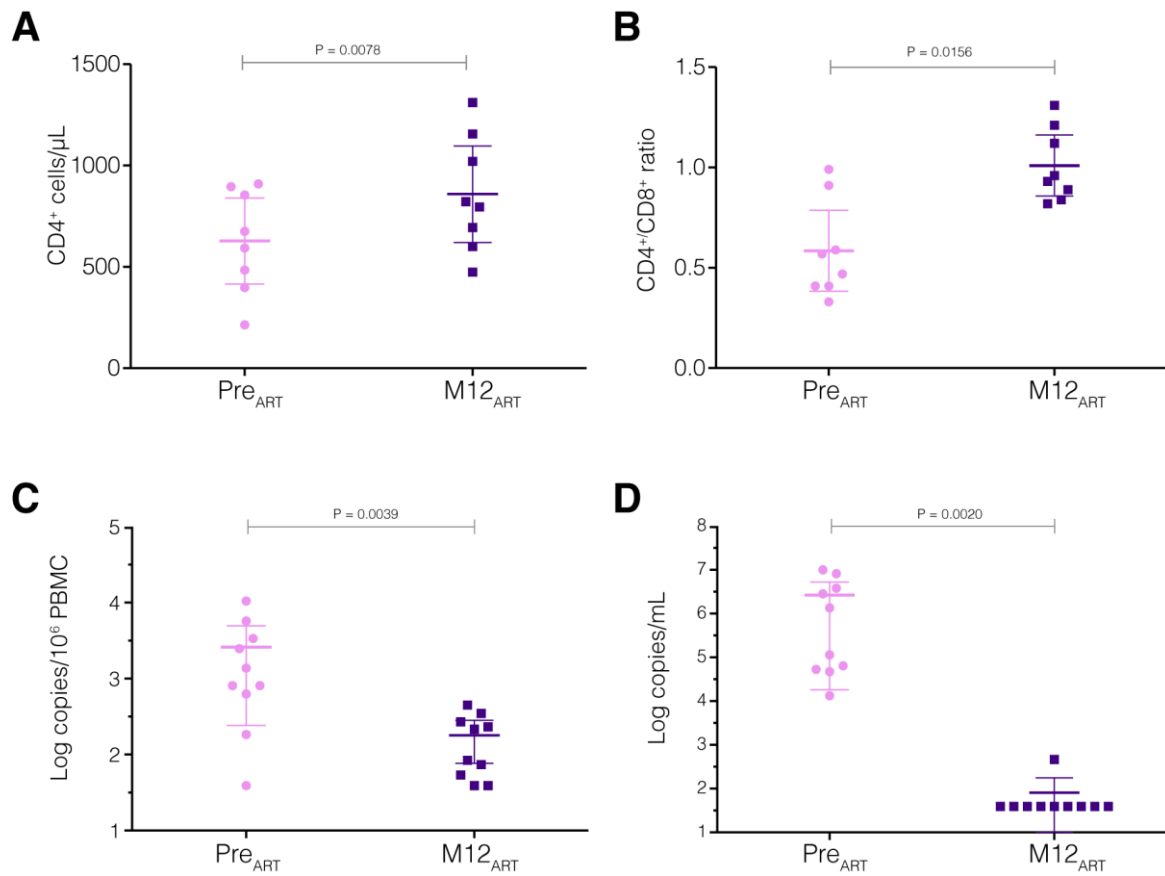


Figure 1 – Immunological and virological measurements before and after cART initiation. CD4⁺ T cell counts (A), CD4⁺/CD8⁺ ratios (B), HIV-1 proviral load in PBMCs (C), and HIV-1 viral load in plasma (D) were measured at Pre_{ART} and M12_{ART} visits (pink circles and blue squares, respectively). P values <0.05 were considered statistically significant.

Fig 2:

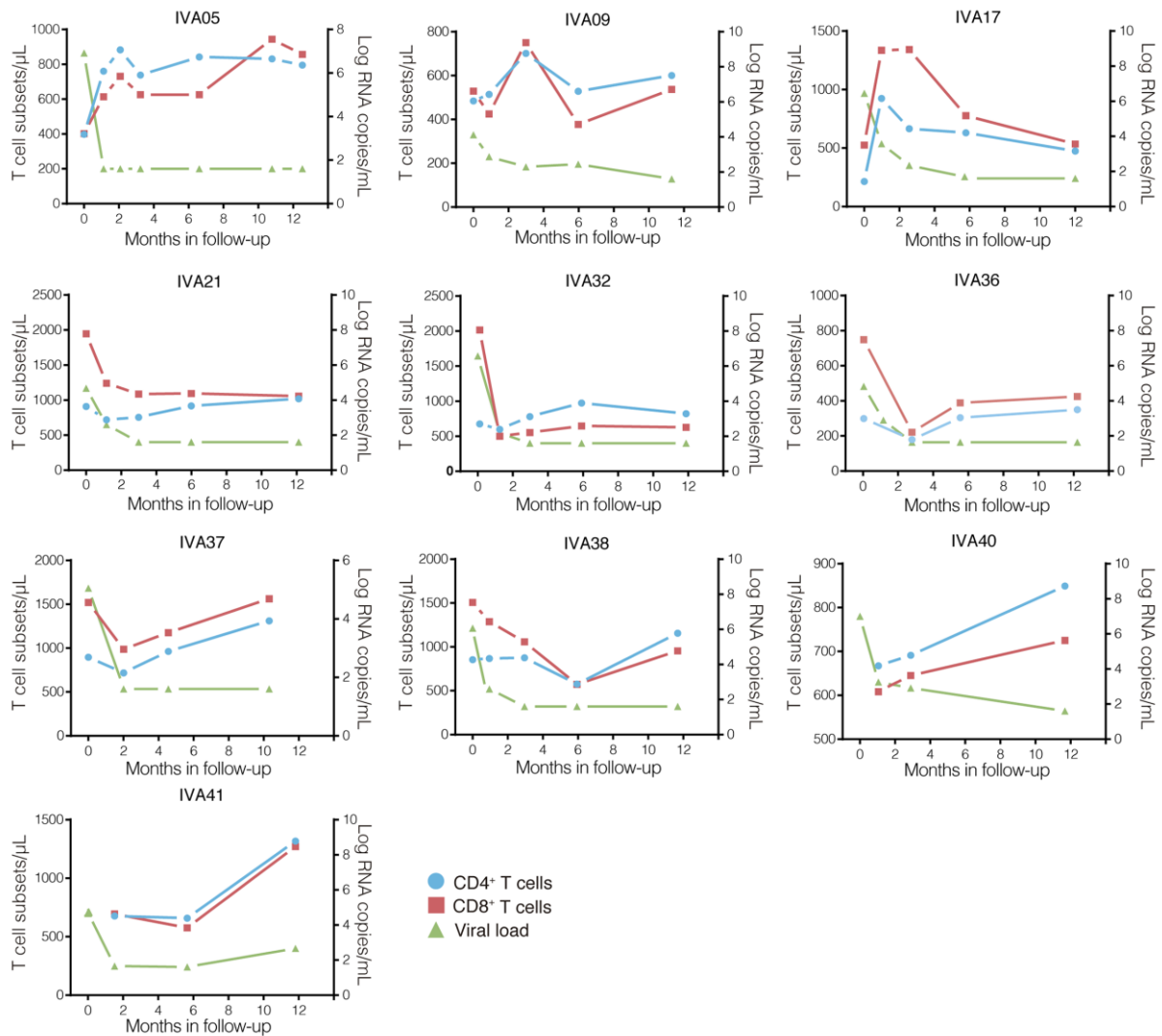


Figure 2 - Clinical follow-up of the ten early-treated individuals. T cell counts (cells/μL; CD4+, blue circles; CD8+, red squares) and plasma RNA viral loads (log copies/mL, green triangles) values over time after cART onset (months) are shown on the left and right Y-axis, respectively. The individuals' identifications are indicated at the top of each graph.

Fig 3:

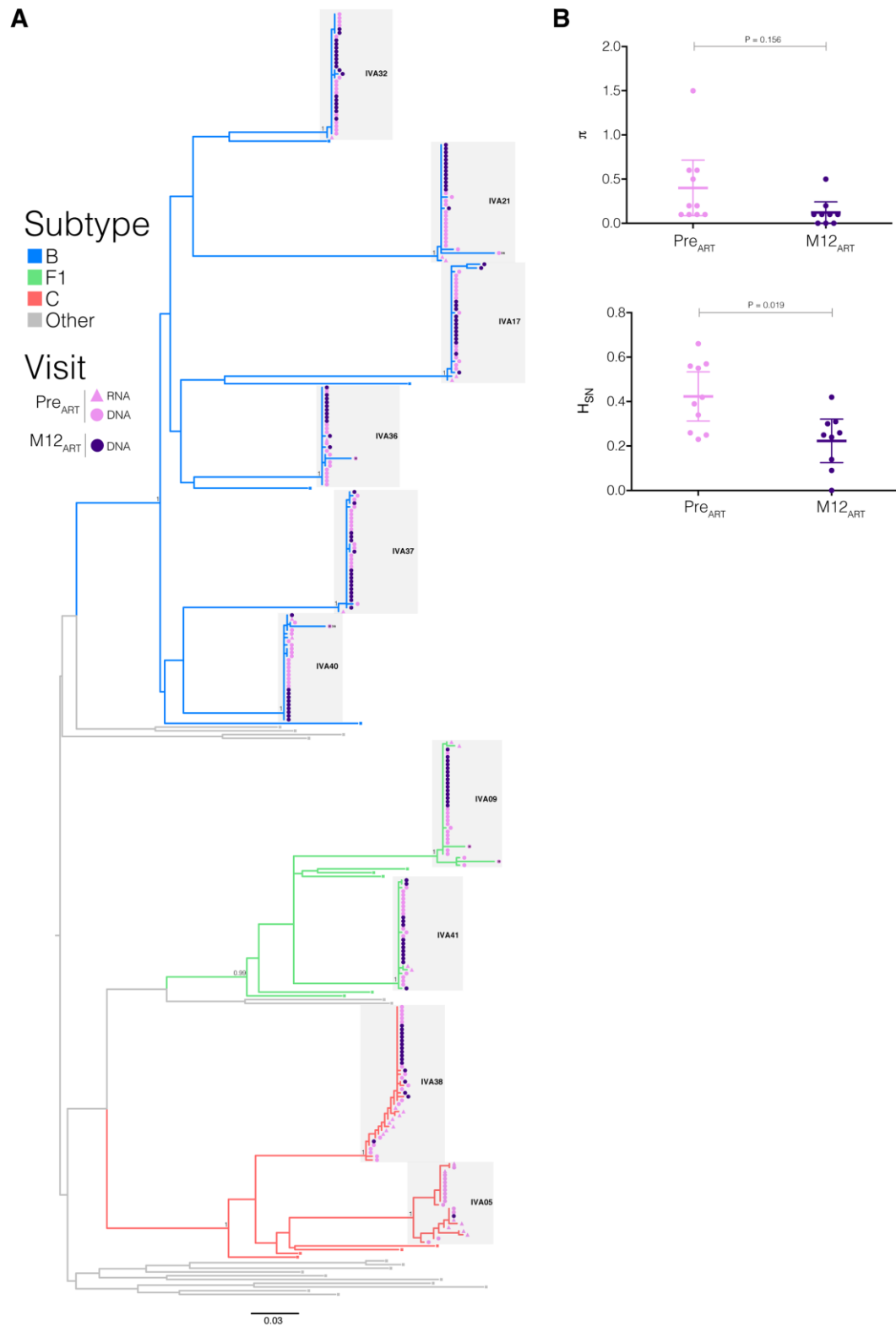


Figure 3 – Impact of early cART initiation on intrahost HIV-1 population diversity. (A) ML phylogenetic tree of the *env* sequences from Pre_{ART} and M12_{ART} visits. Tips' shapes represent the viral compartment (proviral DNA, circles; plasma RNA, triangles) and are color-coded according to the visit (Pre_{ART}, pink; M12_{ART}, purple). The branches' colors agree with the subtype assignment as indicated in the legend. Clusters from each individual are indicated by shaded gray boxes. Branch supports (aLRT-SH) are indicated at key nodes. Tips shapes marked with an “H” indicate the presence of APOBEC3G-mediated G to A hypermutations and X4 labels highlight X4-tropic sequences. Horizontal branch lengths are proportional to the bar at the bottom indicating nucleotide substitutions per site. (B) Mean nucleotide diversity (π) and normalized Shannon entropy (H_{SN}) indices were calculated from the proviral *env* sequences obtained at Pre_{ART} and M12_{ART} visits. Thick and thin lines represent the median and interquartile ranges, respectively. P values <0.05 were considered statistically significant.

Fig 4:

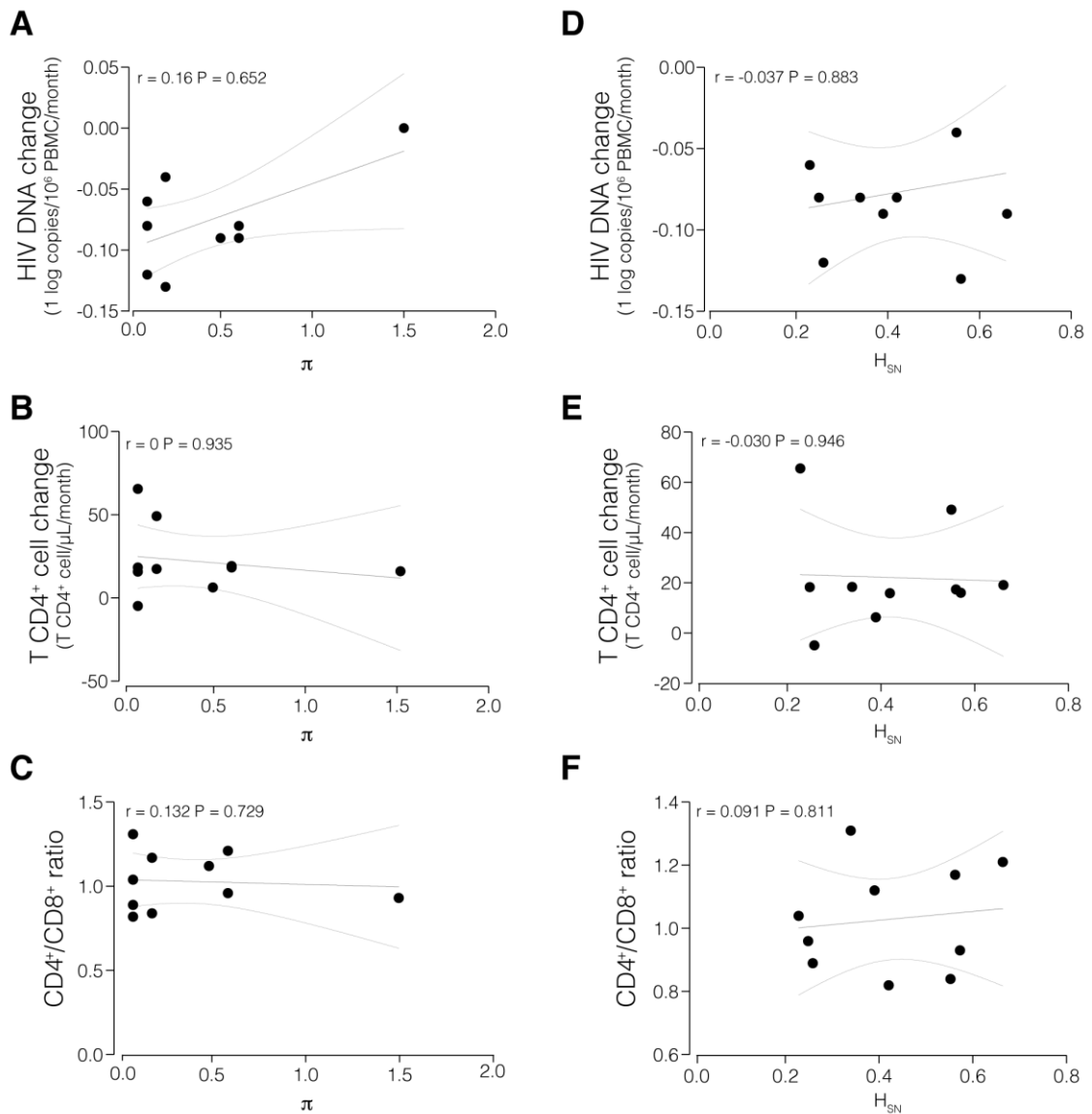


Figure 4 - Correlations between proviral HIV-1 diversity indices and immunological and virological measurements. Mean nucleotide diversity (π) of the proviral population at PreART was compared with HIV decay in PBMCs (A), T CD4⁺ cell change (B), and CD4⁺/CD8⁺ ratio in M12ART (C). Normalized Shannon entropy (H_{SN}) of the proviral population at PreART was compared with HIV decay in PBMCs (D), T CD4⁺ cell change (E), and CD4⁺/CD8⁺ ratio in M12ART (F). P values <0.05 were considered statistically significant.

