

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

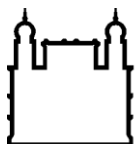
Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Ciências – Cooperação IOC-ILMD, Instituto
Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) / Instituto Leônidas Maria Deane (ILMD/Fiocruz)

DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA
ADQUIRIDAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO
AMAZONAS

YURY OLIVEIRA CHAVES

MANAUS

Julho 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Ciências – Cooperação IOC-ILMD,
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) / Instituto Leônidas Maria Deane (ILMD/Fiocruz)**

YURY OLIVEIRA CHAVES

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA
ADQUIRIDAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO AMAZONAS**

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

Orientador (es): Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães
Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira

MANAUS

Julho 2021

Ficha Catalográfica

Oliveira Chaves, Yury.

DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO AMAZONAS / Yury Oliveira Chaves. - Rio de Janeiro, 2021.

142 f.; il.

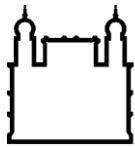
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientadora: Monick Lindenmeyer Guimarães.

Co-orientador: Paulo Afonso Nogueira.

Bibliografia: f. 104-117

1. HIV-1. 2. Diversidade genética. 3. Falha terapêutica. 4. Terapia antirretroviral combinada. 5. Mutação de resistência a Drogas. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Ciências – Cooperação IOC-ILMD,
Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) / Instituto Leônidas Maria Deane (ILMD/Fiocruz)**

AUTOR: YURY OLIVERIA CHAVES

DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO AMAZONAS

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães

Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira

Aprovada em: 30/07/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Jose Henrique Pilotto - Presidente (IOC/FIOCRUZ)

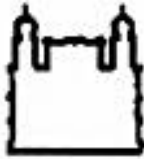
Prof. Dra. Adele Schwartz Benzaken (FMT- HVD/AM)

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado (UFPA/PA)

Prof. Dra. Izabella Picinin Safe de Lacerda (FMT- HVD/AM)

Prof. Dr. Francisco Campello Amaral Mello (IOC/FIOCRUZ)

Manaus, 30 de julho de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado acadêmico em Biologia Parasitária de Yury Oliveira Chaves, sob orientação da Dr^a Monick Lindenmeyer Guimarães e coorientado pelo Dr. Paulo Afonso Nogueira. Ao trigésimo dia do mês de julho de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da tese de doutorado acadêmico intitulada: **"Diversidade genética do HIV-1 e mutações de resistência adquiridas em pessoas vivendo com HIV/AIDS no Amazonas"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor 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. José Henrique da Silva Pilotto – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Adele Schwartz Benzaken– FIOCRUZ/AM, Dr. Luiz Fernando Almeida Machado – UFPAPA, e como suplentes: Dr^a. Izabella Picinin Saife de Lacerda- UEA/AM e Dr. Francisco Campello do Amaral Mello - IOC/FIOCRUZ. Após arguir o candidato e considerando que o mesmo 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 acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutor em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação do aluno e de todos o membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador Adjunto do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 30 de julho de 2021.

Dr. José Henrique da Silva Pilotto (Presidente da Banca):

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador Adjunto do Programa):

Dedicatória

Dedico essa tese de doutorado a todos os leitores que assim como eu acreditam na ciência como um farol aos navegantes perdidos em suas mais complicadas perguntas.

Agradecimentos

Oriundo de Bairro pobre de Fortaleza-CE, Filho de família muito humilde que me deu o máximo que podia, concedendo-me algo que meus pais nunca tiveram, a oportunidade de estudar e avançar num curso superior, sou o primeiro de minha família a conseguir um mestrado e agora um doutorado, apesar de tudo que passamos, agradeço a minha família por me ajudar nos primeiros degraus.

Esse pequeno parágrafo é muito pouco para agradecer a minha amada Melyssa de Souza Pinheiro que apesar de jovem no início do meu doutorado, segurou a barra com uma leoa, sempre me incentivando e me apoiando, algumas vezes disputando atenção entre minhas longas noites de estudo e análise de dados, você sempre será meu pedaço de vida social que mais gosto, rs..., e Família Pinheiro, por esses longos anos de convivência, apesar de não entenderem bem a fase do doutorado, ajudaram-me em tudo o que foram capazes. Amém.

Meus respeitosos agradecimentos a todos que compõem o Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ-RJ que durante minha jornada me acolheram, não somente na parte experimental, mas também, na parte social, durante minha passagem pelo laboratório, senti como se já tivesse anos de convivência nesse laboratório maravilhoso, grandes e ótimos foram os passeios pelo Rio de Janeiro, se tem um lugar que tenho referência em bem-estar, esse será sempre o lugar que irei recordar, apesar de nem todos os colegas que fiz estarem aqui comigo nesse momento espacial.

Manifesto aqui minha gratidão aos meus orientadores, Dr Paulo Afonso Nogueira, que desde 2008, vem acompanhando minha jornada acadêmica, um amigo científico que me ensinou a ser resiliente, perseverante e acima de tudo, esforçado.

Agradeço a Dra Monick Lindenmeyer Guimarães que me surpreendeu, numa fase tão difícil da minha vida que para esclarecer teria que escrever um livro a respeito, mas em resumo você me trouxe muita coisa que eu já havia perdido. Não só me ensinou biologia molecular, mas também mostrou o quanto sou capaz. Ótimos foram os passeios em família nos finais de semana, eles simplesmente trouxeram muita alegria durante minha estada no Rio de Janeiro. Muito Obrigado

Muito me alegra saber que nessa caminhada pude conhecer pessoas que moldaram minha visão de ciência quando se fala de PVHIVA; Flávio Ribeiro, Diogo Rafael e Vanessa Campos foram luz no meu caminho durante esse doutorado, ensinando-me a importância do retorno do estudo científico para promoção de qualidade de vida para a população.