SUPPLEMENTARY FIGURES

S1:

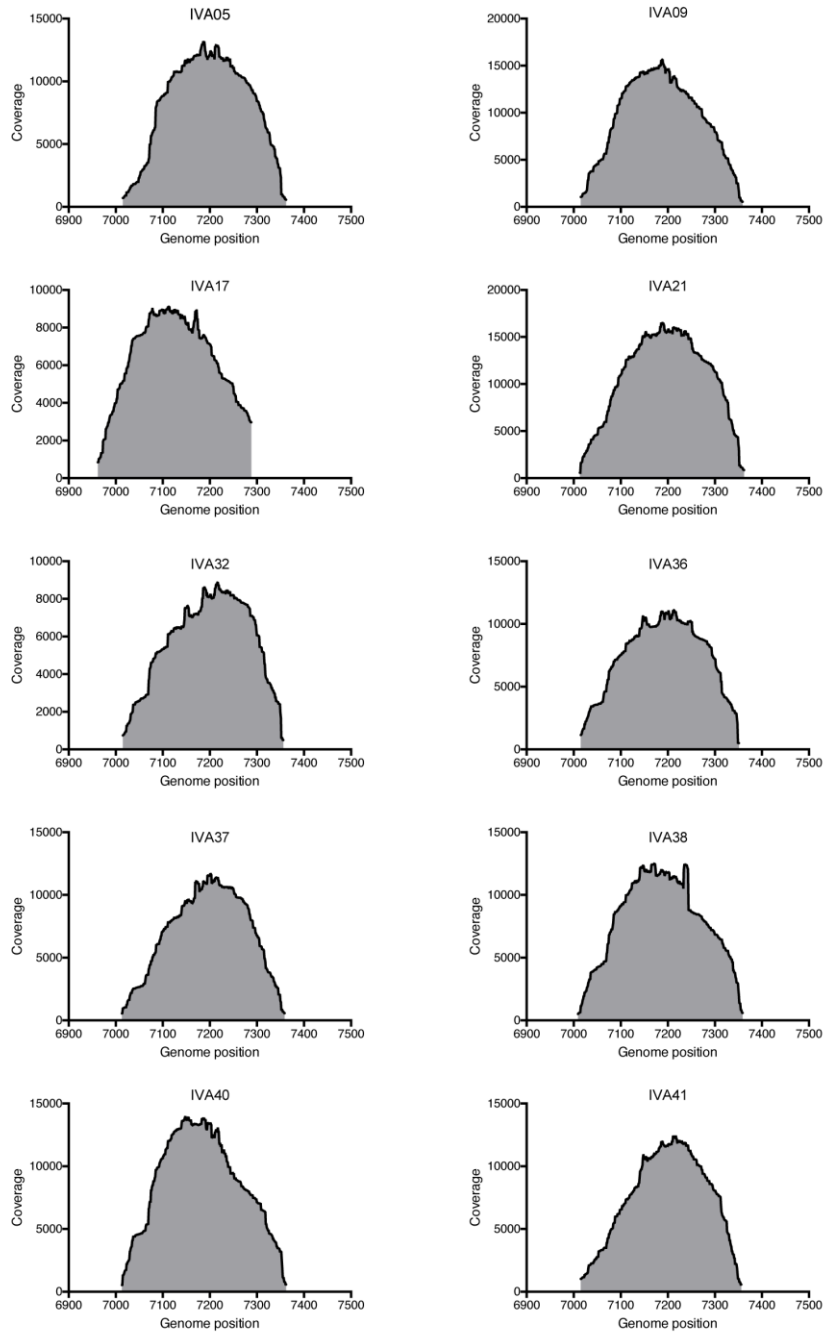


Figure S1 - Sequencing coverage obtained from the NGS of HIV-1 RNA from plasma samples. The coverage depth of each position is indicated on the y-axis while the x-axis indicates the position of the mapped base on the HXB2 reference genome.

S2:

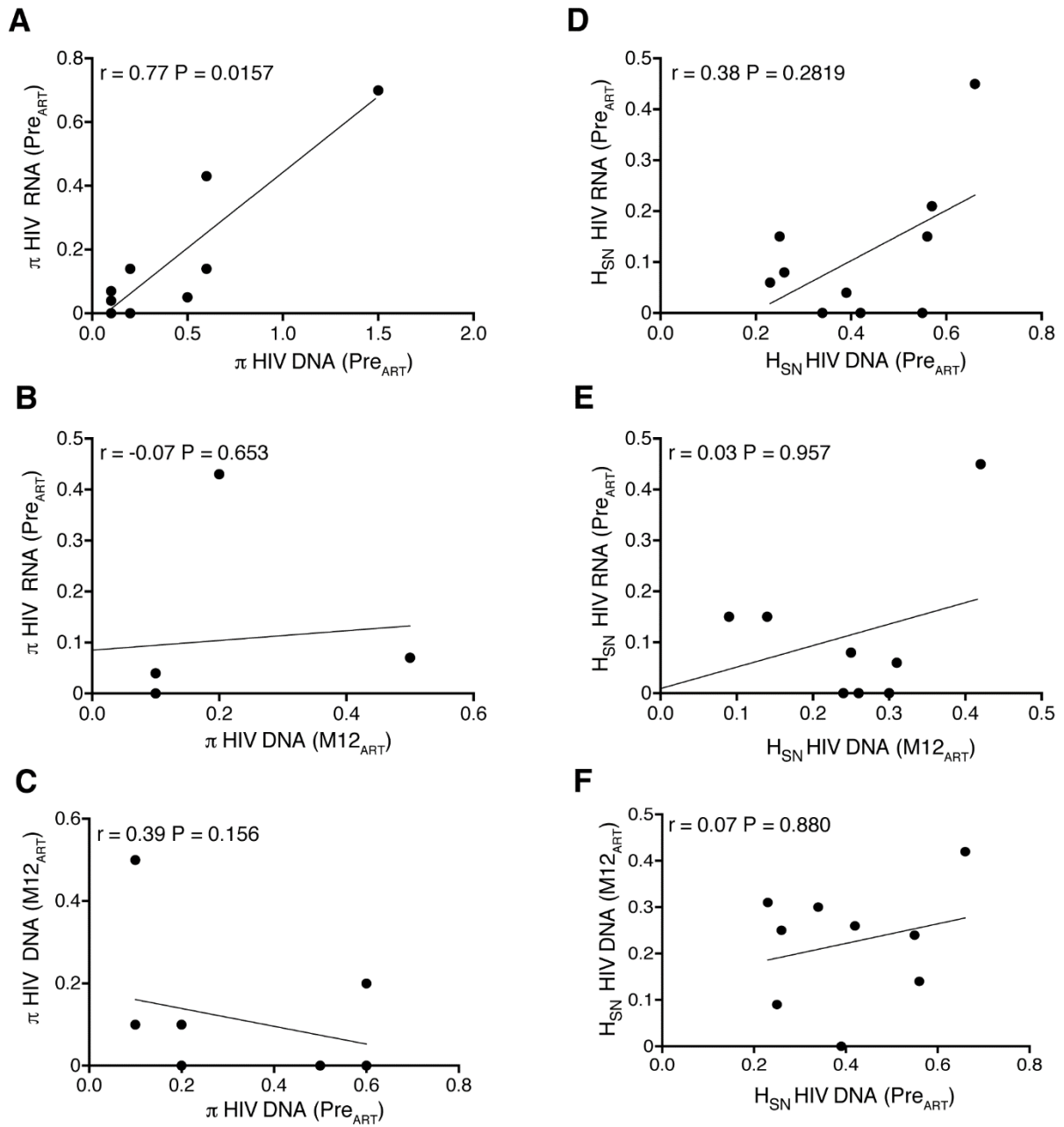


Figure S2 - Correlations between plasmatic and proviral HIV-1 diversity indices. Mean nucleotide diversity (π) of HIV-1 RNA from Pre_{ART} visit was compared to the proviral π obtained in Pre_{ART} (A) and M12_{ART} (B) visits. (C) Correlation of the π of HIV-1 DNA from Pre_{ART} and M12_{ART} visits. Normalized Shannon entropy (H_{SN}) of HIV-1 RNA from Pre_{ART} visit was compared to the proviral H_{SN} obtained in Pre_{ART} (D) and M12_{ART} (E) visits. (F) Correlation of the H_{SN} of HIV-1 DNA from Pre_{ART} and M12_{ART} visits. P and r values were calculated using Spearman correlation test.

4.2 Documento 2 – “Genotypic analysis of HIV-1 V3 env from chronic infected individuals on maraviroc-containing therapy”

Autores: Thaysse Ferreira Leite, Sandra Wagner Cardoso, Walter A. Eyer-Silva, José Henrique Pilotto, Diogo Gama Caetano, Isabel Tavares, Monick Lindenmeyer Guimarães

Periódico: Trabalho submetido à *Aids Research and Therapy* em Maio de 2019.

Resumo:

O Maraviroque (MVQ), um inibidor de entrada, é uma opção terapêutica de resgate no Brasil e é efetivo para vírus R5. A evolução genética do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) sob pressão da terapia contendo MVQ pode levar à seleção de variantes minoritárias X4 preexistentes ou à variantes R5 resistentes, resultando em falha ao tratamento. Assim, a análise das quasispécies virais pode ser relevante para a avaliação da elegibilidade à terapia com MVQ e monitoramento da evolução do vírus. No presente estudo avaliamos as frequências das variantes R5 e X4 do HIV-1 e as possíveis mutações de resistência ao MVQ em pacientes com infecção crônica em multi-experimentados, submetidos à cART contendo MVQ. Oito dos 20 indivíduos recrutados apresentaram vírus R5 pelo sequenciamento convencional da região V3 e foram incluídos no estudo. O sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizado para avaliar as quasispécies virais antes (PRE_{MVC}) e 1 ano após a cART contendo MVQ (POST_{MVC}). Para a subtipagem das amostras e avaliação da evolução viral, uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi inferida. O tropismo genotípico do HIV-1 foi realizado pelo programa geno2pheno com uma taxa de falso positivo de 10% para as seqüências obtidas por sequenciamento convencional, e 5% para as obtidas por NGS. Durante o período estudado, verificamos recuperação imunológica (média de aumento de ~200 células T CD4+) e o controle virológico dos indivíduos estudados, apesar da presença de uma pequena frequência de variantes X4 em PRE_{MVC} (5,4 a 34,4%) em 3/8 indivíduos. Em dois desses, as variantes X4 dominaram na visita POST_{MVC}, apesar

da supressão do RNA viral ao longo do estudo. De maneira geral, a terapia contendo MVQ foi efetiva para a maioria dos indivíduos estudados e nossos achados demonstraram que o uso de NGS antes e durante a terapia contendo MVQ é importante no monitoramento de quasispécies X4-trópicas.

Genotypic analysis of HIV-1 V3 *env* from chronic infected individuals on maraviroc-containing therapy

Thaysse Ferreira Leite^{1*}, Sandra Wagner Cardoso², Walter A. Eyer-Silva³, José Henrique Pilotto^{1,4}, Diogo Gama Caetano¹, Isabel Tavares², Monick Lindenmeyer Guimarães¹

¹Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratório de Pesquisa Clínica em DST e AIDS, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Hospital Geral de Nova Iguaçu, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding author:

Thaysse Ferreira Leite

Laboratório de AIDS & Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Phone: +55 21 99886 7383

Email: leitethaysse@gmail.com

Abstract

Background: Maraviroc (MVC), an entry inhibitor, is a therapeutic option for salvage therapy in Brazilian multi-experienced individuals and is useful for R5-tropic viruses. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genetic evolution under MVC-containing therapy can lead to selection of pre-existing minority X4-tropic variants or R5-resistant strains, resulting in treatment failure. Thus, quasispecies analyses are relevant for assessing eligibility for MVC therapy and monitoring virus susceptibility and evolution. Here, we examined the frequencies of R5 and X4 HIV-1 variants and possible MVC mutations resistance in chronic treatment-experienced individuals undergoing MVC-containing antiretroviral therapy.

Methods: HIV-1 chronic treatment-experienced individuals with R5 viruses harboring the proviral V3-*env* bulk sequence were selected. Next-generation sequencing (NGS) was performed to assess viral quasispecies before (PRE_{MVC}) and after 1 year of initiation of an MVC-containing antiretroviral therapy (POST_{MVC}). The maximum-likelihood phylogenetic tree was inferred for subtyping and evaluation of viral evolution. HIV-1 tropism was predicted by geno2pheno with a false positive ratio of 10% to bulk and 5% to NGS sequences.

Results: After MVC initiation, we found slight immunological recovery with a average increase of ~200 CD4⁺ T cells/mm³ and the maintenance/suppression of HIV-1 RNA during the study period, depicting the MVC-containing therapy efficacy. X4 variants were detected in three of eight (37.5%) individuals at PRE_{MVC} in a frequency of 5.4–34.4%. In two patients, these X4 variants were dominant at the POST_{MVC} visit, although the viral load was not detectable in these patients.

Conclusions: MVC-containing therapy was effective for most of the studied individuals. Overall, our findings demonstrated that use of viral quasispecies tropism assays by NGS prior to and during MVC-containing therapy is important for monitoring the selection of X4 tropic viruses during treatment.

Keywords: HIV-1 tropism, maraviroc, next-generation sequencing, chronic HIV-1 infection, quasispecies

Introduction

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) enters target cells through interactions of its envelope glycoprotein gp120 and gp41 subunits with gp120-host cell CD4 receptors, followed by conformational changes to mediate interactions with coreceptors, e.g., either C-C chemokine receptor 5 (CCR5) or C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4); this initiates the membrane fusion process catalyzed by gp41 in the target cell membrane (1). These entry steps are important targets for antiretroviral therapy, mainly inhibition of the gp120-CCR5 coreceptor by maraviroc (MVC) (2). In the absence of combined antiretroviral therapy (cART), HIV-1 viruses that use the CCR5 coreceptor (R5-tropic) predominate in the early stages of HIV-1 subtype B infection, and approximately 40% of these viruses switch to the CXCR4 (X4-tropic) phenotype later during chronic phase of the infection (3). The switch from R5 to X4 phenotypes is associated with a decrease in CD4⁺ T cells and faster clinical progression to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) (4). The high HIV-1 mutation rate and rapid turnover of the viral population, combined with the observations that only a few amino acid changes are needed for the switch, suggest that X4 viruses can emerge anytime during the infection (5). The exact mechanisms mediating the coreceptor switch and whether emergence of X4-viruses is a cause and/or consequence of AIDS progression are still unclear.

Determining whether individuals carrying certain viral variants are prone to its maintenance or switching to coreceptor use will improve our understanding of the evolution and pathogenesis of HIV-1. Although the use of MVC-containing regimens in first-line treatment is acceptable under special situations in many countries, in Brazil, MVC-containing therapy is considered a salvage therapy, with almost all MVC-treated patients having previously failed the current standard cART (6). Because MVC has an excellent safety profile, which can decrease treatment toxicity and thus possibly improve adherence, MVC has also been used in individuals with suppressed viremia in order to stimulate recovery of the immune system (7,8). However, this drug is not highly effective against X4 viruses, and characterization of viral tropism is essential before and during MVC use. HIV-1 V3-genotyping assays have been widely used. In general, bulk sequencing is the conventional method used; however, the use of next-generation sequencing (NGS) increases the possibility of detecting R5/X4 minority variants.

The emergence of MVC resistance could be associated with the spread of a pre-existing minority of X4 variants during MVC use (9–11) or could result from the emergence of R5 resistance mutations, ultimately leading to treatment failure (5,12). Some of these R5 mutations within the V3 loop were verified in vitro (21T and 28T) and in vivo (11S+26V, 18G+22T, 19S+26V, 20F+21I, 20F+25D+26V, and G15_P16INSG+25D) (5,12,13).

In this study, we aimed to examine the frequencies of R5 and X4 HIV-1 quasispecies and possible MVC resistance mutations in proviral DNA obtained from chronic treatment-experienced individuals undergoing MVC-containing antiretroviral therapy.

Materials and Methods

Patient characteristics

HIV-1 chronic treatment-experienced individuals (n=20) from Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI-FIOCRUZ), Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (UNIRIO), and Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI) recruited between 2015 and 2017. These patients were indicated for cART containing MVC due to virological failure (HIV-1 RNA >1,000 copies/mL) under the current antiretroviral regimen (n=9), or due to low adherence to therapy/with the goal of immunological recovery (n=11). In order to verify whether these individuals were eligible to receive MVC-containing therapy, HIV-1 V3-env genotyping by bulk sequencing was carried out. Buffy coat and plasma samples were obtained from the patients during the baseline visit (PRE_{MVC}) and 9–15 months after MVC initiation (POST_{MVC}).

CD4+ T cell counts and HIV-1 RNA quantification

Peripheral blood CD4+ cell counts were determined by flow cytometry using a MultiTest TruCount-kit and MultiSet software on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA). Abbot Real-Time HIV-1 assays were used to measure HIV-1 RNA in plasma with a lower limit of detection of 40 copies/mL (Abbott Laboratories, Germany).

HIV-1 DNA bulk sequencing

Proviral DNAs from Pre_{MVC} and POST_{MVC} were extracted from buffy coat samples using a QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions. HIV-1 C2-V3 env amplicons were obtained through nested polymerase chain reaction (PCR) using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA) as described elsewhere (14). Amplicons were sequenced using a BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences obtained were assembled and edited using SeqMan 7.0 software (DNASTAR Inc., Madison, WI, USA).

Reconstruction of HIV-1 env DNA haplotypes from NGS data

The resulting amplicons of the C2-V3 env described above, obtained at PRE_{MVC} and POST_{MVC} visits, were used for library preparation using a Nextera XT DNA Library Prep Kit with unique barcodes from a Nextera XT Index Kit (Illumina, USA), following the manufacturer's protocols. DNA sequencing was performed on a MiSeq instrument using MiSeq Reagent Nano Kit, v2 with 500 cycles (Illumina). Geneious v11.1.4 was used to trim demultiplexed reads for removal of adaptors and low-quality bases (first 10 bases and bases with Q < 25), remove short reads (< 100 bp), and merge overlapping pair ended reads. Reads obtained were then mapped against the gp120 sequence from HXB2 (GenBank accession: K03455) with Geneious, using medium sensitivity and five iterations with the Geneious mapping algorithm. Alignment regions with at least 1000x coverage were applied for haplotype reconstruction using QuasiRecomb 1.2 with the flag "-conservative" to increase specificity. Only haplotypes with frequencies of greater than or equal to 1% were used in further analysis.

HIV-1 subtyping and phylogenetic analyses

Bulk and haplotype sequences were aligned with HIV-1 reference sequences from the Los Alamos database (<http://hiv-web.lanl.gov>) using the ClustalW algorithm implemented in MEGA 6 and were manually edited. The final C2-V3 env alignment covered positions 6840–7372 related to the HXB2 genome. Maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed using the PhyML 3.0 program. The

approximate likelihood-ratio test (aLRT) was used to estimate the confidence of ML tree branching.

Genotypic prediction of coreceptor usage

Coreceptor usage was predicted based on the HIV-1 V3-*env* amino acid sequence through the Geno2pheno algorithm (available at <http://coreceptor.geno2pheno.org>). A false-positive rate (FPR) of 10% was used for DNA bulk sequences, as recommended by the European Consensus Group on clinical management of HIV-1 tropism at Geno2Pheno website; for NGS sequences, an FPR of 5% was used to classify X4-tropic variants (15).

R5-resistance mutations and polymorphisms

The R5 resistance mutations investigated within the V3 loop were: 21T, 28T, 11S+26V, 18G+22T, 19S+26V, 20F+21I, 20F+25D+26V and G15+P16INSG+25D (5,11,13,16).

Statistical data analyses

Statistical analyses were performed to compare CD4+ T cells and viral load from the two visits using the Wilcoxon test from GraphPad Prism v6 (Prism Software, USA). P values <0.05 were considered statistically significant.