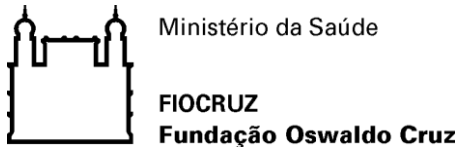
Nesses longos anos de pesquisa, desde a minha graduação, sempre esteve presente a figura ilustre de Oswaldo Cruz, representado principalmente pelo instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ-AM, nesse complexo de instituições, acolheu, incentivou e ensinou-me tudo o que eu sei sobre fazer ciência, convivendo com pesquisadores, funcionários e alunos com os quais tive o prazer de colaborar e ter como amigos. A FIOCRUZ não faz apenas ciência, ela constrói histórias fornecendo a oportunidade que jamais sonharia ter. Agradeço.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro e a Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Ciências – Cooperação IOC-ILMD, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) / Instituto Leônidas Maria Deane (ILMD/Fiocruz) pela oportunidade de realizar o doutorado.

Epígrafe

“Se não existe vida fora da Terra, então o universo é um grande desperdício de espaço”

Carl Sagan



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

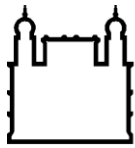
DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1 E MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA ADQUIRIDAS EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/AIDS NO AMAZONAS

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS – COOPERAÇÃO IOC-ILMD, INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC/FIOCRUZ)/ INSTITUTO LEÔNIDAS MARIA DEANE (ILMD/FIOCRUZ)

Yury Oliveira Chaves

A falha virológica ou persistência de viremia detectável em pessoas vivendo com HIV/aids sob o uso de terapia antirretroviral pode ocorrer devido à baixa adesão ao tratamento e/ou mutações de resistência às drogas (DRM). No Brasil, a região Norte apresenta um dos piores cenários epidemiológicos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Assim, este estudo tem como objetivo investigar a diversidade genética do HIV-1 e DRM em Manaus. O estudo de corte transversal incluiu pessoas que vivem com HIV em terapia antirretroviral combinada e que apresentaram falha virológica entre 2018-2019. As sequências das regiões protease/transcriptase reversa (PR/RT) e C2V3 gp120 (Env) do envelope viral foram analisadas para determinar subtipos/variantes de HIV-1, DRMs e tropismo viral. Foram recrutados 100 indivíduos, no entanto foi possível obter sequência da PR/RT de noventa e dois deles, e estes foram analisados no estudo. Aproximadamente 72% deles eram do sexo masculino e 74% se autodeclararam heterossexuais. A inferência filogenética (PR/RT-Env) mostrou que a maioria das sequências era do subtipo B (67,4%), seguida por genomas mosaico BF1(14,1%) ou BC (1,1%) e sequências F1 (1,1%) e C (1,1%). Para 14 amostras só foi possível amplificar a PR/RT e destas 14,1% eram subtipo B e 1,1% C. Dentre as 83 amostras do subtipo B na PR/RT, 84,3% eram pandêmicas (B_{PAN}) e 15,7% eram Caribenhas (B_{CAR}). As análises da região do *env* demonstraram uma prevalência de 9% de variantes B_{BR} e o tropismos das sequências analisadas apresentou uma prevalência de 66,7 % de vírus R5 trópicos. As DRMs mais frequentes foram M184I/V (82,9%) para inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeo (ITRN), K103N/S (63,4%) para inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídeo (ITRNN) e V82A/L/M (7,3%) para inibidores de protease (PI). A análise de DRM mostrou altos níveis de resistência para lamivudina e efavirenz em mais de 82,9% dos indivíduos, embora tenha sido observada baixa (7,7%) resistência cruzada à etravirina. Um baixo nível de resistência aos inibidores da protease foi encontrado e incluiu pacientes que tomam atazanavir/ritonavir (16,6%) e lopinavir (11,1%). Foi demonstrado alta susceptibilidade aos inibidores de protease, assim como aos ARVs: Darunavir, Etravirina e Maraviroque. A via de resistência às mutações análogas da timidina-2 (TAM-2) foi maior em B_{CAR} do que em B_{PAN} . Resultados semelhantes aos de outros estudos brasileiros com relação à resistência às drogas para HIV foram observados; no entanto, ressaltamos a necessidade de estudos adicionais sobre as variantes do subtipo B_{CAR} . Os estudos de epidemiologia molecular são uma ferramenta importante para monitorar a prevalência de resistência aos medicamentos para o HIV e podem influenciar as políticas públicas de saúde.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

HIV-1 GENETIC DIVERSITY AND RESISTANCE MUTATIONS ACQUIRED IN PEOPLE LIVING WITH HIV/AIDS IN THE AMAZON

ABSTRACT

PHD THESIS IN SCIENCE – IOC-ILMD COOPERATION, OSWALDO CRUZ INSTITUTE (IOC/FIOCRUZ)/ LEÔNIDAS MARIA DEANE INSTITUTE (ILMD/FIOCRUZ)

Yury Oliveira Chaves

Virological failure or persistence of detectable viremia in people living with HIV/AIDS under antiretroviral therapy may occur due to poor treatment adherence and/or drug resistance mutations (DRM). In Brazil, the North region presents one of the worst epidemiological scenarios for the human immunodeficiency virus (HIV). Thus, this study aims to investigate the genetic diversity of HIV-1 and DRM in Manaus. The cross-sectional study included people living with HIV on combination antiretroviral therapy and who experienced virological failure between 2018-2019. The sequences of the protease/reverse transcriptase (PR/RT) and C2V3 gp120 (Env) regions of the viral envelope were analyzed to determine HIV-1 subtypes/variants, DRMs and viral tropism. One hundred individuals were recruited, however it was possible to obtain a PR/RT sequence from ninety-two of them, and these were analyzed in the study. Approximately 72% of them were male and 74% self-declared heterosexual. Phylogenetic inference (PR/RT-Env) showed that most sequences were of subtype B (67.4%), followed by mosaic genomes BF1 (14.1%) or BC (1.1%) and F1 sequences (1.1%) and C (1.1%). For 14 samples it was only possible to amplify PR/RT and of these 14.1% were subtype B and 1.1% C. Among the 83 samples of subtype B in PR/RT, 84.3% were pandemic (B_{PAN}) and 15.7% were Caribbean (B_{CAR}). Analyses of the env region showed a prevalence of 9% of BBR variants and the tropism of the analyzed sequences showed a prevalence of 66.7% of tropic R5 viruses. The most frequent DRMs were M184I/V (82.9%) for nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), K103N/S (63.4%) for non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) and V82A/L/M (7.3%) for protease inhibitors (PI). DRM analysis showed high levels of resistance to lamivudine and efavirenz in more than 82.9% of subjects, although low (7.7%) cross-resistance to etravirine was observed. A low level of resistance to protease inhibitors was found and included patients taking atazanavir/ritonavir (16.6%) and lopinavir (11.1%). High susceptibility to protease inhibitors, as well as to ARVs: Darunavir, Etravirine and Maraviroque has been demonstrated. The pathway of resistance to thymidine analog-2 (TAM-2) mutations was greater in B_{CAR} than in B_{PAN} . Similar results to other Brazilian studies regarding HIV drug resistance were observed; however, we emphasize the need for further studies on variants of the B_{CAR} subtype. Molecular epidemiology studies are an important tool to monitor the prevalence of HIV drug resistance and can influence public health policies.