Sequence availability

Bulk HIV-1 C2-V3 *env* sequences were submitted to GenBank, and their access numbers are MK306273-MK306288. The NGS data have been submitted to the NCBI BioProject database under submission number SUB4926293.

Ethics

The Ethical Review Boards of INI, HUGG, and HGNI clinical research sites approved the study (Ethics Committee CAE: 43234015.0.0000.5248), and written informed consent was obtained from all participants.

Results

Patient characteristics

Among 20 screened HIV-infected antiretroviral-experienced individuals, eight carried R5 majority virus and therefore were included in the analysis. The median age was 56 years (interquartile range [IQR]: 17–66 years), and most patients were male (62.5%) and heterosexual (62.5%). The median HIV1 infection diagnosis time was 19 years (IQR: 7–26 years) at PRE_{MVC}. The cART regimen co-administered with MVC varied among individuals and was described in Table 1. The median time between baseline samples and MVC-containing regimen was 45 days (IQR: 30-90 days). HIV-1 subtype B was detected at the envelope C2-V3 region in six individuals, and two were sub-subtype F1 (Table 1).

From the four individuals who were virologically suppressed (< 1.6 log HIV RNA copies/mL) at PRE_{MVC}, three (MVC11, MVC15, and MVC18) sustained this status during the MVC regimen (Figure 1). For those with detectable HIV RNA at baseline (n = 4; ranging from 3.2 to 5.5 log₁₀ copies/mL), the median time to achieve viral suppression was approximately 5 months (IQR: 4–6 months) after MVC regimen initiation. One individual (MVC04), had three consecutively detectable HIV-RNA measures (1, 3, and 6 months), probably due to low treatment adherence and high frequency of X4-tropic variants (Figure 1).

At PRE_{MVC}, the median CD4+ T cell count was 404 cells/mm³ (IQR: 23–1031), and at POST_{MVC}, we observed a slight immunological recovery with a median CD4+ T cell count of 611 cells/mm³ (IQR: 257–1031). This represented an average gain of ~200 CD4+ T cells/mm³ (IQR: 404–610.5; p = 0.1094) after a median of 12 months (IQR: 9–15) of treatment. Nevertheless, MVC15 was the only patient to show CD4+ T cell decay (PRE_{MVC}: 953 to POST_{MVC}: 693 cells/mm³) during follow-up, despite of the maintenance of HIV-1 RNA suppression.

HIV-1 genotyping coreceptor usage

In order to verify the presence of R5/X4 quasispecies in the studied individuals, we performed NGS in PCR-amplified HIV-1 samples collected at both visits. The median coverage obtained per sample was 13,929.5 (IQR: 8,390.5–19,413) reads per base. For each sample, 1–22 HIV-1 *env* haplotypes were reconstructed. All sequences branched together in highly supported monophyletic

clusters ($aLRT \geq 0.97$) by patient (Figure 2), discarding possible events of contamination. We also verified clusterization according to FPR values (Figure 2), suggesting the influence of genetic characteristics, such as amino acid signatures and net charge.

The use of NGS allowed us to detect X4-tropic variants at the PRE_{MVC} visit in three individuals (MVC04, MVC18, and MVC15; Table 1). MVC04 exhibited an X4-tropic small frequency of 5.4% (FPR 1.3%) at PRE_{MVC} , which became 100% for X4 sequences at $POST_{MVC}$ (Table 1). In addition, we verified the presence of two R5-tropic variants at PRE_{MVC} , one with a frequency of 31% (FPR 74%) and the other at a rate of 54% with a low FPR cutoff (9%). MVC18 showed a similar profile, although the frequency of X4 variants was higher (34.4%) at PRE_{MVC} and increased to 99% at $POST_{MVC}$ (Table 1). The ML tree showed that the dominant X4 detected at $POST_{MVC}$ seemed to have originated from those detected at baseline. The minority R5 variant detected (FPR 16.4%) at $POST_{MVC}$ appeared to be an R5 to X4 intermediary sequence, as depicted according to their branching together with the X4 variants at PRE_{MVC} (Figure 2). Thus, the MVC suspension was required for both individuals.

MVC15 displayed a low frequency (7.4%) of the X4 viral population at PRE_{MVC} (Table 1) and showed 100% R5-tropic virus at $POST_{MVC}$. Despite observing several FPR cutoff levels in MVC15, ranging from 2.7% to 29.1% at PRE_{MVC} , just one quasispecies with 18.3 scores was selected to make up the $POST_{MVC}$ viral population (Table 1; Figure 2).

Five individuals (MVC05, MVC06, MVC08, MVC11, and MVC19) harbored only R5-tropic viruses with high FPR scores during the follow-up period.

R5-resistance mutations and polymorphisms

R5 resistance mutations (11) were detected at PRE_{MVC} in two individuals: MVC04 (11S+26V, 19S+26V, 20F+25D+26V) and MVC18 (4L). These patients also presented X4 variants at this visit.

Other amino acids substitutions in the *V3-env* sequence were verified when PRE_{MVC} and $POST_{MVC}$ sequences were compared in some individuals that presented only R5-tropic variants during the follow-up period, including MVC05 (5S, 15A, 26V), MVC06 (13N), and MVC08 (13P/H, 15R, 17K, 28K) from HIV-1 subtype B and

MVC11 (13R/S, 18Q, 29N) and MVC19 (10R, 13Q, 18R, 32K) from sub-subtype F1 (Figure3).

Discussion

In the current study, we provided a detailed analysis of coreceptor usage evolution using NGS during MVC-containing therapy in eight antiretroviral treatment-experienced individuals with chronic HIV-1 infection.

MVC has the ability to restore CD4+ T cells and reduce possible persistent viral replication in anatomical sanctuaries (17), regardless of its use in cART or alone (2,7,18). In this study, we observed an increase in CD4+ T cells in most individuals at POST_{MVC}, as previously reported (19,20). All individuals presented HIV-1 viral load suppression at POST_{MVC}, independent of their virologic status at PRE_{MVC}, similar to the results of a previous study (21), indicating that MVC-containing therapy induces an efficient decrease in viral load.

In clinical practice, the prediction of viral tropism is obtained through V3-env genotyping by bulk sequencing. However, high-throughput NGS allows identification of minority variants and determination of the frequency of R5/X4 viral quasispecies. Based on this analysis, distinct R5 and X4 intrahost variants were detected in different proportions. At PRE_{MVC}, we identified minor and major X4 strain frequencies, which could affect the eligibility of these patients for MVC-containing therapy if NGS was implemented during pretreatment genotyping. However, previous studies have reported the successful use of MVC for achieving better immunological recovery, even in individuals having a small proportion of X4 or dual tropic viruses (8,22).

Geno2pheno is the most widely used algorithm for genotypic tropism prediction and attributes a FPR value to a given V3 sequence defining the probability of incorrectly classifying an R5 virus as X4 (23). Herein, we used the FPR threshold of 5% for NGS, as previously described (15,24). According to the MOTIVATE clinical trial and other studies (24,25), FPR values between 2% and 5.75% in NGS sequences were associated with a loss of MVC antiviral activity, resulting in their classification as X4 variants. Taken together, these results indicated that the use of NGS in clinical practice would be meaningful for the detection of minor X4 variants; however, further studies are needed to validate the choice of the FPR value for tropism prediction.

From the three individuals (MVC 04, 15 and 18) who presented a proportion X4 variants at PRE_{MVC} in our study, antiretroviral therapy containing MVC was not able to select X4 strains, except for one, MVC15, corroborating previous findings (26). For the other two individuals, MVC therapy had to be discontinued. In MVC18, a substantial proportion of the X4 variant at PRE_{MVC} dominated the proviral reservoir at POST_{MVC}, although an undetectable viral load was maintained. MVC04 reported treatment adherence problems and had instances of viral load detected during follow-up; the minority X4 variant detected at PRE_{MVC} became the predominant variant at POST_{MVC}. A previous study showed that minority X4 variants could be selected by MVC (10) as verified for MVC15 and MVC18, however, we were not able to confirm this phenomenon for MVC04, probably because of the patient's poor adherence to the treatment. In both individuals a suppressed HIV-1 RNA was observed at POST_{MVC}, probably due to the efficacy of the other drugs of MVC combined therapy.

MVC resistance has been described in individuals receiving MVC therapy and harboring R5-tropic variants carrying mutations in gp120. In vitro studies have also corroborated these findings (5,11,27). Surprisingly, we identified these mutations in two individuals at PRE_{MVC}, suggesting that this result could be associated with the high envelope diversity because MVC-related transmitted resistance mutations are rare in Brazil due to the infrequent and recent use of MVC. Nevertheless, we observed other single amino acid changes in all patients who harbored R5-tropic variants during follow-up, as described in several studies (11,28,29). These polymorphisms were absent prior to MVC initiation and likely corresponded to viral evolution related to the use of MVC-bound CCR5 (30). From these findings, we identified polymorphisms at V3 loop position 13 in most individuals, suggesting selection pressure arising from MVC, as previously described by Recordon-Pinson et al. (31).

In conclusion, our findings suggested that cART containing MVC as rescue was able to suppress HIV-1 viral loads and increase CD4+ T-cell counts. We also found that the presence of X4 variants at PRE_{MVC} could lead to the selection of this variant leading to MVC discontinuation. Moreover, we detected an increase in MVC-related polymorphisms in R5 strains, despite residual viral replication. These findings supported the use of viral quasispecies tropism determination by NGS prior to and during MVC-containing therapy in settings where MVC regimens are broadly

available. However, further studies with larger sample sizes and longer follow-up times, aiming to trace the dynamics of R5/X4 variants and to better characterize resistance mutations under MVC-containing therapy pressure, will be necessary to confirm our findings.

Acknowledgments

We acknowledge Dr. Mariza Gonçalves Morgado for review and suggestions. We thank Plataforma de Sequenciamento de Ácidos Nucléicos de Nova Geração da FIOCRUZ/RJ for assistance in preparing the sequencing libraries. We also thank Departamento de genética da Universidade Federal do Rio de Janeiro for use of the Illumina MiSeq instrument.

Author's contributions

MLG and TFL designed the study, performed the analysis and wrote the manuscript. TCL performed the experiments. SWC, JHP, WE, IT participated in patient recruitment. DGC and TCL performed the NGS analysis. All authors participated in the critical revision of the manuscript and approved this version of the manuscript.

Funding

MLG and DGC are recipients of fellowships from CNPq. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Deng HK, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;
2. Hardy WD, Gulick RM, Mayer H, Fätkenheuer G, Nelson M, Heera J, et al. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment-experienced

patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;

3. Thielen A, Sichtig N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, Lengauer T. Improved prediction of HIV-1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J Infect Dis* [Internet]. 2010;202(9):1435–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20874088>

4. Weiser B, Philpott S, Klimkait T, Burger H, Kitchen C, Burgisser P, et al. HIV-1 coreceptor usage and CXCR4-specific viral load predict clinical disease progression during combination antiretroviral therapy. *Aids* [Internet]. 2008;22(4):469–79. Available from: %3CGo

5. Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, et al. Reduced Maximal Inhibition in Phenotypic Susceptibility Assays Indicates that Viral Strains Resistant to the CCR5 Antagonist Maraviroc Utilize Inhibitor-Bound Receptor for Entry. *J Virol*. 2007;

6. Ministério da Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. 2018.

7. Wasmuth J-C, Rockstroh JK, Hardy WD. Drug safety evaluation of maraviroc for the treatment of HIV infection. *Expert Opin Drug Saf*. 2012;

8. Cuzin L, Trabelsi S, Delobel P, Barbuat C, Reynes J, Allavena C, et al. Maraviroc intensification of stable antiviral therapy in HIV-1-infected patients with poor immune restoration: MARIMUNO-ANRS 145 study. In: *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2012.

9. Fätkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AIM, Lampiris H, et al. Subgroup Analyses of Maraviroc in Previously Treated R5 HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2008;

10. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, et al. Emergence of CXCR4-Using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-Infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* [Internet]. 2006;80(10):4909–20. Available from: %3CGo

11. Seclén E, del Mar González M, Lapaz M, Rodríguez C, del Romero J, Aguilera A, et al. Primary resistance to maraviroc in a large set of R5-V3 viral sequences from HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother.* 2010;
12. Delobel P, Cazabat M, Saliou A, Loiseau C, Coassin L, Raymond S, et al. Primary resistance of CCR5-tropic HIV-1 to maraviroc cannot be predicted by the V3 sequence. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(11):2506–14.
13. Swenson LC, Chui CKS, Brumme CJ, Chan D, Woods CK, Mo T, et al. Genotypic analysis of the V3 region of HIV from virologic nonresponders to maraviroc-containing regimens reveals distinct patterns of failure. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;
14. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J, McCutchan FE, Grez M, Rübsamen-Waigmann H, et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science (80-) [Internet].* 1993;262(5137):1257–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8235655>
15. Poveda E, Paredes R, Moreno S, Alcamí J, Córdoba J, Delgado R, et al. Update on clinical and methodological recommendations for genotypic determination of HIV tropism to guide the usage of CCR5 antagonists. *AIDS Reviews.* 2012.
16. Delobel P, Cazabat M, Saliou A, Loiseau C, Coassin L, Raymond S, et al. Primary resistance of CCR5-tropic HIV-1 to maraviroc cannot be predicted by the V3 sequence. *J Antimicrob Chemother.* 2013;
17. Corbeau P, Reynes J. CCR5 antagonism in HIV infection: Ways, effects, and side effects. *AIDS.* 2009.
18. Cascajero A, Rastrojo A, Díez-Fuertes F, Hernández-Novoa B, Aguado B, Moreno S, et al. Deep-Sequencing Analysis of the Dynamics of HIV-1 Quasiespecies in Naive Patients during a Short Exposure to Maraviroc. *J Virol [Internet].* 2018;(March):JVI.00390-18. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00390-18>
19. Reuter S, Braken P, Jensen B, Sierra-Aragon S, Oette M, Balduin M, et al. Maraviroc in treatment-experienced patients with HIV-1 infection - experience from routine clinical practice. *Eur J Med Res.* 2010;

20. Puertas MC, Massanella M, Llibre JM, Ballester M, Buzon MJ, Ouchi D, et al. Intensification of a raltegravir-based regimen with maraviroc in early HIV-1 infection. *AIDS*. 2014;
21. Babiker ZOE, Douthwaite ST, Collier LE, Pennell A, Uriel AJ, Wilkins E. Real-life outcomes of Maraviroc-based regimens in HIV-1-infected individuals. *J Int Assoc Provid AIDS Care*. 2013;
22. Symons J, van Lelyveld SFL, Hoepelman AIM, van Ham PM, de Jong D, Wensing AMJ, et al. Maraviroc is able to inhibit dual-R5 viruses in a dual/mixed HIV-1-infected patient. *J Antimicrob Chemother*. 2011;
23. Vandekerckhove LPR, Wensing AMJ, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011.
24. McGovern RA, Thielen A, Mo T, Dong W, Woods CK, Chapman D, et al. Population-based V3 genotypic tropism assay: A retrospective analysis using screening samples from the A4001029 and MOTIVATE studies. *AIDS*. 2010;
25. Swenson LC, Mo T, Dong WWY, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, et al. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: Application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis*. 2011;
26. Raymond S, Nicot F, Carcenac R, Jeanne N, Cazabat M, Requena M, et al. No selection of CXCR4-using variants in cell reservoirs of dual-mixed HIV-1-infected patients on suppressive maraviroc therapy. *Aids*. 2016;30(6):965–8.
27. Lewis M, Mori J, Simpson P. Changes in V3 loop sequence associated with failure of maraviroc treatment in patients enrolled in the MOTIVATE 1 and 2 trials. In *Abstracts of the Fifteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections*, Boston, 2008; 2008. Available from: www.retroconference.org/2008
28. Soulié C, Malet I, Lambert-Niclot S, Tubiana R, Thévenin M, Simon A, et al. Primary genotypic resistance of HIV-1 to CCR5 antagonists in CCR5 antagonist treatment-naïve patients. *AIDS*. 2008;
29. Saracino A, Monno L, Brindicci G, Trillo G, Altamura M, Punzi G, et al. Are the proposed env mutations actually associated with resistance to maraviroc? *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2010.
30. Tilton JC, Wilen CB, Didigu CA, Sinha R, Harrison JE, Agrawal-Gamse C, et al. A Maraviroc-Resistant HIV-1 with Narrow Cross-Resistance to Other CCR5

Antagonists Depends on both N-Terminal and Extracellular Loop Domains of Drug-Bound CCR5. *J Virol.* 2010;

31. Recordon-Pinson P, Raymond S, Marcelin P, Marcelin AG, Soulie C, Descamps D, et al. HIV-1 dynamics and coreceptor usage in maraviroc-treated patients with ongoing replication. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(2):930–5.

Table 1: Clinical and virological characteristics of HIV-1 chronic infected individuals under maraviroc-containing therapy.

Patient ID	Time of infection (years)	Following time (months)	HIV-1 <i>env</i> Subtype	PRE _{MVC}					POST _{MVC}				
				<i>env</i> haplotypes	Tropism (FPR 5%)	Viral load	CD4+ T cells	cART	<i>env</i> haplotypes	Tropism (FPR 5%)	Viral load	CD4+ T cells	cART
MVC05	2	13	B	1	100% R5	1.739	482	TDF+3TC+FPV/r	13	100% R5	<40	580	DRV+RAL+RTV+MVC
MVC06	10	11	B	6	100% R5	289.127	23	TDF+3TC+FPV/r	15	100% R5	<40	257	DRV/r + RAL + MVC
MVC08	7	15	B	1	100% R5	10.587	366	TDF+3TC+LPV/r	4	100% R5	<40	880	ETR+RAL+MVC
MVC19	18	9	F1	1	100% R5	42.308	442	TDF+3TC+EFV+LPV	3	100% R5	<40	641	ETR+RAL+MVC
MVC04	16	13	B	22	94.6% R5 / 5.4% X4	<40	164	RTV+DRV+TL	1	100% X4	<40	528	RTV+DRV+RAL+MVC
MVC11	24	12	F1	1	100% R5	<40	1031	TDF+DRV+RTV+3TC+TL	3	100% R5	<40	1031	DRV+RTV+TL+MVQ
MVC15	26	12	B	15	92,6% R5 / 7,4% X4	<40	953	RTV+3TC+DRV+RAL	7	100% R5	<40	693	RTV+DRV+RAL+MVC
MVC18	24	11	B	2	65,6% R5 / 34,4%X4	<40	325	RTV+DRV+TL	7	1% R5 / 99% X4	<40	356	RTV+DRV+RAL+MVC

MVC: maraviroc; FPR: false positive rate; PREMVC: visit previously to cART containing MVC; POSTMVC: posterior MVC initiation; TDF: tenofovir; 3TC: lamivudine; FPV: fosamprenavir; EFV: efavirenz; LPV: lopinavir; RTV: ritonavir; DRV: darunavir; TL: tenofovir+lamivudine; RAL: raltegravir; ETR: etravirina.

FIGURES

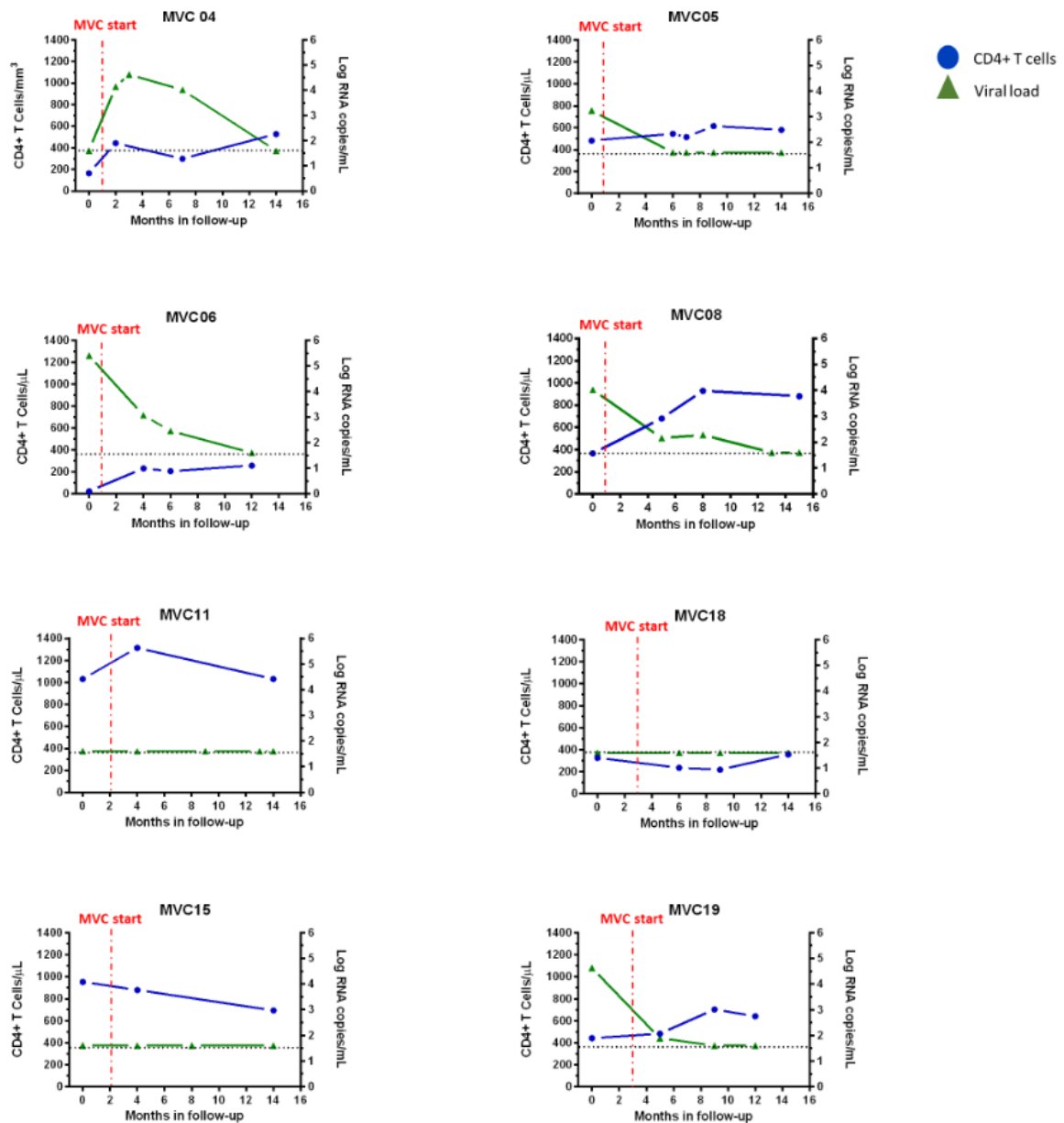


Figure 1. Clinical follow-up of the eight patients with chronic HIV-1 infection administered maraviroc-containing therapy. CD4⁺ T-cell counts (blue circles) and plasma RNA viral loads (green triangles) before and during maraviroc-containing therapy (months) are shown on the left and right Y axes, respectively. The individual identification numbers are indicated at the top of each graph. The dashed black line indicates the viral load detection limit (<1.6 log RNA copies/mL).

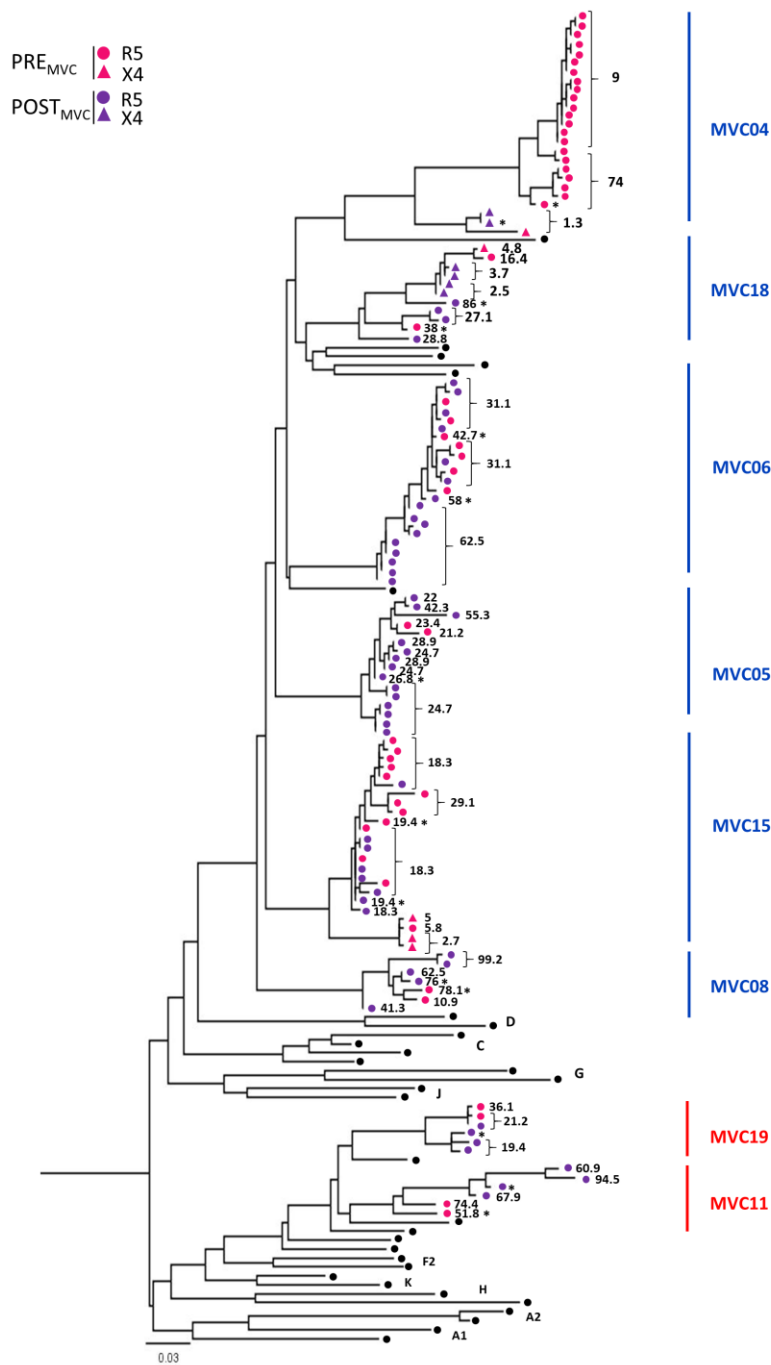


Figure 2. HIV-1 *env*-quasispecies at PRE_{MVC} and POST_{MVC} visits. ML phylogenetic tree of *env* sequences from PRE_{MVC} and POST_{MVC} visits. Clusters from each individual are indicated by black lines with identification numbers. Clusters are identified according to the HIV-1 subtypes: blue (subtype B) and red (sub-subtype F1). Black circles represents reference sequences. Branch supports (aLRT) are indicated at key nodes. The asterisks (*) represents the sequences obtained by conventional sequencing. Circles represents R5 sequences and triangles X4

sequences (pink PRE_{MVC} sequences and purple POST_{MVC} sequences). The FPR value of each sequence is shown next to each one.

Patient identification	Visit	Haplotype frequency	V3 amino acid sequences																																		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
MVC04	PRE _{MVC}	40.8%	C	T	R	P	G	N	N	T	R	K	S	I	S	I	G	P	G	A	S	F	F	T	T	-	D	V	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
	POST _{MVC}	100%	C	T	R	P	G	N	N	T	R	R	R	V	H	L	G	L	G	R	T	F	F	T	T	-	D	V	I	G	D	T	K	R	A	H	C
MVC18	PRE _{MVC}	99%	C	T	R	L	N	N	N	T	R	R	S	I	R	L	G	P	G	R	T	F	Y	A	T	G	-	-	-	D	I	R	Q	A	H	C	
	POST _{MVC}	44.8%	C	T	R	H	N	N	N	T	R	K	S	I	S	I	G	P	G	R	A	F	-	A	T	G	G	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
		22%	C	I	R	P	S	N	N	T	R	K	S	I	H	L	G	P	G	K	A	F	-	A	T	G	A	I	I	G	D	I	R	Q	A	H	C
		18.5%	C	T	R	L	N	N	N	T	R	R	S	I	R	L	G	P	G	R	A	F	-	A	T	G	-	-	-	D	I	R	Q	A	H	C	
MVC05	PRE _{MVC}	100%	C	I	R	P	G	N	N	T	R	R	G	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
	POST _{MVC}	7.5%	C	I	R	P	S	N	N	T	R	K	G	I	H	I	A	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	V	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
		4.5%	C	I	R	P	S	N	N	T	R	K	G	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	N	I	R	Q	A	H	C
MVC06	PRE _{MVC}	100%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	T	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
	POST _{MVC}	24.8%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
MVC08	PRE _{MVC}	100%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	N	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	K	I	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
	POST _{MVC}	40.3%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	H	I	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
		3.9%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	I	R	P	K	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	K	D	I	R	Q	A	H	C
MVC11	PRE _{MVC}	100%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	P	L	G	P	G	K	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	Q	A	H	C
	POST _{MVC}	100%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	I	R	I	G	P	G	Q	A	F	F	A	T	G	E	I	-	G	N	I	R	Q	A	H	C
MVC19	PRE _{MVC}	100%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	K	S	V	H	V	G	P	G	Q	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	R	A	H	C
	POST _{MVC}	72.6%	C	T	R	P	N	N	N	T	R	R	S	V	Q	V	G	P	G	R	A	F	Y	A	T	G	E	I	-	G	D	I	R	K	A	H	C

Figure 3. HIV-1 R5-resistance mutations or polymorphisms related to MVC at V3 amino acid sequences of representative *env* quasiespecies from PRE_{MVC} and POST_{MVC} individuals of sequences that showed amino acid changes. R5-resistance mutations at PRE_{MVC} is in green and polymorphisms at POST_{MVC} in blue.

5 DISCUSSÃO

O HIV-1 é considerado um dos patógenos mais importantes mundialmente, sendo responsável por uma das pandemias de maior impacto na saúde pública das últimas décadas. Embora importantes progressos tenham sido realizados na prevenção de novas infecções pelo HIV-1 e na diminuição de mortes relacionadas à aids, o registro de novos casos vem aumentando nos últimos anos (14). Atualmente, a terapia antirretroviral é uma importante estratégia para o controle da pandemia. O início precoce da cART, a melhoria na adesão, assim como no controle da evolução da infecção durante a terapia são consideradas estratégias importantes para que as metas 90-90-90 estabelecidas pela UNAIDS (16) sejam alcançadas. Dessa forma, o cenário epidemiológico ideal é aquele em que todas as pessoas infectadas pelo HIV conheçam do seu status sorológico e que iniciem prontamente o tratamento, de modo a suprimir a replicação viral e retardar a progressão da doença, com a melhora imunológica, e ainda, diminuir a transmissão do vírus. Além desses objetivos, a terapia também leva ao controle da diversidade viral nos reservatórios. Quando iniciada na fase aguda da infecção esta limitará o tamanho e diversidade dos reservatórios, enquanto que, quando iniciada durante a fase crônica, pode levar à seleção de alguma(s) população (es) virais já estabelecidas e diversificadas neste momento. O início da terapia logo após a detecção da infecção pelo HIV-1 é uma medida preconizada desde 2013 pelo MS no Brasil (Ministério de Saúde, 2013), de acordo com a recomendação da UNAIDS (UNAIDS, 2011). Entretanto, dados do MS apontaram que 16% dos indivíduos infectados desconheciam seu status sorológico em 2017 (Boletim epidemiológico, 2018) e 29% das pessoas infectadas e diagnosticadas tiveram conhecimento da infecção em um momento bem avançado da mesma (Boletim epidemiológico, 2018). É importante ressaltar que indivíduos com infecção aguda contribuem de forma expressiva na transmissão do HIV-1, visto que a carga viral encontrada nessa fase é em geral alta (249,250). Neste contexto, é importante conhecer as dinâmicas de influência do tratamento antirretroviral na diversidade genética do HIV-1 e no controle da formação e manutenção dos reservatórios virais em diferentes estágios da infecção.

Durante a fase inicial da infecção a resposta imunológica frente ao HIV-1 ainda está sendo desenvolvida, assim, a terapia introduzida nesta fase possibilita

que indivíduos infectados apresentem menores níveis de ativação celular, melhor reconstituição imune, interrupção da tempestade de citocinas, e redução do tamanho dos reservatórios virais. Por consequência, uma menor quantidade de quasispécies virais deve ser verificada, e assim, estes indivíduos apresentariam perfil semelhante àquele observado em pacientes capazes de controlar naturalmente a progressão e/ou viremia (LTNPs e controladores de elite) (174,251). Estes indivíduos têm sido propostos como um dos modelos para a obtenção da cura funcional da infecção pelo HIV-1 e os estudos dos mecanismos associados ao controle da infecção após a intervenção da cART nesses grupos são importantes para a identificação de marcadores para o momento ideal de interrupção do tratamento.

Diante da relevância da introdução da terapia na fase aguda da infecção pelo HIV-1 e da ausência de estudos sobre esta temática no Brasil, em colaboração com o grupo de pesquisa do laboratório de Pesquisa Clínica do INI/FIOCRUZ, avaliamos uma coorte de dez indivíduos recém infectados (Fiebig II-V) submetidos precocemente à cART. Neste estudo, apresentado no Documento 1, tivemos como objetivos obter um maior entendimento sobre o impacto do início da terapia precoce nas cargas viral e proviral, e ainda avaliar a complexidade de quasispécies no plasma e em PBMCs.

Uma significativa restauração imunológica foi verificada em todos os indivíduos quando comparados os momentos pré e um ano após cART. Em um ano de terapia foi observado um aumento significativo na contagem de linfócitos TCD4+, corroborando dados de estudos que verificaram uma restauração do número de linfócitos TCD4+ > 500 células/mm³ (252,253). Já foi demonstrado que indivíduos infectados pelo HIV-1 que iniciaram a terapia na fase aguda apresentaram uma reconstituição imune mais precoce do que a cART em pacientes crônicos (173). Um aumento da razão CD4/CD8 (~1) foi observado assim como relatado por Hoenigl e colaboradores (252). A dinâmica da relação CD4/CD8 durante a infecção precoce permanece pouco estudada, contudo, já foi demonstrado que o início precoce da terapia parece melhorar esta relação (252,253). O aumento desta razão foi previamente relacionado a níveis reduzidos de DNA do HIV-1 em PBMCs (Chun et al., 2002), principalmente se a cART foi estabelecida durante a infecção aguda (254).

Em consonância com a recuperação imunológica, observamos uma redução significativa no DNA total do HIV-1 em PBMCs, bem como na carga viral ao longo

dos 12 meses de tratamento. Este controle virológico rápido e eficiente observado nessa coorte está de acordo com relatado em outros trabalhos (174,252,255). Apesar da diminuição do DNA total do HIV-1 em PBMCs (mediana de 2,18 log cópias/10⁶ PBMCs) em nosso estudo, esses níveis foram superiores quando comparado aos detectados em controladores pós-tratamento (PTCs) (mediana de 1,71 log cópias/10⁶ PBMCs) da coorte VISCONTI em um período de acompanhamento de 36,5 meses (174), porém, o tempo médio para alcançar a supressão viral plasmática foi semelhante. Alguns estudos, incluindo os PTCs das coortes VISCONTI, CASCADE e SPARTAC, demonstraram que o controle da replicação viral se manteve durante anos (2 a 12 anos) em indivíduos que receberam cART durante a fase aguda da infecção e interromperam a terapia (após 12 semanas a 3 anos), sugerindo que o reservatório talvez não seja completamente reestabelecido logo após a interrupção da terapia (173,174).

Para melhor entendermos o impacto da cART precoce na evolução genética do HIV-1 nas PBMCs e no plasma, avaliamos a diversidade viral nos momentos pré e pós-tratamento. Na maioria dos indivíduos, detectamos o agrupamento de sequências virais provenientes de ambos os reservatórios, assim como uma baixa/ausência de evolução ao longo dos 12 meses de cART demonstrando a manutenção do tamanho do reservatório durante a supressão viral. Os valores detectados de diversidade do DNA do HIV-1 em PBMCs foram baixos (<1,5%) no momento pré-tratamento, e após 12 meses de cART, observamos uma diminuição, além de um declínio significativo na complexidade da população proviral para a maioria, exceto o IVA 17, que apresentou um aumento da diversidade viral. Considerando a região genômica estudada, não detectamos evolução viral, o que é consistente com a ausência de replicação viral ativa. Dessa forma, a manutenção do reservatório provavelmente ocorreu por expansão clonal da proliferação de células T homeostáticas, assim como relatado em estudo prévios (153,256–259). No entanto, a ausência ou a baixa variabilidade no reservatório de PBMC não exclui a possibilidade de que uma replicação residual possa estar ocorrendo em santuários replicativos, especialmente no tecido linfóide (Lorenzo-Redondo et al., 2016). A estabilidade destas células latentes infectadas abastecidas por uma replicação viral de baixo nível é o principal mecanismo pelo qual a infecção persiste. A redução na complexidade proviral intra-hospedeiro após a terapia pode ser explicada pela depuração de células infectadas pelo HIV, provavelmente células T de vida longa

(Palmer et al., 2008), e coincidiu com uma redução nos níveis de DNA do HIV. Recentemente, Wang e colaboradores (260) encontraram uma associação positiva entre a diversidade genética do HIV durante a fase inicial da infecção e um declínio mais rápido do DNA do HIV após a cART. Em contrapartida, não encontramos nenhuma correlação significativa entre a recuperação imunológica, ou o controle virológico alcançado após um ano de terapia supressiva com cART, e a diversidade do HIV-1 antes do início da cART.