INDICE

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1	Vírus da imunodeficiência humana (HIV)	20
1.1.1	HIV/Aids: breve histórico	20
1.2	Epidemiologia do HIV/Aids	22
1.3	Estrutura do HIV	25
1.4	Ciclo Replicativo do HIV	27
1.5	Terapia antirretroviral	32
1.5.1	Inibidores de entrada e fusão	34
1.5.2	Inibidores da transcriptase reversa	35
1.5.3	Inibidores de protease	36
1.5.4	Inibidores de integrase	37
1.6	Tratamento do HIV no Brasil	38
1.7	Origem e classificação molecular do HIV	50
1.7.1	Subtipo B do HIV-1	54
1.8	Epidemiologia molecular do HIV	57
1.8.1	Epidemiologia molecular do HIV no Brasil	59
1.8.2	Região Norte	63
2.	JUSTIFICATIVA	65
3.	OBJETIVO GERAL	67
3.1	Objetivos Específicos	67
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1	População de Estudo	68
4.2	Coleta de Amostras e processamento das amostras	69
4.3	Extração de RNA e RT-PCR	69
4.4	Amplificação, purificação e sequenciamento da PR/RT e C2-V3	69
4.5	Predição genotípica dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4	73
4.6	Análise de mutações de resistência aos ARV	73
4.7	Análise estatística	73
5.	RESULTADOS	74
5.1	Dados epidemiológicos e clínicos	74
6.	DISCUSSÃO	91
7.	CONCLUSÃO	102
8.	REFERÊNCIAS	103
9.	ANEXOS	118
	Anexo 01 - Parecer Consubstanciado do CEP	118

Anexo 02 - Parecer Consubstanciado do CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante	124
Anexo 03 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	129
Anexo 04 – Ficha Clínica e de Investigação Soro-epidemiológica.....	131
Anexo 05 – Artigo Científico Publicado na Revista Biomed Research Internacional .	133

Índice de Figuras

Figura 1 - Taxa de detecção de aids (por 100.000 hab.) segundo região de residência, por ano de diagnóstico.....	23
Figura 2 - Taxa de detecção de aids (por 100.000 hab.) e percentual de declínio ou incremento, segundo UF de residência, por ano de diagnóstico.....	24
Figura 3 - Coeficiente de mortalidade padronizado de aids (por 100.000 hab.) e percentual de declínio ou incremento segundo UF de residência, por ano de diagnóstico.	25
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura madura do HIV-1.	26
Figura 5 - Genoma proviral: genes estruturais e acessórios do HIV-1, posições relativas ao isolado HXB2.	27
Figura 6 - Ciclo replicativo do HIV e papel de enzimas virais.	29
Figura 7 - Tropismo viral para os correceptores CCR5 e CXCR4.	30
Figura 8 - História natural da infecção pelo HIV.....	32
Figura 9 - Principais alvos das drogas antirretrovirais e como atuam no ciclo de replicação do vírus.	33
Figura 10 - Mecanismo de ação de Inibidores da transcriptase reversa.	36
Figura 11. Processamento da enzima integrase do HIV-1 e mecanismo de ação de inibidores de integrase.	38
Figura 12 - Cascata de cuidado contínuo do HIV.	43

Figura 13 - Mutações resistência associados aos inibidores de transcriptase reversas não análogos de nucleosídeos.	47
Figura 14 - Esquema de barreira genética à resistência e potência de antirretrovirais selecionados.	49
Figura 15 - Origem do HIV e sua diversidade genética.	52
Figura 16 – Classificação genética do HIV-1.	54
Figura 17 - Dinâmica espacial do Subtipo B do HIV-1 e variantes em todo o mundo...55	
Figura 18 – Estrutura tridimensional da glicoproteína gp120 mostrando as regiões variáveis (v) e entre estas as regiões conservadas.	57
Figura 19 - Distribuição global dos subtipos do HIV-1 e formas recombinantes.....	59
Figura 20 - Diversidade do HIV no Brasil e origem dos subtipos B, C e F1 brasileiros.60	
Figura 21. Prevalência de subtipos e recombinantes do HIV-1 no Brasil baseada no número de sequências do gene <i>pol</i> (PR/RT), posição 2253–3272 (relativa ao isolado HXB2).	61
Figura 22. Proporção estimada de das variantes B _{CAR} e B _{PAN} entre indivíduos infectados pelo subtipo B do HIV-1 de diferentes estados brasileiros.	62
Figura 23 - Mapa região Norte brasileira retratando a prevalência estimada de subtipos e formas recombinantes do HIV entre indivíduos infectados pelo HIV nos diferentes estados.	64
Figura 24 - Árvore filogenética de Neighbor Joining das 92 amostras amplificadas e sequenciadas na região <i>PR/RT</i>	77

Figura 25 - Detecção recombinações do HIV-1 das 92 amostras amplificadas na região <i>pol</i>	79
Figura 26 - Árvore filogenética de Neighbor Joining das 4 amostras amplificadas e sequenciadas na região PR/RT recombinantes e sequências CRF_BF e BC de referência.	80
Figura 27 - Árvore filogenética máxima verossimilhança das 82 amostras do subtipo B amplificadas na região <i>pol</i>	81
Figura 28 - Árvore filogenética de Neighbor Joining das 78 amostras amplificadas na região <i>env</i>	82
Figura 29 - Frequência de mutações de resistência a drogas do HIV-1 de acordo com a classe de inibidores e TAMs detectados em 82 indivíduos.	85
Figura 30 - Comparação de DRM entre variantes de subtipo B: B _{CAR} (n = 13) e B _{PAN} (n = 61).	89

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Esquema de indicações de terapia antirretroviral combinada.	42
Tabela 2 - Primers utilizados na reação de nested-PCR para regiões PR/RT e Env metodologia in house.	70
Tabela 3 - Primers utilizados somente no sequenciamento.	71
Tabela 4 - Dados epidemiológicos dos 92 pacientes HIV soropositivos em falha virológica sob uso da terapia antirretroviral.	75
Tabela 5 - Subtipagem e genotipagem dos 92 pacientes HIV com falha.	83
Tabela 6 - Prevalência de ARV usados em qualquer momento durante o tratamento e em uso, prevalência dos DRMs mais prevalentes para cada classe de ARV em relação à corrente ARV em uso e percentual de indivíduos com alta resistência aos ARV em relação ao ARV utilizado.....	86
Tabela 7 - Prevalência de mutações de resistência a múltiplas drogas.	87
Tabela 8 - Perfil de resistência aos ARVs das 13 sequências de HIV-1 variante BCAR de acordo com o algoritmo de interpretação de resistência genotípica do programa Stanford HIVdb.	90

Lista de Siglas e Abreviaturas

3TC	Lamivudina
ABC	Abacavir
	Resistência adquirida a medicamentos para HIV (do Inglês,
ADR	<i>Acquired HIV Drug Resistance</i>)
	Síndrome da imunodeficiência adquirida (do Inglês, <i>Acquired</i>
AIDS	<i>Immunodeficiency Syndrome</i>)
ARV	Antirretroviral
ARVs	Antirretrovirais
AZT	Zidovudina
AZT/r	Atazanavir / Ritonavir
Bbr	Variante Brasileira do subtipo B HIV-1
Bcar	Variante Caribenha do subtipo B do HIV-1
Bpan	Variante Pandêmica do subtipo B HIV-1
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CD	Cluster de diferenciação (do Inglês, <i>Cluster of Differentiation</i>)
	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do Inglês, <i>Centers</i>
CDC	<i>for Disease Control and Prevention</i>)
cDNA	DNA Complementar
	Forma Recombinante Circulante (do Inglês, <i>Circulating</i>
CRF	<i>Recombinant Form</i>)
CV	Carga Viral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do Inglês, <i>Desoxyribonucleic Acid</i>)

	Mutação de resistência às drogas (do Inglês, <i>Drug Resistance</i>
DRM	<i>Mutation</i>)
DRV	Darunavir
DTG	Dolutegravir
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EFV	Efavirenz
ENV	Envelope
ETR	Etravirina
FMT-HVD	Fundação De Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado
FTC	Emtricitabina
gp	Glicoproteína
HIVDB	<i>Stanford Hiv Drug Resistance Database</i>
	Vírus T-Linfotrópico Humano (do Inglês, <i>Human T-Lymphotropic</i>
HTLV	<i>Virus</i>)
ILMD	Instituto Leônidas e Maria Deane
INI	Inibidor de Integrase
IP	Inibidores de Protease
IQR	Intervalo interquartil
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
ITRN	Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos de Nucleotídeos
	Inibidores da Transcriptase Reversa Não Análogos de
ITRNN	Nucleosídeos
	Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo
LABAIDS	Cruz IOC/FIOCRUZ-RJ

	Síndrome associada à linfadenopatia (do Inglês,
LAS	<i>Lymphadenopathy Associated Syndrome</i>)
	Vírus associado à linfadenopatia (do Inglês, <i>Lymphadenopathy</i>
LAV	<i>Associated Virus</i>)
LPV	Lopinavir
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
NVP	Nevirapina
ONU	Organização das Nações Unidas
PCDT	Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas
PCR	Reação em cadeia de polimerase
POL	Polimerase
PR	Protease
PVHIVA	Pessoas vivendo com HIV e aids
RNA	Ácido Ribonucleico
RPV	Rilpivirina
RT	Transcriptase Reversa
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
SIVcpz	SIV de Chimpanzés - Pan Troglodytes
SIVsm	SIV de Sooty Mangabeys
SK	Sarcoma de Kaposi
SPR	Subtree-Pruning-Regrafting
SUS	Sistema Único de Saúde
TAM	Mutações Análogas da Timidina
TARV	Terapia Antirretroviral

TAT	Proteína Transativadora
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDF	Tenofovir
	Resistência às drogas transmitida (do Inglês, <i>Transmitted Drug</i>
TDR	<i>Resistance</i>)
	Mutação transmitida de resistência às drogas (do Inglês,
TDRM	<i>Transmitted Drug Resistance Mutation</i>)
	Forma Recombinante Única (do Inglês, <i>Unique Recombinant</i>
URF	<i>Form</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da imunodeficiência humana (HIV)

1.1.1 HIV/Aids: breve histórico

Resumidamente, os primeiros casos verificados retrospectivamente no continente americano da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) datam de 1978, já no Brasil, o primeiro caso foi em 1980. Estudos filogenéticos traçam a entrada do HIV-1 em 1969 (Haiti) e em 1971 (EUA) (GALVÃO, 2002; RUTHERFORD et al., 1990; WOROBEY et al., 2016). Em 1981, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (Centers for Disease Control and Prevention - CDC) registrou os primeiros casos em indivíduos jovens que apresentavam um tipo específico de câncer de pele, conhecido como Sarcoma de Kaposi (SK) e/ou pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, assim como comprometimento do sistema imune. Tais fatos levaram os cientistas da época a concluir que se tratava de uma nova doença ainda não classificada de etiologia provavelmente infecciosa e transmissível (CDC, 1982; CURRAN; JAFFE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2011). Esta nova doença foi inicialmente detectada em moradores das cidades de São Francisco e Nova Iorque, e em sua maioria acometia homossexuais, e por isso foi vulgarmente denominada de “câncer gay”, e que posteriormente descrita como síndrome da imunodeficiência adquirida (aids).