Os diferentes subtipos de HIV-1 encontrados nesta casuística (B, F1 e C) parecem não ter influenciado nos resultados sobre a importância da cART na evolução viral dos indivíduos. No entanto, vale ressaltar que os indivíduos IVA05 e IVA38, ambos infectados com subtipo C do HIV-1, apresentaram os maiores valores de diversidade e complexidade viral tanto em PBMCs como no plasma. Este achado está de acordo com um estudo anterior que descreveu uma maior diversidade mediana para o subtipo C em relação ao subtipo B (261). No entanto, não podemos comprovar neste trabalho se esta maior diversidade observada em indivíduos infectados com o subtipo C do HIV-1 é baseada em propriedades virais específicas deste subtipo ou não. Conforme o esperado de uma análise de indivíduos no início da infecção, a maioria apresentou variantes de HIV-1 trópicas para o correceptor CCR5 nos momentos pré e pós-terapia. As exceções foram dois indivíduos infectados pelo HIV-1 subtipo B que exibiram uma baixa frequência (6%) de clones X4 no momento pré-terapia, o que corrobora com a literatura que descreve uma frequência máxima de 20% dessas variantes no início da infecção (236,262,263).

De acordo com os resultados obtidos no Documento 1, doze meses de cART iniciada durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 permitiu um controle eficiente da viremia e sugeriu uma redução do tamanho do reservatório analisado. No entanto, a ausência de marcadores definidores dos indivíduos que manterão o controle efetivo da replicação viral mesmo após a interrupção da cART, dificulta na decisão de descontinuar a terapia, visto que em muitos casos é verificada remissão viral. Estudos com coortes maiores, avaliando compartimentos distintos e durante um período mais longo de acompanhamento são necessários. Além disso, a caracterização dos provírus integrados que compõe este reservatório seria importante, visto que o reservatório estudado neste trabalho pode ser composto por provírus integrados em suas formas replicantes ou defectivas.

O presente estudo contou ainda com um segundo eixo (Documento 2) que visou verificar a influência da cART contendo o MVQ no contexto das variantes R5 e X4 obtidas por NGS, em indivíduos infectados pelo HIV-1, multi-experimentados, em fase crônica da infecção. Os indivíduos incluídos necessitavam alterar seu regime terapêutico devido à falha virológica decorrente de falha terapêutica, ou a eventos adversos (como intolerância e ou não-adesão ao tratamento) ou com objetivo de obter uma recuperação imunológica. O crescente conhecimento sobre o uso dos correceptores do HIV-1 levou a busca e o estabelecimento de novas drogas antirretrovirais visando a entrada do vírus na célula, aumentando o número de opções de tratamento para estes casos. As propriedades farmacocinéticas favoráveis e o bom perfil de segurança do MVQ apoiam ainda mais a sua consideração como parte das estratégias de troca, ou simplificação da terapia antirretroviral em indivíduos tratados, melhorando a durabilidade, tolerabilidade e eficácia a longo prazo da cART (224,264,265). Além disso, recentemente o MVQ foi sugerido como um potencial fármaco capaz de induzir a transcrição do HIV-1 em linfócitos TCD4 em repouso interferindo na persistência viral (266). Neste sentido, o estudo de coortes brasileiras sob uso de cART combinada com MVQ, se tornam relevantes, principalmente por esta ser uma droga que há poucos anos compõe a terapia de resgate em multifalhados, e estudos relacionados ao mesmo ainda são escassos no país. O regime terapêutico utilizado pelos indivíduos anteriormente à inclusão do MVQ na terapia continha inibidores de transcriptase reversa nucleosídeos e não nucleosídeos e/ou inibidores de protease e/ou da integrase.

Para este eixo do estudo, 20 indivíduos infectados pelo HIV-1 em fase crônica e multi-experimentados foram indicados a iniciar a terapia contendo MVQ. Destes, oito (40%) foram elegíveis à terapia, visto que na análise genotípica por sequenciamento convencional possuíam a variante R5, e então foram incluídos no estudo. Dentre os indivíduos estudados, metade teve indicação para uso do MVQ devido à falha virológica (com altos valores de carga viral); e a outra metade, apesar de apresentar neste momento a carga viral suprimida, tinha histórico de baixa aderência terapêutica ou ainda por indicação dos médicos visando o alcance de melhor resposta imunológica.

Já foi descrito que o uso do MVQ em monoterapia ou em uso combinado com outras drogas antirretrovirais leva ao sucesso terapêutico e ao aumento da contagem de linfócitos TCD4+ (267–269). Assim, o mesmo tem sido recomendado

também para indivíduos que exibem baixa recuperação imunológica (270). De modo geral, na maioria dos indivíduos analisados neste estudo foi observado um aumento na contagem de células T CD4+ no momento pós-MVQ, corroborando dados de estudos anteriores com períodos similares de acompanhamento (271,272).

Atualmente na prática clínica, a determinação do tropismo genotípico ainda se baseia no sequenciamento convencional por sanger, permitindo a detecção de variantes virais majoritárias. Entretanto, o NGS permite também a identificação de populações minoritárias, possibilitando a obtenção de uma frequência mais acurada das quasispécies R5 e X4 presentes nos indivíduos. Deste modo, neste estudo, três indivíduos que apresentaram vírus R5 por sequenciamento convencional no momento prévio ao MVQ, por NGS exibiram variantes X4 em frequências distintas. Portanto, se a genotipagem prévia por NGS fosse preconizada na rotina clínica, estes não seriam elegíveis para uso do MVQ. Em dois destes indivíduos observamos que a população X4 passou a dominar o reservatório completamente no segundo ponto estudado, sendo este um dos mecanismos de falha ao MVQ já descritos (218,241,242). Desse modo, foi indicada a interrupção do uso do MVQ nestes indivíduos. Para o caso de um único indivíduo (MVC15), o uso do MVQ por 12 meses não selecionou as variantes X4 detectadas previamente, concordando com dados do estudo de Raymond e colaboradores que também detectou uma não seleção de variantes X4 após 6 meses de uso de MVQ (246). Assim como reportado por estudos anteriores, o uso do MVQ pode alcançar uma boa recuperação imunológica apesar da presença de uma pequena proporção de vírus X4 ou vírus duo-trópicos durante a terapia com este fármaco (270,273). Já em casos onde não é detectada presença de variantes X4 previamente ao tratamento, a troca do uso do correceptor de CCR5 para CXCR4 pelo HIV-1, principalmente em indivíduos infectados sob cART com viremia indetectável, é um evento raro (242).

Mesmo nos indivíduos onde verificamos a mudança completa da população viral para X4 após o uso do MVQ, o que inviabiliza a continuidade do uso deste fármaco, ocorreu a manutenção da supressão de suas cargas virais, bem como uma contagem de linfócitos TCD4 + alta durante o período acompanhamento, isso porque provavelmente os demais fármacos estavam sendo efetivos. No caso do indivíduo MVC04, foram detectadas cargas virais positivas em três medidas consecutivas, provavelmente relacionadas a baixa adesão ao tratamento.

A resistência ao MVQ pode ser relacionada tanto à presença de variantes X4, quanto a emergência de mutações nas variantes R5 (182,220,242). Como ainda não há um consenso sobre essas mutações, e poucos estudos descrevem as mesmas, investigamos em nossa coorte a presença de mutações já descritas *in vitro* e *in vivo* afim de gerar novos dados sobre resistência ao MVQ. Fomos capazes de identificar essas mutações em dois indivíduos no momento pré-MVQ, sugerindo que esse resultado pode estar associado à alta diversidade do envelope, pois mutações de resistência transmitidas relacionadas a este fármaco devem ser raras no Brasil, visto que seu uso é recente e pouco frequente. No entanto, observamos substituições de aminoácidos em todos os pacientes que apresentaram variantes R5 durante o acompanhamento, conforme descrito em vários estudos (229,242,274). Considerando que esses polimorfismos estavam ausentes antes do início do MVQ, provavelmente corresponderam à evolução viral, decorrente da replicação residual (275). Dentre estes, o identificado na posição 13 da alça V3 estava presente na maioria dos indivíduos, sugerindo ser resultante de uma pressão seletiva decorrente do MVQ, conforme previamente descrito por Recordon-Pinson e colaboradores. (276).

Os indivíduos estudados no documento 2 desta tese exibiram uma mediana de 19 anos de infecção pelo HIV-1, e uma mediana de diversidade na região C2-V3 de aproximadamente 3%, nos dois momentos estudados (dado não mostrado). Nestes indivíduos esperava-se até uma diversidade proviral maior no primeiro momento, visto que metade destes estava em falha virológica. Esta variabilidade seria decorrente da presença de reservatórios maiores e bem estabelecidos (277). No entanto, esta heterogeneidade menor provavelmente é decorrente do longo tempo de uso de terapia destes indivíduos, e do seu controle da replicação viral por longos períodos

Os achados descritos no Documento 2 confirmaram que a terapia contendo MVQ foi capaz de manter/suprimir a carga viral do HIV-1 além de aumentar as contagens de células T CD4+. Também relatamos que a presença de variantes X4 previamente à terapia pode levar a seleção de resistência que culminaria na falha virológica ao MVQ. Além disso, detectamos um aumento nos polimorfismos possivelmente relacionados ao uso do MVQ nas cepas R5, apesar da baixa replicação viral residual. Estas descobertas apoiam a determinação do tropismo das quasispécies virais pelo NSG antes e durante a terapia contendo MVQ. Entretanto,

esta é uma metodologia cara, além de exigir uma alta qualificação para análise dos dados gerados. Ressaltamos que novos estudos com maior amostragem e tempo de acompanhamento com o objetivo de rastrear a dinâmica das variantes R5/X4 e melhor caracterizar as mutações de resistência sob pressão da terapia contendo MVQ, serão necessários para confirmar nossos achados.

A principal limitação encontrada nos dois documentos apresentados nesta tese foi o pequeno número de pacientes avaliados e o pouco tempo de acompanhamento das coortes. Com relação ao Documento 1, apesar da intensificação da oferta de testes rápidos dentro e fora dos serviços de saúde, e da busca abrangendo populações-chave em risco para detecção do HIV-1, a identificação dos indivíduos nas fases precoces da infecção primária ainda é rara. Visto que nessa fase da infecção os indivíduos de modo geral apresentam apenas sintomas inespecíficos e similares aos verificados em diversas viroses, levando por muitas vezes estes a não procurarem os serviços de saúde. Por outro lado, quando há a busca por estes serviços, nem sempre a suspeita de infecção pelo HIV é levantada. No entanto, até onde sabemos, este é o primeiro estudo brasileiro a estabelecer e iniciar o tratamento precoce numa coorte de indivíduos com infecção aguda e ainda discutir a evolução viral e o tamanho do reservatório na mesma. Com relação ao Documento 2, quando fizemos o desenho deste trabalho, esperávamos obter um número maior de amostras de indivíduos multiexperimentados com indicação ao MVQ, porém, a partir do ano de 2016, o Dolutegravir (inibidor de integrase) foi incorporado ao esquema terapêutico recomendado pelo MS e tornou-se preconizado como escolha para os pacientes em falha, retardando o início da terapia com MVQ.

De modo geral, o estudo das duas casuísticas desta tese ampliou o conhecimento sobre a dinâmica das quasispecies virais sob a pressão seletiva da cART iniciada precocemente, e do uso da terapia contendo MVQ.

6 CONCLUSÕES

- Um ano após o início precoce de terapia antirretroviral em indivíduos com infecção aguda pelo HIV-1 foi associado a restauração imunológica e supressão viral, independente da carga viral inicial, da contagem de células T CD4 +, do subtipo de HIV-1 ou da diversidade proviral antes do início da cART.
- O início precoce de terapia antirretroviral em indivíduos com infecção aguda pelo HIV-1 resultou em redução do tamanho e complexidade do DNA total de HIV-1 no reservatório de PBMC.
- A cART contendo MVQ em infectados pelo HIV-1 crônicos e multi-experimentados foi capaz de suprimir ou manter a supressão das cargas virais e alcançar recuperação imunológica nestes indivíduos. Sendo efetivo para a maioria dos indivíduos estudados.
- Em dois dos três indivíduos submetidos à terapia com MVQ que apresentaram variantes X4 em PRE_{MVC}, as mesmas dominaram a visita POST_{MVC}, apesar da supressão da CV ao longo do estudo, o que poderia levar à falha ao MVQ.
- O uso de MVQ em terapia de resgate foi associado ao aumento nos polimorfismos nas variantes R5, apesar da replicação viral residual.
- Em conjunto, os achados supracitados demonstram a importância do estudo da dinâmica das quasispécies virais, através do NGS, sob a pressão seletiva da cART iniciada durante a fase aguda da infecção e do uso do MVQ compondo a terapia de resgate em um momento mais avançado da infecção.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. Pneumocystis carinii Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men: Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency. N Engl J Med. 1981;
2. CDC Centers for Disease Control and Prevention. Pneumocystis pneumonia. 1981. p. 1–3.
3. Hymes KB, Greene JB, Cheung T, Prose NS, Marcus A, Ballard H, et al. Kaposi's sarcoma in homosexual men. A report of eight cases. Lancet. 1981;
4. Clumeck N, Mascart-Lemone F, De Maubeuge J, Brenez D, Marcelis L. ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME IN BLACK AFRICANS. The Lancet. 1983.
5. CDC Centers for Disease Control and Prevention. Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). 1982. p. 513–4.
6. CDC Centers for Disease Control and Prevention. pidemiologic Notes and Reports Immunodeficiency among Female Sexual Partners of Males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). 1983. p. 697–8.
7. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W ML. Barre Sinoussi Isolation. Science. 1983;
8. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science (80-). 1984;
9. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science (80-). 1984;
10. Ratner L, Gallo RC, Wong-Staal F. HTLV-III, LAV, ARV are variants of same

AIDS virus [8]. *Nature*. 1985.

11. Coffin JM, Haase A, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N. Human immunodeficiency viruses. *Science* (80-). 1986;232((4751)):697–697.
12. Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* (80-). 1986;
13. Barin F, Denis F, Allan JS, M'Boup S, Kanki P, Lee TH, et al. SEROLOGICAL EVIDENCE FOR VIRUS RELATED TO SIMIAN T-LYMPHOTROPIC RETROVIRUS III IN RESIDENTS OF WEST AFRICA. *Lancet*. 1985;
14. UNAIDS. Global AIDS Monitoring 2018: Indicators for monitoring the 2016 United Nations Political Declaration on Ending AIDS. BOOK. 2018.
15. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. UNAIDS Data 2017. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. 2017.
16. UNAIDS 2014. GLOBAL REPORT: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013. Un aids. 2013.
17. Grinsztejn B, Jalil EM, Monteiro L, Velasque L, Moreira RI, Garcia ACF, et al. Unveiling of HIV dynamics among transgender women: a respondent-driven sampling study in Rio de Janeiro, Brazil. *Lancet HIV*. 2017;
18. Costa AB, Fontanari AMV, Jacinto MM, da Silva DC, Lorencetti EK, da Rosa Filho HT, et al. Population-Based HIV Prevalence and Associated Factors in Male-to-Female Transsexuals from Southern Brazil. *Arch Sex Behav*. 2014;
19. Kerr L, Kendall C, Guimarães MDC, Mota RS, Veras MA, Dourado I, et al. HIV prevalence among men who have sex with men in Brazil: Results of the 2nd national survey using respondent-driven sampling. *Med (United States)*. 2018;97(1S):S9–15.
20. Baptista CJ, Dourado I, de Andrade TM, Brignol S, Bertoni N, Bastos FI, et al. Hiv prevalence, knowledge, attitudes, and practices among polydrug users in brazil: A biological survey using respondent driven sampling. *AIDS Behav*.