Ainda 1982, a aids, foi verificada em 71% em grupos específicos de homens homossexuais e bissexuais, além de hemofílicos (1%), haitianos que viviam nos Estados Unidos (5%) e usuários de droga injetável (17%) (CDC, 1982; CURRAN; JAFFE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2011). Em 1983, foram notificados

casos em crianças, profissionais de saúde e em heterossexuais, havendo o entendimento de que se tratava de uma doença infecciosa de origem viral devido a semelhança com outras infecções. (CURRAN; JAFFE; CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2011; GALLO; MONTAGNIER, 1988).

Em 1983, Barré-Sinoussi e colaboradores fizeram o isolamento do vírus do sangue de um paciente que apresentava síndrome de linfadenopatia persistente (“Lymphadenopathy Associated Syndrome”, LAS); neste, observaram a presença da enzima transcriptase reversa, se tratando assim de um retrovírus (BARRE-SINOUSSE et al., 1983). Essa característica observada se assemelhava a outros tipos de vírus como o “Human T-cell Leukemia Virus” (HTLV) isolado de pacientes que tinham aids e que foram reportados pelo estudo científico de Gallo e colaboradores no mesmo ano (GALLO et al., 1983), e no ano seguinte sugeriram a denominação desse novo vírus como HTLV-III (GALLO et al., 1984)

Em 1984, um estudo publicado por Montagnier e colaboradores trazia à luz o mecanismo que poderia estar relacionado com síndrome de linfadenopatia persistente, evidenciando que o vírus tinha uma relação com a infecção de linfócitos T-CD4+, em experimentos *in vitro*, e causava a destruição destas células alvo (MONTAGNIER et al., 1984). Nesse mesmo ano, outro grupo de pesquisa isolava o vírus causador da aids de indivíduos com diferentes características clínicas moradores de São Francisco e o denominam de retrovírus associado à aids (“AIDS- Associated Retrovírus”, ARV) (LEVY et al., 1984).

Em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia viral recomendou que três retrovírus (LAV, HTLV-III e ARV), ou seja o vírus causador da aids fosse nomeado separadamente como “Human Immunodeficiency Virus” (HIV) (COFFIN et al., 1986).

1.2 Epidemiologia do HIV/Aids

Estima-se que 37,7 milhões de pessoas estejam vivendo com HIV no mundo, e foram contabilizados em torno 1,5 milhões de novas infecções por HIV, e 680 mil óbitos relacionados à aids em 2020 (UNAIDS, 2021). De acordo com dados da UNAIDS deste total de 37,7 milhões de PVHIVA 25,4 milhões vivem na África, seguido de 3,7 milhões das Américas e 3,7 milhões no Sudeste da Ásia, 2,6 milhões na Europa, 1,9 milhões no pacífico ocidental e 420 mil no Mediterrâneo oriental (UNAIDS, 2021).

No Brasil, neste mesmo ano foram notificados 41.919 casos de infecção pelo HIV, sendo 4.948 (11,8%) na região Norte, 10.752 (25,6%) casos na região Nordeste, 14.778 (35,3%) na região Sudeste, 7.639 (18,2%) na região Sul e 3.802 (9,1%) na região Centro-Oeste (BRASIL, 2020a). A taxa de detecção de aids no Brasil tem apresentado, nos últimos cinco anos, uma média de 39 mil novos casos por ano. Contudo, vêm se registrando um declínio no número de casos de aids desde 2013. Os casos de aids identificados desde 1980 até julho de 2020 mostram uma concentração nas regiões Sudeste (51,0%) e Sul (19,9%) e menor concentração nas regiões nordeste (16,2%), norte (6,7%) e centro-oeste (6,2%) (BRASIL, 2020a). Em um período de dez anos (2009 – 2019), a taxa de detecção de aids apresentou queda de 17,2%, ou seja, passou a uma taxa de incidência de 21,5 casos por 100 mil habitantes e, em 2009 para 17,8 casos de aids a cada 100.000 habitantes em 2020 (BRASIL, 2020a). Todavia, esse declínio não ocorreu em todas as regiões do Brasil. As regiões Norte e Nordeste apresentaram crescimento na detecção de casos de aids. Em 2009, as taxas registradas eram de 20,9 (Norte) e 14,1 (Nordeste) casos por 100

mil habitantes, enquanto em 2019 foram de 26,0 (Norte) e 15,7 (Nordeste) (Fig.1) (BRASIL, 2020a).