- 2018;
21. Szwarcwald CL, Damacena GN, De Souza-Junior PRB, Guimarães MDC, De Almeida WDS, De Souza Ferreira AP, et al. Factors associated with HIV infection among female sex workers in Brazil. *Med (United States)*. 2018;97(1S):S54–61.
 22. Basti B, Mahesh V, Bant D, Bathija G. Factors affecting antiretroviral treatment adherence among people living with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome: A prospective study. *J Fam Med Prim Care*. 2017;
 23. Brasil. Plano nacional de enfrentamento da epidemia de aids e das DST entre gays, HSH e travestis. 2008.
 24. Brasil. Relatório de Monitoramento Clínico do HIV. Ministério da Saúde. 2018.
 25. Krupovic M, Blomberg J, Coffin JM, Dasgupta I, Fan H, Geering AD, et al. *Ortervirales*: New Virus Order Unifying Five Families of Reverse-Transcribing Viruses. *J Virol*. 2018;
 26. ICTV. Virus Taxonomy. International Committee on Taxonomy of viruses. *Virus Taxonomy: 2017 Release*. 2017.
 27. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*. 1999.
 28. Cherrington J, Ganem D. Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *EMBO J*. 1992;
 29. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* [Internet]. 2010;46(1):5–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348614>
 30. Yu X, Yuan XIN, Matsuda Z, Lee TH, Essex MAX. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope

- protein into mature virions. *J Virol.* 1992;
31. Huang M, Orenstein JM, Martin MA, Freed EO. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol.* 1995;
 32. Freed EO., Martin MA. HIVs and their replication. In: *Fundamental Virology.* 2001.
 33. Cicala C, Arthos J, Fauci AS. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. *Journal of Translational Medicine.* 2010.
 34. Huang CC, Stricher F, Martin L, Decker JM, Majeed S, Barthe P, et al. Scorpion-toxin mimics of CD4 in complex with human immunodeficiency virus gp120: Crystal structures, molecular mimicry, and neutralization breadth. *Structure.* 2005;
 35. Sander O, Sing T, Sommer I, Low AJ, Cheung PK, Harrigan PR, et al. Structural descriptors of gp120 V3 loop for the prediction of HIV-1 coreceptor usage. *PLoS Comput Biol.* 2007;
 36. Jiang X, Burke V, Totrov M, Williams C, Cardozo T, Gorny MK, et al. Conserved structural elements in the V3 crown of HIV-1 gp120. *Nat Struct Mol Biol.* 2010;
 37. De Jong JJ, De Ronde A, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* [Internet]. 1992;66(11):6777–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404617>
 38. Balasubramanian C, Chillemi G, Abbate I, Capobianchi MR, Rozera G, Desideri A. Importance of v3 loop flexibility and net charge in the context of co-receptor recognition. A molecular dynamics study on hiv gp120. *J Biomol Struct Dyn.* 2012;
 39. Fouchier RA, Groenink M, Kootstra NA, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, et al. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain

- of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol.* 1992;
40. Cassan E, Arigon-Chifolleau A-M, Mesnard J-M, Gross A, Gascuel O. Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;
 41. Dimonte S. Different HIV-1 env Frames: gp120 and ASP (Antisense Protein) Biosynthesis, and Theirs Co-Variation Tropic Amino Acid Signatures in X4- and R5-Viruses. *J Med Virol.* 2017;89:112–22.
 42. Malim MH. APOBEC proteins and intrinsic resistance to HIV-1 infection. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* 2009.
 43. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;
 44. Santa-Marta M, Brito PM de, Godinho-Santos A, Goncalves J. Host factors and HIV-1 replication: Clinical evidence and potential therapeutic approaches. *Front Immunol.* 2013;
 45. Das SR, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein. *Indian Journal of Medical Research.* 2005.
 46. Clapham PR, Weiss RA. Immunodeficiency viruses: Spoilt for choice of co-receptors. *Nature.* 1997;
 47. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. Molecular Mechanisms of HIV Entry. In: Rossmann MG, Rao VB, editors. *Viral Molecular Machines* [Internet]. 2012. p. 223–42. (Advances in Experimental Medicine and Biology; vol. 726). Available from: %3CGo
 48. Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition. *Cell.* 1998.
 49. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1999;17:657–700. Available from: %3CGo
 50. Wei-Shau Hu, Stephen H. Hughes. HIV-1 reverse transcription. *Methods Mol*

- Biol. 2012;1087:55–70.
51. Karn J, Stoltzfus CM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;
 52. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 assembly, budding, and maturation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2012.
 53. Abela IA, Berlinger L, Schanz M, Reynell L, Günthard HF, Rusert P, et al. Cell-cell transmission enables HIV-1 to evade inhibition by potent CD4bs directed antibodies. *PLoS Pathog.* 2012;
 54. Sigal A, Kim JT, Balazs AB, Dekel E, Mayo A, Milo R, et al. Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature.* 2011;
 55. Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications. *Science.* 2000.
 56. D'arc M, Ayoub A, Esteban A, Learn GH, Boué V, Liegeois F, et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;
 57. Keele BF, Van Heuverswyn F, Li Y, Bailes E, Takehisa J, Santiago ML, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science (80-).* 2006;313(5786):523–6.
 58. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2011;
 59. Van Heuverswyn F, Li Y, Neel C, Bailes E, Keele BF, Liu W, et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature.* 2006;
 60. Roques P, Robertson DL, Souquière S, Apetrei C, Nerrienet E, Barré-Sinoussi F, et al. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS.* 2004;
 61. Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, De Oliveira F, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med.* 2009;

62. Gao F, Balles E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*. 1999;
63. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: Virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* (80-). 1996;
64. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. *J Virol*. 2010;
65. Domingo E, Martín V, Perales C, Grande-Pérez A, García-Arriaza J, Arias A. Viruses as quasispecies: Biological implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2006.
66. Lauring AS, Andino R. Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathogens*. 2010.
67. Dampier W, Nonnemacher MR, Mell J, Earl J, Ehrlich GD, Pirrone V, et al. HIV-1 genetic variation resulting in the development of new quasispecies continues to be encountered in the peripheral blood of well-suppressed patients. *PLoS One*. 2016;
68. Li G, Piampongsant S, Faria RN, Voet A, Pineda-Peña AC, Khouri R, et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. *Retrovirology*. 2015;
69. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* (80-) [Internet]. 2000;288(5463):55–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766634>
70. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *N Engl J Med*. 2008;
71. Laboratory LAN. Los Alamos HIV Database. <http://www.hiv.lanl.gov/>.
72. Hemelaar J, Elangovan R, Yun J, Dickson-Tetteh L, Fleminger I, Kirtley S, et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a

- systematic review, global survey, and trend analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018;3099(18):1–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309918306479>
73. Dilernia DA, Gomez AM, Lourtau L, Marone R, Losso MH, Salomon H, et al. HIV type 1 genetic diversity surveillance among newly diagnosed individuals from 2003 to 2005 in Buenos Aires, Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;
 74. Quarleri JF, Rubio A, Carobene M, Turk G, Vignoles M, Harrigan RP, et al. HIV type 1 BF recombinant strains exhibit different pol gene mosaic patterns: descriptive analysis from 284 patients under treatment failure. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2004;
 75. Thomson MM, Villahermosa ML, Vázquez-De-Parga E, Cuevas MT, Delgado E, Manjón N, et al. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS*. 2000.
 76. Guimarães M, dos Santos Moreira A, Loureiro R, Galvão-castro B, Morgado MG. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;
 77. Morgado MG, Guimarães ML, Galvão-Castro B. HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development - A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002.
 78. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): A survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 2003;
 79. Santos AF, Sousa TM, Soares EAJM, Sanabani S, Martinez AMB, Sprinz E, et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*. 2006;
 80. Sanabani S, Neto WK, Filho DJDS, Diaz RS, Munerato P, Janini LM, et al. Full-Length Genome Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype C

- in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;
81. Sá-Ferreira JA, Brindeiro PA, Chequer-Fernandez S, Tanuri A, Morgado MG. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2007;
 82. Barreto CC, Nishyia A, Araújo L V., Ferreira JE, Busch MP, Sabino EC. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1-infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2006;
 83. Brígido LF, Ferreira JL, Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, Estevam DL, et al. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2011;27(3):339–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20950149>
 84. Leite TC, Campos DP, Coelho AB, Teixeira SL, Veloso V, Morgado MG, et al. Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2017;33(1):41–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27418261>
 85. Delatorre E, de Azevedo SS, Rodrigues-Pedro A, Velasco-de-Castro CA, Couto-Fernandez JC, Pilotto JH, et al. Tracing the origin of a singular HIV-1 CRF45_cpx clade identified in Brazil. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016;46:223–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27259365>
 86. Potts KE, Kalish ML, Lott T, Orloff G, Luo CC, Bernard MA, et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. *AIDS* [Internet]. 1993;7(9):1191–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8216975>
 87. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brígido L, Guimaraes MD, et al. V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 1994;10(5):569–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7522493>

88. Morgado MG, Guimarães ML, Gripp CB, Costa CI, Neves I, Veloso VG, et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* [Internet]. 1998;18(5):488–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9715846>
89. Casseb J, Hong MA, Gonzalez C, Brígido LF, Duarte AJ, Michael-Hendry R. Two variants of HIV-1 B serotype are transmitted heterosexually in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 1998;31(10):1243–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9876293>
90. Covas DT, Biscoaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* [Internet]. 1998;19(1):74–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9732073>
91. Franca RF, Castro-Jorge LA, Neto RJ, Jorge DM, Lima DM, Colares JK, et al. Genotypic characteristics of HIV type 1 based on gp120 hypervariable region 3 of isolates from Southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2011;27(8):903–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21087177>
92. Pimentel VF, Morgado MG, Bello G, Guimarães MD, Castilho EA, Veloso VG, et al. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2013;29(12):1553–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23987184>
93. Junqueira DM, Medeiros RM, Leite TC, Guimarães ML, Gräf T, Pinto AR, et al. Detection of the B^{*}-GWGR variant in the southernmost region of Brazil: unveiling the complexity of the human immunodeficiency virus-1 subtype B epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2013;108(6):735–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24037196>
94. Caride E, Brindeiro R, Hertogs K, Larder B, Dehertogh P, Machado E, et al.

- Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*. 2000;
95. Cabral VP, Cunha CB, Magalhaes EFL, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, Dietze R, et al. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;
 96. Couto-Fernandez JC, Silva-de-Jesus C, Veloso VG, Rachid M, Gracie RS, Chequer-Fernandez SL, et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* [Internet]. 2005;100(1):73–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15867968>
 97. Machado LF, Ishak MO, Vallinoto AC, Lemos JA, Azevedo VN, Moreira MR, et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 2009;25(10):961–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19795985>
 98. Ferreira JLP, Rodrigues R, Lança AM, De Almeida VC, Rocha SQ, Ragazzo TG, et al. Transmitted drug resistance among people living with HIV/aids at major cities of Sao Paulo State, Brazil. *Adv Virol*. 2013;
 99. Brenner BG, Roger M, Routy J, Moisi D, Ntemgwa M, Matte C, et al. High Rates of Forward Transmission Events after Acute/Early HIV- 1 Infection. *J Infect Dis*. 2007;
 100. Hollingsworth TD, Anderson RM, Fraser C. HIV-1 Transmission, by Stage of Infection. *J Infect Dis*. 2008;
 101. Hayes RJ, White R. Amplified HIV transmission during early-stage infection. *J Infect Dis*. 2006;193(4):405–5.
 102. Wawer MJ, Reynolds SJ, Serwadda D, Kigozi G, Kiwanuka N, Gray RH. Might male circumcision be more protective against HIV in the highly exposed? An

- immunological hypothesis [4]. *AIDS*. 2005.
103. Souza MCMR, Freitas MIF. Representations of primary care professionals about the occupational risk of HIV infection. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2010;
 104. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nature Reviews Microbiology*. 2004.
 105. Gray RH, Li X, Kigozi G, Serwadda D, Brahmbhatt H, Wabwire-Mangen F, et al. Increased risk of incident HIV during pregnancy in Rakai, Uganda: A prospective study. *Lancet*. 2005;
 106. Auvert B, Taljaard D, Lagarde E, Sobngwi-Tambekou J, Sitta R, Puren A. Randomized, controlled intervention trial of male circumcision for reduction of HIV infection risk: The ANRS 1265 trial. *PLoS Med*. 2005;
 107. Bailey RC, Moses S, Parker CB, Agot K, Maclean I, Krieger JN, et al. Male circumcision for HIV prevention in young men in Kisumu, Kenya: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;
 108. Gray RH, Li X, Kigozi G, Serwadda D, Nalugoda F, Watya S, et al. The impact of male circumcision on HIV incidence and cost per infection prevented: A stochastic simulation model from Rakai, Uganda. *AIDS*. 2007;
 109. Quinn TC. Circumcision and HIV transmission. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2007.
 110. CDC. HIV Transmission | HIV Basics | HIV/AIDS | CDC. 2015. 2015.
 111. Royce RA, Seña A, Cates W, Cohen MS. "Sexual transmission of HIV": Correction. *N Engl J Med*. 1997;
 112. Carlson JM, Schaefer M, Monaco DC, Batorsky R, Claiborne DT, Prince J, et al. Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck. *Science* (80-). 2014;345(6193).
 113. Bark CM, Morrison CS, Salata RA, Byamugisha JK, Katalemwa NH, Mugerwa RD, et al. Acceptability of treatment of latent tuberculosis infection in newly

- HIV-infected young women in Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010;
114. Kearney M, Maldarelli F, Shao W, Margolick JB, Daar ES, Mellors JW, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Population Genetics and Adaptation in Newly Infected Individuals. *J Virol* [Internet]. 2009;83(6):2715–27. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01960-08>
 115. Tully DC, Ogilvie CB, Batorsky RE, Bean DJ, Power KA, Ghebremichael M, et al. Differences in the Selection Bottleneck between Modes of Sexual Transmission Influence the Genetic Composition of the HIV-1 Founder Virus. *PLoS Pathog.* 2016;
 116. Kariuki SM, Selhorst P, Ariën KK, Dorfman JR. The HIV-1 transmission bottleneck. *Retrovirology.* 2017.
 117. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2008;105(21):7552–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0802203105>
 118. Kijak GH, Sanders-Buell E, Chenine AL, Eller MA, Goonetilleke N, Thomas R, et al. Rare HIV-1 transmitted/founder lineages identified by deep viral sequencing contribute to rapid shifts in dominant quasispecies during acute and early infection [Internet]. Vol. 13, *PLoS Pathogens.* 2017. 1-34 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1006510>
 119. Joseph SB, Swanstrom R, Kashuba ADM, Cohen MS. Bottlenecks in HIV-1 transmission: Insights from the study of founder viruses. *Nature Reviews Microbiology.* 2015.
 120. Shaw GM, Hunter E. HIV transmission. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(11):1–23.
 121. Ngandu NK, Carlson JM, Chopera DR, Ndabambi N, Abdool Karim Q, Abdool Karim S, et al. Brief report: Selection of HIV-1 variants with higher transmission potential by 1% tenofovir gel microbicide. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2017;

122. Carlson JM, Du VY, Pfeifer N, Bansal A, Tan VYF, Power K, et al. Impact of pre-Adapted HIV transmission. *Nat Med*. 2016;
123. Redd AD, Collinson-Streng AN, Chatziandreou N, Mullis CE, Laeyendecker O, Martens C, et al. Previously transmitted HIV-1 strains are preferentially selected during subsequent sexual transmissions. *J Infect Dis*. 2012;
124. Resch W, Hoffman N, Swanstrom R. Improved success of phenotype prediction of the human immunodeficiency virus type 1 from envelope variable loop 3 sequence using neural networks. *Virology*. 2001;
125. Jensen MA, Li FS, van't Wout AB, Nickle DC, Shriner D, He HX, et al. Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences. *J Virol* [Internet]. 2003;77(24):13376–88. Available from: %3CGo
126. Oberle CS, Joos B, Rusert P, Campbell NK, Beauparlant D, Kuster H, et al. Tracing HIV-1 transmission: Envelope traits of HIV-1 transmitter and recipient pairs. *Retrovirology*. 2016;13(1):1–20.
127. Baeten JM, Chohan B, Lavreys L, Chohan V, McClelland RS, Certain L, et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. *J Infect Dis* [Internet]. 2007;195(8):1177–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357054>
128. Schuitemaker H, van 't Wout AB, Lusso P. Clinical significance of HIV-1 coreceptor usage. *J Transl Med* [Internet]. 2011;9. Available from: %3CGo
129. Gaines H, von SM, Parry J V, Forsgren M, Pehrson PO, Sonnerborg A, et al. Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS*. 1988;
130. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, Campbell-Hill S, Roberson JL, Veldkamp PJ, et al. High Titers of Cytopathic Virus in Plasma of Patients with Symptomatic Primary HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 1991;

131. Lindbäck S, Karlsson a C, Mittler J, Blaxhult a, Carlsson M, Briheim G, et al. Viral dynamics in primary HIV-1 infection. Karolinska Institutet Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*. 2000;
132. Lindbäck S, Thorstensson R, Karlsson a C, von Sydow M, Flamholc L, Blaxhult a, et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection and duration of follow-up after HIV exposure. Karolinska Institute Primary HIV Infection Study Group. *AIDS*. 2000;
133. Douek D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Top HIV Med*. 2007;
134. Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, et al. Control of viremia prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* (80-). 2000;
135. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994;
136. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*. 1994;
137. Bellan SE, Dushoff J, Galvani AP, Meyers LA, Markowitz M, Vesanen M, et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. *Aids* [Internet]. 2003;17(February):1871–9. Available from: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2013/55594/fiebigtr aduzido_2_pdf_12584.pdf%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010788 %5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3119211&tool =pmcentrez&rendertype=abstract%25
138. Kassutto S, Rosenberg ES. Primary HIV Type 1 Infection. *Clin Infect Dis*. 2004;
139. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev*

Microbiol [Internet]. 1996;50:825–54. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8905100>

140. Deeks SG, Walker BD. Human Immunodeficiency Virus Controllers: Mechanisms of Durable Virus Control in the Absence of Antiretroviral Therapy. *Immunity*. 2007.
141. Langford SE, Ananworanich J, Cooper DA. Predictors of disease progression in HIV infection: A review. *AIDS Research and Therapy*. 2007.
142. Casado C, Colombo S, Rauch A, Martínez R, Günthard HF, Garcia S, et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* [Internet]. 2010;5(6):e11079. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552027>
143. Sáez-Cirión A, Pancino G. HIV Controllers: A Genetically Determined Or Inducible Phenotype? *Immunol Rev*. 2013;
144. Fischl MA, Dickinson GM, Scott GB, Klimas N, Fletcher MA, Parks W. Evaluation of Heterosexual Partners, Children, and Household Contacts of Adults With AIDS. *JAMA J Am Med Assoc*. 1987;
145. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;
146. Thompson CG, Sedykh A, Nicol MR, Muratov E, Fourches D, Tropsha A, et al. Short Communication: Cheminformatics Analysis to Identify Predictors of Antiviral Drug Penetration into the Female Genital Tract. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014;
147. Markowitz M, Sarafianos SG. 4'-Ethylnyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine, MK-8591: A novel HIV-1 reverse transcriptase translocation inhibitor. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2018.
148. Brasil. Recomendações de terapia antirretroviral para adultos vivendo com HIV / aids no Brasil. Ministério da Saúde Brasília. 2018.
149. Cane P. Time trends in primary resistance to HIV drugs in the United Kingdom:

- Multicentre observational study. *Br Med J*. 2005;
150. Martinez-Picado J, Martínez MA. HIV-1 reverse transcriptase inhibitor resistance mutations and fitness: A view from the clinic and ex vivo. *Virus Res*. 2008;
 151. Sahu GK. Potential Implication of Residual Viremia in Patients on Effective Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015;
 152. Eisele E, Siliciano RF. Redefining the Viral Reservoirs that Prevent HIV-1 Eradication. *Immunity*. 2012.
 153. Chomont N, El-Far M, Ancuta P, Trautmann L, Procopio FA, Yassine-Diab B, et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med*. 2009;15(8):893–900.
 154. Appay V, Van Lier RAW, Sallusto F, Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry Part A*. 2008.
 155. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med*. 2011;
 156. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science (80-)*. 1997;
 157. Swiggard WJ, Baytop C, Yu JJ, Li C, Schretzenmair R, Doherty UO, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Can Establish Latent Infection in Resting CD4 + T Cells in the Absence of Activating Stimuli. *J* 2005;
 158. Sun H, Kim D, Li X, Kiselinova M, Ouyang Z, Vandekerckhove L, et al. Th1/17 Polarization of CD4 T Cells Supports HIV-1 Persistence during Antiretroviral Therapy. *J Virol*. 2015;
 159. Lambotte O, Taoufik Y, de Göer MG, Wallon C, Goujard C, Delfraissy JF. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2000;

160. Sonza S, Mutimer HP, Oelrichs R, Jardine D, Harvey K, Dunne A, et al. Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2001;
161. Zalar A, Figueroa MI, Ruibal-Ares B, Baré P, Cahn P, de Bracco MM de E, et al. Macrophage HIV-1 infection in duodenal tissue of patients on long term HAART. *Antiviral Res*. 2010;
162. Micci L, Alvarez X, Iriete RI, Ortiz AM, Ryan ES, McGary CS, et al. CD4 Depletion in SIV-Infected Macaques Results in Macrophage and Microglia Infection with Rapid Turnover of Infected Cells. *PLoS Pathog*. 2014;
163. Perreau M, Levy Y, Pantaleo G. Immune response to HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2013.
164. Chun T, Nickle DC, Justement JS, Meyers JH, Roby G, Hallahan CW, et al. Persistence of HIV in Gut- Associated Lymphoid Tissue despite Long- Term Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* [Internet]. 2008;197(5):714–20. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/527324>
165. Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, Kim EY, Archer J, Kosakovsky Pond SL, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy. *Nature* [Internet]. 2016;530(7588):51–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16933>
166. Fletcher C V., Staskus K, Wietgreffe SW, Rothenberger M, Reilly C, Chipman JG, et al. Persistent HIV-1 replication is associated with lower antiretroviral drug concentrations in lymphatic tissues. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2014 [cited 2018 Apr 27];111(6):2307–12. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1318249111>
167. Huang Y, Hoque MT, Jenabian MA, Vyboh K, Whyte SK, Sheehan NL, et al. Antiretroviral drug transporters and metabolic enzymes in human testicular tissue: Potential contribution to HIV-1 sanctuary site. *J Antimicrob Chemother*. 2016;
168. Chun TW, Nickle DC, Justement JS, Large D, Semerjian A, Curlin ME, et al.

- HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *J Clin Invest.* 2005;115(11):3250–5.
169. Hütter G, Nowak D, Mossner M, Ganepola S, Müßig A, Allers K, et al. Long-Term Control of HIV by *CCR5* Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med.* 2009;
 170. Eriksson S, Graf EH, Dahl V, Strain MC, Yukl SA, Lysenko ES, et al. Comparative Analysis of Measures of Viral Reservoirs in HIV-1 Eradication Studies. *PLoS Pathog.* 2013;9(2).
 171. Henrich TJ, Hanhauser E, Marty FM, Sirignano MN, Keating S, Lee TH, et al. Antiretroviral-free HIV-1 remission and viral rebound after allogeneic stem cell transplantation: Report of 2 cases. *Ann Intern Med.* 2014;
 172. Laanani M, Ghosn J, Essat A, Melard A, Seng R, Gousset M, et al. Impact of the timing of initiation of antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection on the decay of cell-associated HIV-DNA. *Clin Infect Dis.* 2015;60(11):1715–21.
 173. Lodi S, Meyer L, Kelleher AD, Rosinska M, Ghosn J, Sannes M, et al. Immunovirologic control 24 months after interruption of antiretroviral therapy initiated close to HIV seroconversion. *Arch Intern Med.* 2012;
 174. Sáez-Cirión A, Bacchus C, Hocqueloux L, Avettand-Fenoel V, Girault I, Lecuroux C, et al. Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study. *PLoS Pathog.* 2013;9(3).
 175. Vandekerckhove LPR, Wensing AMJ, Kaiser R, Brun-Vézinet F, Clotet B, De Luca A, et al. European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing. *The Lancet Infectious Diseases.* 2011.
 176. Collman R, Hassan NF, Walker R, Godfrey B, Cutilli J, Hastings JC, et al. Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J Exp Med.*

1989;

177. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* (80-). 1996;
178. Deng HK, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;
179. Thielen A, Sichtig N, Kaiser R, Lam J, Harrigan PR, Lengauer T. Improved prediction of HIV- 1 coreceptor usage with sequence information from the second hypervariable loop of gp120. *J Infect Dis* [Internet]. 2010;202(9):1435–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20874088>
180. Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, Brumme CJ, Henrick BM, Wynhoven B, et al. Molecular and Clinical Epidemiology of CXCR4- Using HIV- 1 in a Large Population of Antiretroviral- Naive Individuals. *J Infect Dis*. 2005;
181. Klessig DF, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, et al. Genetic Restriction of HIV-1 Infection and Progression to AIDS by a Deletion Allele of the *CCR5* Structural Gene Cohort Study , Multicenter Hemophilia Cohort Study , San. *Science* (80-). 1996;
182. Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, et al. Reduced Maximal Inhibition in Phenotypic Susceptibility Assays Indicates that Viral Strains Resistant to the *CCR5* Antagonist Maraviroc Utilize Inhibitor-Bound Receptor for Entry. *J Virol*. 2007;
183. Coetzer M, Cilliers T, Ping LH, Swanstrom R, Morris L. Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology*. 2006;
184. A.F.Y. P, S.L. KP, D.D. R, Poon AFY, Kosakovsky Pond SL, Richman DD, et al. Mapping protease inhibitor resistance to human immunodeficiency virus type 1 sequence polymorphisms within patients. *J Virol*. 2007;
185. Brieu N, Portalès P, Carles MJ, Corbeau P. Interleukin-7 induces HIV type 1 R5-to-X4 switch. *Blood*. 2011.

186. Schreiber M, Wachsmuth C, Müller H, Hagen C, Schmitz H, Van Lunzen J. Loss of antibody reactivity directed against the V3 domain of certain human immunodeficiency virus type 1 variants during disease progression. *J Gen Virol.* 1996;
187. Mild M, Kvist A, Esbjörnsson J, Karlsson I, Fenyö EM, Medstrand Patrik P. Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. *Infect Genet Evol.* 2010;
188. Verhofstede C, Nijhuis M, Vandekerckhove L. Correlation of coreceptor usage and disease progression. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2012.
189. Sharon M, Kessler N, Levy R, Zolla-Pazner S, Görlach M, Anglister J. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic β hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure.* 2003;
190. Hartley O, Offord RE. Engineering chemokines to develop optimized HIV inhibitors. *Curr Protein Pept Sci.* 2005;
191. Pastore C, Nedellec R, Ramos A, Pontow S, Ratner L, Mosier DE. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Coreceptor Switching: V1/V2 Gain-of-Fitness Mutations Compensate for V3 Loss-of-Fitness Mutations. *J Virol.* 2006;
192. Derdeyn CA, Decker JM, Bibollet-Ruche F, Mokili JL, Muldoon M, Denham SA, et al. Envelope-Constrained Neutralization-Sensitive HIV-1 after Heterosexual Transmission. *Science (80-).* 2004;303(5666):2019–22.
193. Rong R, Bibollet-Ruche F, Mulenga J, Allen S, Blackwell JL, Derdeyn CA. Role of V1V2 and Other Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Domains in Resistance to Autologous Neutralization during Clade C Infection. *J Virol.* 2007;
194. Archary D, Gordon ML, Green TN, Coovadia HM, Goulder PJ, Ndung'u T. HIV-1 subtype C envelope characteristics associated with divergent rates of chronic disease progression. *Retrovirology [Internet].* 2010;7:92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050445>

195. Pollakis G, Abebe a., Kliphuis a., Chalaby MIM, Bakker M, Mengistu Y, et al. Phenotypic and Genotypic Comparisons of CCR5- and CXCR4-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Biological Clones Isolated from Subtype C-Infected Individuals. *J Virol.* 2004;
196. Sierra S, Kaiser R, Thielen A. Genotypic coreceptor analysis. *Eur J Med Res.* 2007;
197. Rosen O, Sharon M, Quadt-Akabayov SR, Anglister J. Molecular switch for alternative conformations of the HIV-1 V3 region: implications for phenotype conversion. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;
198. Cormier EG, Dragic T. The crown and stem of the V3 loop play distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *J Virol.* 2002;
199. de Brito A, Komninakis SC, Novoa P, de Oliveira RM, Fonseca LA, Duarte AJ, et al. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). *Clin Infect Dis [Internet].* 2006;43(11):1476–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17083025>
200. Leal É, Silva WP, Sucupira MC, Janini LM, Diaz RS. Molecular and structural characterization of HIV-1 subtype B Brazilian isolates with GWGR tetramer at the tip of the V3-loop. *Virology.* 2008;
201. Sucupira MC, Sanabani S, Cortes RM, Giret MT, Tomiyama H, Sauer MM, et al. Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with CXCR4-utilizing strains. *PLoS One [Internet].* 2012;7(1):e30292. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291931>
202. Korber B, Kunstman K. Genetic differences between blood-and brain-derived viral sequences from human immunodeficiency virus type 1-infected patients: evidence of conserved elements. *J Virol.* 1994;
203. Kaleebu P, Nankya IL, Yirell DL, Shafer LA, Kyosiimire-Lugemwa J, Lule DB, et al. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1

- subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2007;45(1):28–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17310935>
204. Ping LH, Nelson JA, Hoffman IF, Schock J, Lamers SL, Goodman M, et al. Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *J Virol* [Internet]. 1999;73(8):6271–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400718>
205. Casper CHE, Clevestig P, Carlenor E, Leitner T, Anzen B, Lidman K, et al. Link between the X4 phenotype in human immunodeficiency virus type 1-infected mothers and their children, despite the early presence of R5 in the child. *J Infect Dis* [Internet]. 2002;186(7):914–21. Available from: %3CGo
206. Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Olson WC, et al. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol* [Internet]. 2003;77(7):4449–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634405>
207. Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, Meyers T, Morris L, Mosier DE. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2011;56(1):9–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20921899>
208. Jakobsen MR, Cashin K, Roche M, Sterjovski J, Ellett A, Borm K, et al. Longitudinal Analysis of CCR5 and CXCR4 Usage in a Cohort of Antiretroviral Therapy-Naïve Subjects with Progressive HIV-1 Subtype C Infection. *PLoS One*. 2013;
209. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* [Internet]. 1996;86(3):367–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756719>
210. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive

- factors produced by CD8+T cells. *Science* (80-). 1995;
211. Haqqani AA, Tilton JC. Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research*. 2013.
 212. Nichols WG, Steel HM, Bonny T, Adkison K, Curtis L, Millard J, et al. Hepatotoxicity observed in clinical trials of aplaviroc (GW873140). *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;
 213. Caseiro MM, Nelson M, Diaz RS, Gathe J, de Andrade Neto JL, Slim J, et al. Vicriviroc plus optimized background therapy for treatment-experienced subjects with CCR5 HIV-1 infection: Final results of two randomized phase III trials. *J Infect*. 2012;
 214. Klibanov OM, Williams SH, Iler CA. Cenicriviroc, an orally active CCR5 antagonist for the potential treatment of HIV infection. *Curr Opin Investig Drugs*. 2010;
 215. Marier JF, Trinh MM, Pheng LH, Palleja SM, Martin DE. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of TBR-652, a novel CCR5 antagonist, in HIV-1-infected, antiretroviral treatment-experienced, CCR5 antagonist-naïve patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;
 216. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;
 217. Emmelkamp JM, Rockstroh JK. CCR5 antagonists: comparison of efficacy, side effects, pharmacokinetics and interactions--review of the literature. *Eur J Med Res*. 2007;
 218. Fätkenheuer G, Nelson M, Lazzarin A, Konourina I, Hoepelman AIM, Lampiris H, et al. Subgroup Analyses of Maraviroc in Previously Treated R5 HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2008;
 219. Church JA. Maraviroc for Previously Treated Patients With R5 HIV-1 Infection. *Pediatrics*. 2009;

220. Lewis M, Mori J, Simpson P. Changes in V3 loop sequence associated with failure of maraviroc treatment in patients enrolled in the MOTIVATE 1 and 2 trials. In Abstracts of the Fifteenth Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, 2008; 2008. Available from: www.retroconference.org/2008
221. Cooper DA, Heera J, Goodrich J, Tawadrous M, Saag M, DeJesus E, et al. Maraviroc versus Efavirenz, Both in Combination with Zidovudine- Lamivudine, for the Treatment of Antiretroviral- Naive Subjects with CCR5- Tropic HIV- 1 Infection. *J Infect Dis.* 2010;
222. Asmuth DM, Goodrich J, Cooper DA, Haubrich R, Rajcic N, Hirschel B, et al. CD4+ T-cell restoration after 48 weeks in the maraviroc treatment-experienced trials MOTIVATE 1 and 2. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2010;
223. Pulido I, Machmach K, Romero-Sánchez MC, Genebat M, Mendez-Lagares G, Ruiz-Mateos E, et al. T-cell changes after a short-term exposure to maraviroc in HIV-infected patients are related to antiviral activity. *J Infect.* 2012;
224. Cooper DA, Heera J, Ive P, Botes M, Dejesus E, Burnside R, et al. Efficacy and safety of Maraviroc vs. Efavirenz in treatment-naive patients with HIV-1: 5-year findings. *AIDS.* 2014;
225. Braun P, Wiesmann F. PHENOTYPIC ASSAYS FOR THE DETERMINATION OF CO-RECEPTOR TROPISM IN HIV-1 INFECTED INDIVIDUALS. *EUROPEAN JOURNAL MEDICAL RESEARCH.* 2007;
226. Lin NH, Kuritzkes DRD. Tropism testing in the clinical management of HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2009.
227. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;
228. Coakley E, Reeves JD, Huang W, Mangas-Ruiz M, Maurer I, Harskamp AM, et al. Comparison of human immunodeficiency virus type 1 tropism profiles in

- clinical samples by the trofile and MT-2 assays. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;
229. Soulié C, Malet I, Lambert-Niclot S, Tubiana R, Thévenin M, Simon A, et al. Primary genotypic resistance of HIV-1 to CCR5 antagonists in CCR5 antagonist treatment-naïve patients. *AIDS.* 2008;
230. Skrabal K, Low AJ, Dong W, Sing T, Cheung PK, Mammano F, et al. Determining human immunodeficiency virus coreceptor use in a clinical setting: Degree of correlation between two phenotypic assays and a bioinformatic model. *J Clin Microbiol.* 2007;
231. Soulie C, Calvez V, Marcelin AG. Coreceptor usage in different reservoirs. *Current Opinion in HIV and AIDS.* 2012.
232. Frange P, Galimand J, Goujard C, Deveau C, Ghosn J, Rouzioux C, et al. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007: the French ANRS CO06 PRIMO Cohort Study. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2009;64(1):135–41. Available from: %3CGo
233. Rozera G, Abbate I, Giombini E, Castagna A, de Luca A, Ceccherini-Silberstein F, et al. Evolution of HIV-1 tropism at quasispecies level after 5 years of combination antiretroviral therapy in patients always suppressed or experiencing episodes of virological failure. *J Antimicrob Chemother.* 2014;
234. Parisi SG, Andreoni C, Sarmati L, Boldrin C, Buonomini AR, Andreis S, et al. HIV coreceptor tropism in paired plasma, peripheral blood mononuclear cell, and cerebrospinal fluid isolates from antiretroviral-naïve subjects. *J Clin Microbiol.* 2011;
235. Verhofstede C, Vandekerckhove L, Eygen V Van, Demecheleer E, Vandenbroucke I, Winters B, et al. CXCR4-using HIV type 1 variants are more commonly found in peripheral blood mononuclear cell DNA than in plasma RNA. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2009;50(2):126–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19131897>

236. Raymond S, Delobel P, Mavigner M, Cazabat M, Encinas S, Souyris C, et al. CXCR4-using viruses in plasma and peripheral blood mononuclear cells during primary HIV-1 infection and impact on disease progression. *AIDS* [Internet]. 2010;24(15):2305–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20808203>
237. Esbjörnsson J, Månsson F, Martínez-Arias W, Vincic E, Biague AJ, da Silva ZJ, et al. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease - indication of an evolving epidemic in West Africa. *Retrovirology*. 2010;
238. Leitner T, Halapi E, Scarlatti G, Rossi P, Albert J, Fenyo EM, et al. Analysis of heterogeneous viral populations by direct DNA sequencing. *Biotechniques*. 1993;
239. Van Baelen K, Vandenbroucke I, Rondelez E, Van Eygen V, Vermeiren H, Stuyver LJ. HIV-1 coreceptor usage determination in clinical isolates using clonal and population-based genotypic and phenotypic assays. *J Virol Methods*. 2007;
240. Swenson LC, Mo T, Dong WWY, Zhong X, Woods CK, Jensen MA, et al. Deep sequencing to infer HIV-1 co-receptor usage: Application to three clinical trials of maraviroc in treatment-experienced patients. *J Infect Dis*. 2011;
241. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, et al. Emergence of CXCR4-Using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-Infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol* [Internet]. 2006;80(10):4909–20. Available from: %3CGo
242. Seclén E, del Mar González M, Lapaz M, Rodríguez C, del Romero J, Aguilera A, et al. Primary resistance to maraviroc in a large set of R5-V3 viral sequences from HIV-1-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2010;
243. Delobel P, Cazabat M, Saliou A, Loiseau C, Coassin L, Raymond S, et al. Primary resistance of CCR5-tropic HIV-1 to maraviroc cannot be predicted by the V3 sequence. *J Antimicrob Chemother*. 2013;

244. Archer J, Braverman MS, Taillon BE, Desany B, James I, Harrigan PR, et al. Detection of low-frequency pretherapy chemokine (CXC motif) receptor 4 (CXCR4)-using HIV-1 with ultra-deep pyrosequencing. *AIDS*. 2009;
245. Archer J, Rambaut A, Taillon BE, Richard Harrigan P, Lewis M, Robertson DL. The evolutionary analysis of emerging low frequency HIV-1 CXCR4 using variants through time-an ultra-deep approach. *PLoS Comput Biol*. 2010;
246. Raymond S, Nicot F, Carcenac R, Jeanne N, Cazabat M, Requena M, et al. No selection of CXCR4-using variants in cell reservoirs of dual-mixed HIV-infected patients on suppressive maraviroc therapy. *Aids*. 2016;30(6):965–8.
247. Pugach P, Marozsan AJ, Ketas TJ, Landes EL, Moore JP, Kuhmann SE. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology*. 2007;
248. Swenson LC, Chui CKS, Brumme CJ, Chan D, Woods CK, Mo T, et al. Genotypic analysis of the V3 region of HIV from virologic nonresponders to maraviroc-containing regimens reveals distinct patterns of failure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;
249. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med* [Internet]. 2011;364(20):1943–54. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1011874>
250. Pilcher CD, Joaki G, Hoffman IF, Martinson FEA, Mapanje C, Stewart PW, et al. Amplified transmission of HIV-1: Comparison of HIV-1 concentrations in semen and blood during acute and chronic infection. *AIDS*. 2007;
251. Passaes CP, Sáez-Ciri3n A. HIV cure research: Advances and prospects. *Virology*. 2014.
252. Hoenigl M, Chaillon A, Moore DJ, Morris SR, Mehta SR, Gianella S, et al. Rapid HIV Viral Load Suppression in those Initiating Antiretroviral Therapy at First Visit after HIV Diagnosis. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(August):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32947>
253. Caby F, Guihot A, Lambert-Niclot S, Guiguet M, Boutolleau D, Agher R, et al.