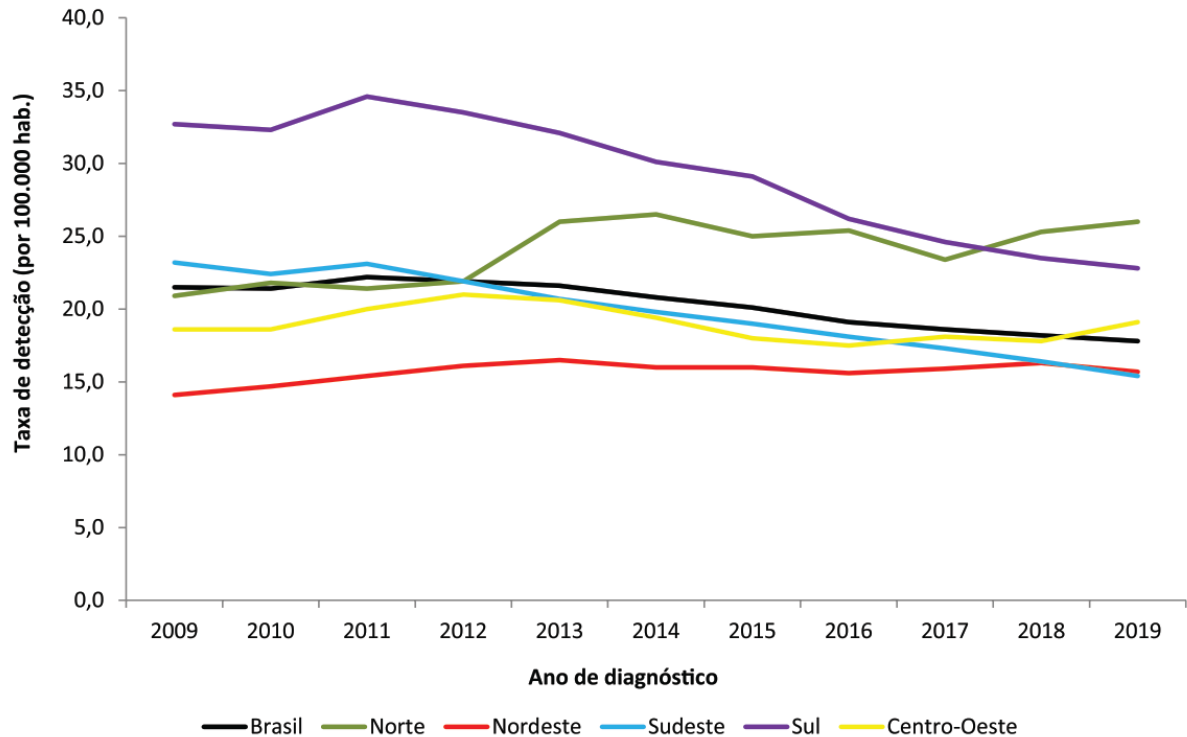


Figura 1 - Taxa de detecção de aids (por 100.000 hab.) segundo região de residência, por ano de diagnóstico. Brasil, 2009 a 2019* (BRASIL, 2020a).

Comparando os dados epidemiológicos dos anos de 2009 e 2019, apresentados na figura 2, o estado do Amazonas apresentou um aumento de 9,8% na taxa de detecção de aids passando de 31,7 para 34,8, apresentando juntamente com o estado de Roraima as maiores taxas, apesar do decréscimo de 4,5% (Fig.3) no coeficiente de mortalidade padronizado de aids no comparativo entre 2009 e 2019 (6,7 – 6,4).

Em 2019, verificou-se que onze estados do Brasil demonstraram coeficiente de mortalidade com média superior a nacional de 4,1 óbitos por 100.000 habitantes, e que o estado do Amazonas (6,4) ficou em 4º lugar, já a capital Manaus ocupou o 3º lugar entre as capitais brasileiras (BRASIL, 2020a).

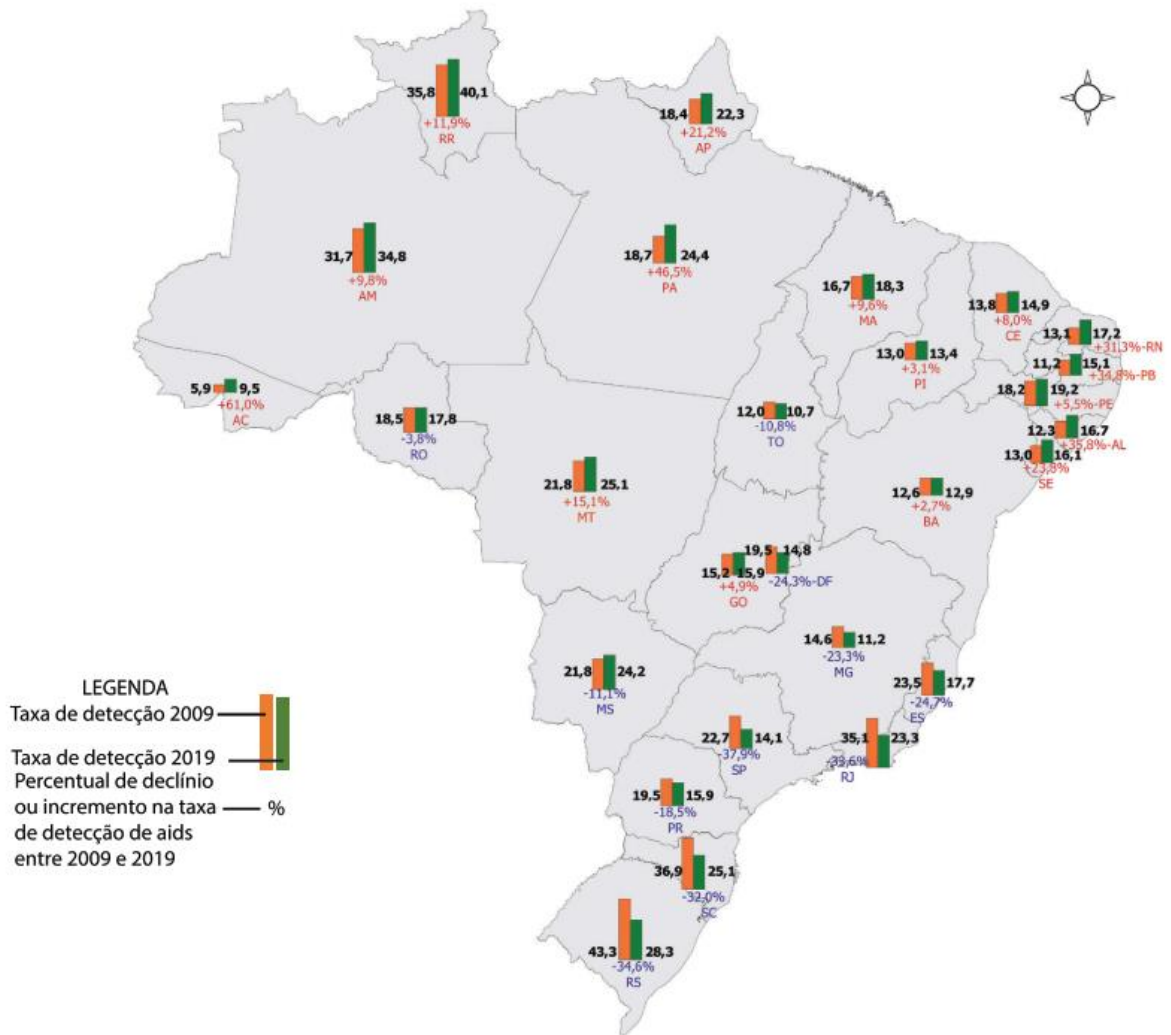


Figura 2 - Taxa de detecção de aids (por 100.000 hab.) e percentual de declínio ou incremento, segundo UF de residência, por ano de diagnóstico. Brasil, 2009 e 2019* (BRASIL, 2020a).

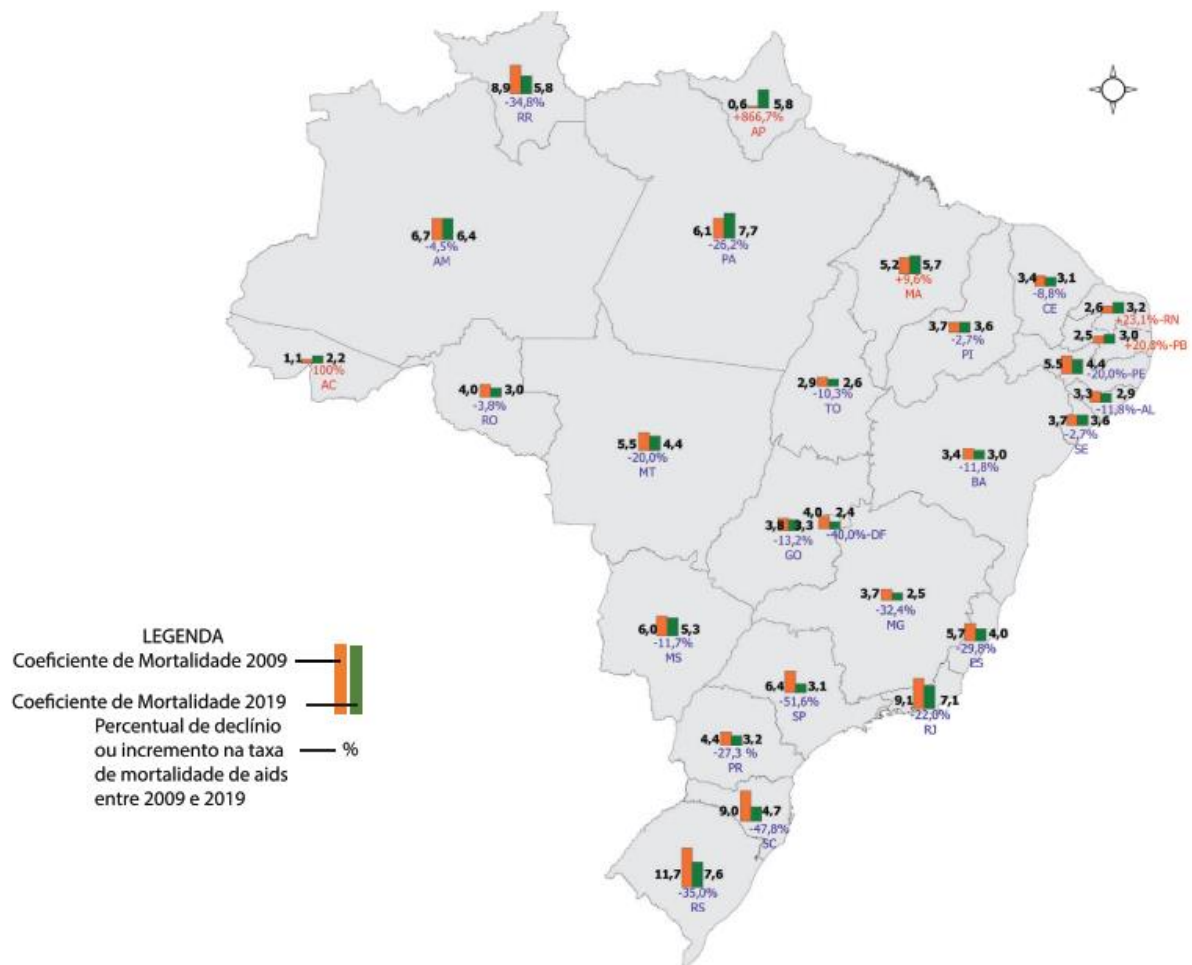


Figura 3 - Coeficiente de mortalidade padronizado de aids (por 100.000 hab.) e percentual de declínio ou incremento segundo UF de residência, por ano de diagnóstico. Brasil, 2009 e 2019 (BRASIL, 2020a).

1.3 Estrutura do HIV

Segundo o comitê internacional de taxonomia viral (ICTV, 2020), o HIV é classificado como pertencente a ordem *Ortervirales* família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*, espécie vírus da imunodeficiência humana.

Classificado como um retrovírus (genoma constituído por RNA e com enzima capaz de realizar retrotranscrição (BIBERFELD et al., 1987; GALLO; MONTAGNIER, 1988).

Na figura 4, pode-se observar a estrutura do HIV que é composta por um envelope lipoprotéico com espículas glicoproteicas designadas gp120 e gp41, onde através de alterações conformacionais da gp120 resultantes da ligação ao receptor CD4 e os correceptores e com o auxílio da região subunidade transmembranar - gp41 (gp120 – gp41) possibilitam a fusão e a entrada na célula hospedeira. O vírus apresenta em seu capsídeo duas cópias de RNA de cadeia simples seu genoma completo é composto por nove genes classificados em genes estruturais, acessórios e regulatórios.