- Determinants of a low CD4/CD8 ratio in HIV-1-infected individuals despite long-term viral suppression. *Clin Infect Dis.* 2016;62(10):1297–303.
254. Hocqueloux L, Avettand-fènoël V, Jacquot S, Prazuck T, Legac E, Mélard A, et al. Long-term antiretroviral therapy initiated during primary HIV-1 infection is key to achieving both low HIV reservoirs and normal T cell counts. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):1169–78.
255. Pilcher CD, Eron JJ, Galvin S, Gay C, Cohen MS. Acute HIV revisited: New opportunities for treatment and prevention. Vol. 113, *Journal of Clinical Investigation.* 2004. p. 937–45.
256. Brodin J, Zanini F, Thebo L, Lanz C, Bratt G, Neher RA, et al. Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife.* 2016;5(November2016):1–15.
257. Kearney MF, Spindler J, Shao W, Yu S, Anderson EM, O’Shea A, et al. Lack of Detectable HIV-1 Molecular Evolution during Suppressive Antiretroviral Therapy. *PLoS Pathog.* 2014;10(3).
258. Van Zyl GU, Katusiime MG, Wiegand A, McManus WR, Bale MJ, Halvas EK, et al. No evidence of HIV replication in children on antiretroviral therapy. *J Clin Invest.* 2017;127(10):3827–34.
259. Von Stockenstrom S, Odevall L, Lee E, Sinclair E, Bacchetti P, Killian M, et al. Longitudinal Genetic Characterization Reveals That Cell Proliferation Maintains a Persistent HIV Type 1 DNA Pool during Effective HIV Therapy. *J Infect Dis.* 2015;
260. Wang N, Li Y, Han Y, Xie J, Li T. HIV Sequence Diversity During the Early Phase of Infection Is Associated With HIV DNA Reductions During Antiretroviral Therapy. 2017;988(October 2016):982–8.
261. Rieder P, Joos B, Scherrer AU, Kuster H, Braun D, Grube C, et al. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) diversity and tropism in 145 patients with primary HIV-1 infection. *Clin Infect Dis.* 2011;53(12):1271–9.

262. Chalmet K, Dauwe K, Foquet L, Baatz F, Seguin-Devaux C, Van Der Gucht B, et al. Presence of CXCR4-using HIV-1 in patients with recently diagnosed infection: correlates and evidence for transmission. *J Infect Dis* [Internet]. 2012;205(2):174–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22147802>
263. Sheppard HW, Celum C, Michael NL, O'Brien S, Dean M, Carrington M, et al. HIV-1 infection in individuals with the CCR5-Delta 32/Delta 32 genotype: Acquisition of syncytium-inducing virus at seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* [Internet]. 2002;29(3):307–13. Available from: %3CGo
264. Fatkenheuer G. [New kinds of AIDS drugs inhibit HIV entry into the cell. Entry inhibitors soon for oral administration]. *MMW Fortschr Med*. 2005;
265. Gutiérrez C, Díaz L, Vallejo A, Hernández-Novoa B, Abad M, Madrid N, et al. Intensification of antiretroviral therapy with a CCR5 antagonist in patients with chronic HIV-1 infection: Effect on T cells latently infected. *PLoS One*. 2011;
266. Madrid-Elena N, García-Bermejo ML, Serrano-Villar S, Díaz-de Santiago A, Sastre B, Gutiérrez C, et al. Maraviroc is associated with latent HIV-1 reactivation through NF-κB activation in resting CD4 + T cells from HIV-Infected Individuals on Suppressive Antiretroviral Therapy. *J Virol* [Internet]. 2018;92(9):JVI.01931-17. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.01931-17>
267. Hardy WD, Gulick RM, Mayer H, Fätkenheuer G, Nelson M, Heera J, et al. Two-year safety and virologic efficacy of maraviroc in treatment- experienced patients with CCR5-tropic HIV-1 infection: 96-week combined analysis of MOTIVATE 1 and 2. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;
268. Wasmuth J-C, Rockstroh JK, Hardy WD. Drug safety evaluation of maraviroc for the treatment of HIV infection. *Expert Opin Drug Saf*. 2012;
269. Cascajero A, Rastrojo A, Díez-Fuertes F, Hernández-Novoa B, Aguado B, Moreno S, et al. Deep-Sequencing Analysis of the Dynamics of HIV-1 Quasiespecies in Naive Patients during a Short Exposure to Maraviroc. *J Virol*. 2018;

270. Cuzin L, Trabelsi S, Delobel P, Barbuat C, Reynes J, Allavena C, et al. Maraviroc intensification of stable antiviral therapy in HIV-1-infected patients with poor immune restoration: MARIMUNO-ANRS 145 study. In: *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2012.
271. Reuter S, Braken P, Jensen B, Sierra-Aragon S, Oette M, Balduin M, et al. Maraviroc in treatment-experienced patients with HIV-1 infection - experience from routine clinical practice. *Eur J Med Res*. 2010;
272. Puertas MC, Massanella M, Llibre JM, Ballester M, Buzon MJ, Ouchi D, et al. Intensification of a raltegravir-based regimen with maraviroc in early HIV-1 infection. In: *AIDS*. 2014.
273. Symons J, van Lelyveld SFL, Hoepelman AIM, van Ham PM, de Jong D, Wensing AMJ, et al. Maraviroc is able to inhibit dual-R5 viruses in a dual/mixed HIV-1-infected patient. *J Antimicrob Chemother*. 2011;
274. Saracino A, Monno L, Brindicci G, Trillo G, Altamura M, Punzi G, et al. Are the proposed env mutations actually associated with resistance to maraviroc? *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2010.
275. Tilton JC, Wilen CB, Didigu CA, Sinha R, Harrison JE, Agrawal-Gamse C, et al. A Maraviroc-Resistant HIV-1 with Narrow Cross-Resistance to Other CCR5 Antagonists Depends on both N-Terminal and Extracellular Loop Domains of Drug-Bound CCR5. *J Virol*. 2010;
276. Recordon-Pinson P, Raymond S, Marcelin P, Marcelin AG, Soulie C, Descamps D, et al. HIV-1 dynamics and coreceptor usage in maraviroc-treated patients with ongoing replication. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(2):930–5.
277. Wagner GA, Pacold ME, Kosakovsky Pond SL, Caballero G, Chaillon A, Rudolph AE, et al. Incidence and prevalence of intrasubtype HIV-1 dual infection in at-risk men in the United States. *J Infect Dis*. 2014;
278. Naif HM. Pathogenesis of HIV infection. *Infect Dis Rep*. 2013;
279. Shcherbakov DN, Bakulina AY, Karpenko LI, Ilyichev AA. Broadly neutralizing

- antibodies against HIV-1 as a novel aspect of the immune response. *Acta Naturae*. 2015.
280. Simon V, Ho DD, Abdool Karim Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet*. 2006.
281. Ananworanich J, Dubé K, Chomont N. How does the timing of antiretroviral therapy initiation in acute infection affect HIV reservoirs? *Curr Opin HIV AIDS*. 2015;10(1):18–28.

8 ANEXOS

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: **Estudo da dinâmica evolutiva das quasispécies virais R5 e X4 no contexto da infecção pelo HIV-1 e da pressão seletiva decorrente da terapia com Maraviroque.**

Nome do voluntário: _____

Como voluntário (a) você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como finalidade estudar a evolução do vírus HIV contido no seu sangue durante o uso do medicamento Maraviroque. Para a execução do trabalho, até três amostras do vírus contido em seu sangue serão utilizadas para análise genética. Estas coletas ocorrerão nas seguintes fases: uma antes do início do tratamento com o Maraviroque e outras duas coletas (no 6º e 12º meses após início terapia, caso a carga viral esteja indetectável, no entanto se durante o seu acompanhamento de carga viral se tornar detectável, a coleta se dará logo após este resultado).

- Se concordar em participar deste estudo, serão solicitadas informações a respeito de sua saúde.
- O seu nome, endereço ou outra informação que possa identificá-lo (la) **não serão divulgados**, para manter a sua privacidade.
- Caso não concorde em participar do estudo, não haverá nenhuma diferença em seu atendimento ou tratamento neste Hospital.
- Nós coletaremos cerca de 20 ml de seu sangue (uma colher de sopa), da veia do seu braço. Durante a coleta, você poderá experimentar uma leve dor, um pequeno sangramento, e mesmo a formação de um pequeno hematoma no local da picada.
- O Maraviroque já faz parte do conjunto de medicamentos distribuídos pelo Ministério da Saúde e os efeitos colaterais mais comuns são: Tosse, infecção de trato respiratório superior e febre são os efeitos adversos mais comuns, embora não se possa estabelecer com certeza relação de causa e efeito. Também forma verificados casos de hepatotoxicidade associados a quadro de reação alérgica, eventos cardiovasculares isquêmicos (principalmente em pacientes com fatores de risco ou diagnóstico prévio de cardiopatia isquêmica) e Hipotensão postural. Caso algum sintoma apareça contatar seu médico.
- Em qualquer momento você poderá desistir de participar e inclusive pedir para destruir as suas amostras.

Se você estiver de acordo em participar dessa pesquisa e deixar que parte da amostra do seu sangue fique armazenada em nosso laboratório, marque abaixo, caso não esteja de acordo com o armazenamento, também marque abaixo:

() Eu autorizo o armazenamento do meu sangue/ () Eu não autorizo o armazenamento do meu sangue.

Qualquer pesquisa futura não-prevista no contexto do projeto com a sobra do seu sangue será submetida ao Comitê de Ética em pesquisa da Fiocruz para análise. Esse termo será assinado em duas vias de igual teor e uma via ficará com você. Você não receberá nenhum pagamento pela participação neste estudo, mas estará contribuindo com o conhecimento acerca do vírus, e caso tenhamos algum resultado que tenha impacto clínico na sua saúde, faremos todos os esforços para encaminhar ao seu médico e a você.

Pesquisadores: Dr. José Henrique Pilotto médico do Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI).
Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães e Msc. Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite,

pesquisadora e estudante de Doutorado, respectivamente, do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ.

Estaremos à disposição para quaisquer informações adicionais:

Médicos: **Dr. José Henrique Pilotto** - Hospital Geral de Nova Iguaçu (HGNI), Telefone: 38658107; **Dr. Walter Eyer-Silva** - Hospital Universitário Gafrée e Guinle (HUGG), Telefone: 25693025; **Dra. Sandra Wagner** e **Dra. Isabel Tavares**, médicas do Instituto Nacional de Infectologia INI/FIOCRUZ Telefones: 38659118/38659623

Pesquisadores: **Dra Monick Lindenmeyer Guimarães** ou **Msc. Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite**; Telefone: 38658227. E-mail: monicklg@ioc.fiocruz.br.

Consentimento:

Concordo em participar no estudo proposto, doando 20ml de sangue (uma colher de sopa) em cada visita para que possa ser utilizado nas pesquisas científicas que me foram explicadas.

Rio de Janeiro, de de 20.....

Assinatura do voluntário:

Assinatura de testemunha:.....

(caso o voluntário tenha dificuldade de leitura)

Assinatura do Pesquisador responsável:.....

Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo
Cruz (CEP Fiocruz IOC), a saber: Avenida Brasil, 4.036 - Sala: 705 (Prédio da Expansão) -
Manguinhos - RJ - CEP: 21.040-360 - Tels: (21) 3882-9011 Fax: (21) 2561-4815 - E-mail:
cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Versão 2.0 datada de 22 de junho de 2015.
Atendendo às recomendações do parecer do CEP INI número 1.100.718, datado de 10/06/2015

9 APÊNDICE

Trabalhos científicos realizados em período concomitante a tese de Doutorado.

9.1 APÊNDICE 1

Artigo publicado: AIDS Res Hum Retroviruses. 2017 Jan;33(1):41-48. doi: 10.1089/AID.2016.0126. Epub 2016 Aug 9.

Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort.

Leite TC¹, Campos DP², Coelho AB², Teixeira SL¹, Veloso V², Morgado MG¹, Guimarães ML¹.

¹ Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute , FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

² Evandro Chagas Nacional Institute of Infectious Diseases , FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 00, Number 00, 2016
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2016.0126

AID-2016-0126-ver9-Leite_1P
Type: research-article
FULL MANUSCRIPT

Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort

Thaysse Cristina Neiva Ferreira Leite,¹ Dayse Pereira Campos,² Alessandra Brum Coelho,² Sylvia Lopes Maia Teixeira,¹ Valdilea Veloso,² Mariza Gonçalves Morgado,¹ and Monick Lindenmeyer Guimarães¹

Abstract

Viral and host factors are known to play a role in the different patterns of AIDS progression. The cocirculation of HIV-1 subtypes B, F1, B_{BR}, and BF1; the occasional detection of HIV-1 subtype D; and an increasing prevalence of subtype C and other recombinant forms have been described in Rio de Janeiro, Brazil. The aim of this study was to evaluate the potential association of HIV-1 subtypes circulating among HIV-1+ individuals in Rio de Janeiro with AIDS disease progression. For this purpose, 246 HIV-1 individuals under clinical and laboratory follow-up from 1986 to 2011 were classified according to their progression to AIDS in typical progressors ($n = 133$), rapid progressors ($n = 95$), and long-term nonprogressors ($n = 18$). The *env*-gp120 region was amplified and sequenced. Neighbor-joining phylogenetic inferences were performed in Mega 6 and bootscan analysis was performed in Simplot 3.5.1. The Kaplan–Meier method and Cox modeling were performed to determine the time until an AIDS-defining event based on the HIV-1 subtypes/variants. Similar AIDS progression rates were observed among individuals infected with HIV-1 subtype B and variant B_{BR}. However, a direct association between more rapid AIDS progression and HIV-1 subtypes, D and BF1, was confirmed in the multivariate analysis, corroborating previous results. Our findings contribute to the investigation of the possible influence of HIV-1 subtypes in AIDS outcome.

9.2 APÊNDICE 2

Artigo aceito para publicação em 09 Jan 2019. *Frontiers in Microbiology* |
doi: 10.3389/fmicb.2019.00020

HIV-1 Molecular epidemiology, transmission clusters and transmitted drug resistance mutations in Central Brazil

Tayana S. Tanaka^{1, 2*}, Thaysse C. Leite³, SOLANGE Z. FREITAS⁴, Gabriela A. Cesar¹, Grazielli R. Rezende¹, Andrea S. Lindenberg⁴, Monick L. Guimarães³ and Ana Rita C. Motta-Castro^{1, 5}



ORIGINAL RESEARCH
published: 31 January 2019
doi: 10.3389/fmicb.2019.00020



HIV-1 Molecular Epidemiology, Transmission Clusters and Transmitted Drug Resistance Mutations in Central Brazil

Tayana Serpa Ortiz Tanaka^{1*}, Thaysse Ferreira Leite², Solange Zacalusni Freitas³, Gabriela Alves Cesar¹, Grazielli Rocha de Rezende⁴, Andrea De Siqueira Campos Lindenberg³, Monick Lindenmeyer Guimarães^{2†} and Ana Rita Colmbra Motta-Castro^{1,4,5†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Joris Hemelaar,
University of Oxford, United Kingdom

Reviewed by:

Bin Su,
Capital Medical University, China
Antonio Mas,
University of Castilla La Mancha,
Spain

*Correspondence:

Tayana Serpa Ortiz Tanaka
tayato@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 15 October 2018

Accepted: 09 January 2019

Published: 31 January 2019

Citation:

Tanaka TSO, Leite TF, Freitas SZ,
Cesar GA, de Rezende GR,
Lindenberg ADSC, Guimarães ML
and Motta-Castro ARC (2019) HIV-1
Molecular Epidemiology, Transmission
Clusters and Transmitted Drug
Resistance Mutations in Central
Brazil. *Front. Microbiol.* 10:20.
doi: 10.3389/fmicb.2019.00020

¹ Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, ² Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil, ³ University Hospital Maria Aparecida Pedrossian, HUMAP, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, ⁴ Laboratory of Clinical Immunology, FAFAPAN, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil, ⁵ Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz Foundation, Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brazil

We aimed to characterize HIV-1 molecular epidemiology and transmission clusters among heterosexual (HET) and men who have sex with men (MSM) individuals, as well as transmitted drug resistance mutations (TDRM) in Central-Western Brazil. This cross-sectional survey was conducted among 190 antiretroviral naïve HIV-1 infected individuals. Proviral DNA was extracted, and nested PCR amplified partial *polymerase* gene (PR/RT). After sequencing, subtypes were assigned, and the sequences were analyzed for the occurrence of possible transmission networks. Calibrated Population Resistance (CPR) tool from Stanford HIV Database was used to investigate the presence of TDRM. Among 150 individuals whose samples were successfully sequenced, the most prevalent HIV-1 subtype was B, followed by recombinant forms. The occurrence of twenty transmission clusters composed by at least two sequences was verified, suggesting the existence of transmission clusters among individuals from the same or distinct sexual orientations. Intermediate level of TDRM (12%) was found in the study population, and almost half of the subjects with TDRM had more than one resistance mutation. No correlations between sexual orientation and the presence of TDRM, HIV-1 subtypes/recombinants forms were verified. Taken together, the necessity of the continuous monitoring of the TDRM to verify the importance of pre-genotyping and to delineate future strategies in primary antiretroviral therapy. Likewise, the knowledge of the HIV-1 transmission networks in Brazil would allow the implementation of effective HIV-1 prevention strategies in local settings.

Keywords: HIV, MSM, molecular epidemiology, transmitted drug resistance, transmission network