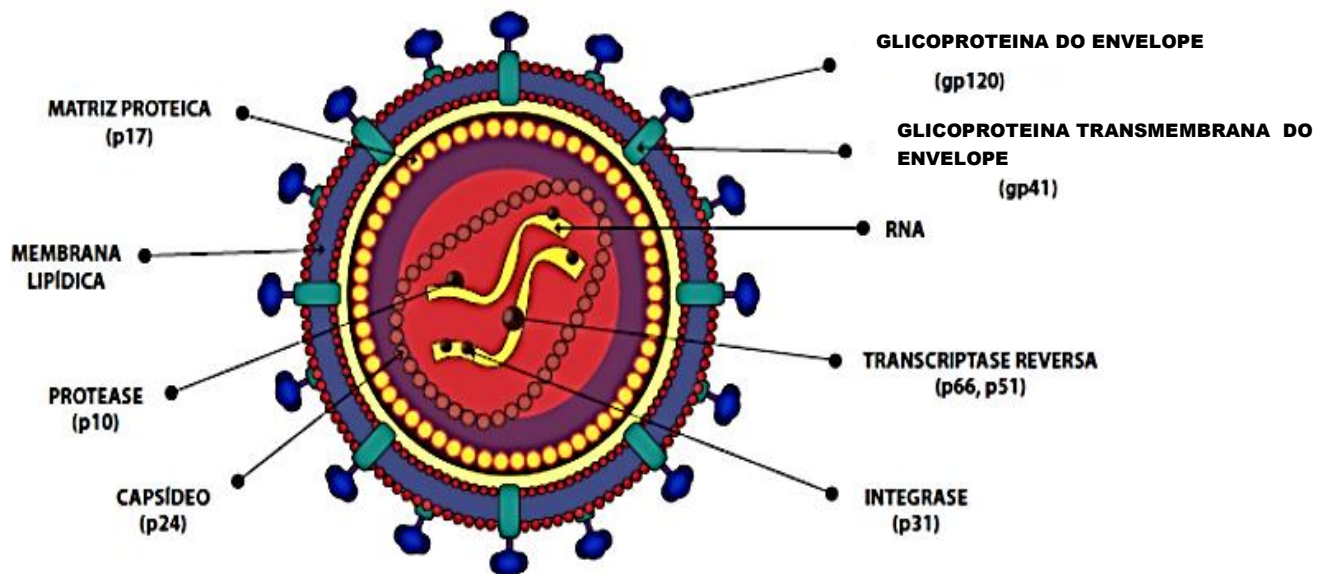


Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do HIV-1. Fonte: BRASIL, 2016.

O HIV possui três genes principais: *gag* (posição em relação ao HXB2 790 – 2292), que codifica as proteínas na matriz (*p17*), o capsídeo (*p24*), nucleocapsídeo (*p7*) e proteína *p6*; *pol* (2085-5096) que codifica enzimas importantes para o estabelecimento do ciclo viral na célula hospedeira, como transcriptase reversa,

protease e integrase; e *env* (6045-8795), que codifica a glicoproteína *gp160* do envelope que é percussora da *gp120* e *gp41*. Há ainda os genes *tat* que possui dois exons *Tat-1* e exon *Tat-2* e *rev* que desempenham funções regulatórias essenciais para replicação viral, e ainda as proteínas acessórias *nef*, *vif*, *vpu* (no HIV-1) e *vpr* (no HIV-2) essenciais para a eficiente produção viral (BENKO et al., 1990; BIBERFELD et al., 1987; FRANKEL; YOUNG, 1998; LI et al., 2015; SEELAMGARI et al., 2004). A sequências repetidas terminais (LTRs, do inglês *long terminal repeat*) em forma linear 5'LTR (1-634) e 3'LTR (9068-9719), de polaridade positivas na direção 5'-3' são necessárias à integração do genoma viral ao DNA do hospedeiro, denominando-o assim de provirus. (Fig. 5).

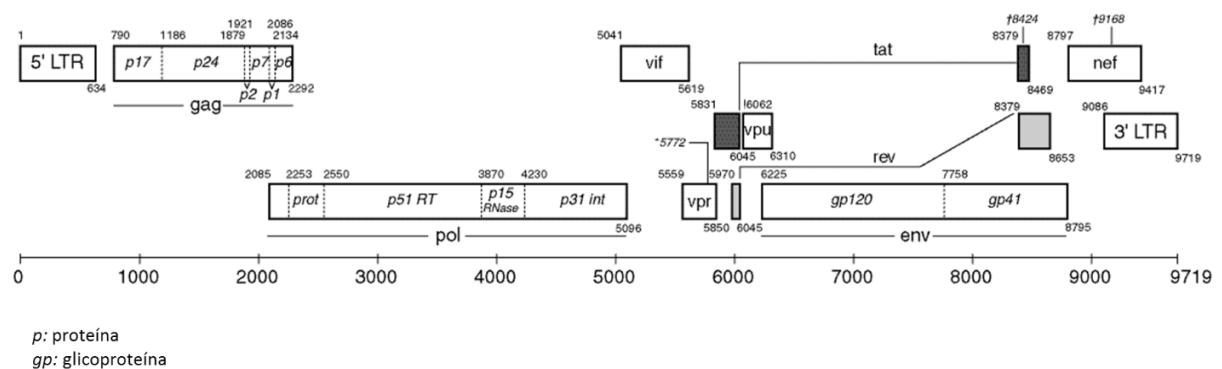


Figura 5 - **Genoma proviral: genes estruturais e acessórios do HIV-1, posições relativas ao isolado HXB2.** Fonte:

<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/MAP/landmark.html>.

1.4 Ciclo Replicativo do HIV

O ciclo de replicação do HIV-1 se inicia quando o HIV reconhece as proteínas de membrana da célula alvo e após haver a ligação com as células que possuem

especialmente o receptor CD4⁺ na membrana celular (Fig. 6-1). Esse reconhecimento ocorre pela alteração da forma conformacional da glicoproteína gp120 e acoplando-se ao correceptor que são majoritariamente os receptores de quimiocina CCR5 ou CXCR4. Contudo, também é possível encontrar células que eventualmente podem apresentar tropismo duplo para R5X4 (Fig 7). O uso de correceptor CCR5 ou CXCR4 pelo HIV é principalmente determinado por uma sequência de aminoácidos na alça V3 da gp120 (ALKHATIB, 2009). Após a ligação, a glicoproteína transmembranar *gp41* medeia a fusão das membrana do envelope viral à membrana celular, e após ocorre a liberação do capsídeo, contendo o genoma e proteínas do vírus no citosol (Fig. 6-2), revisado por Wilen; Tilton; Doms (2012).

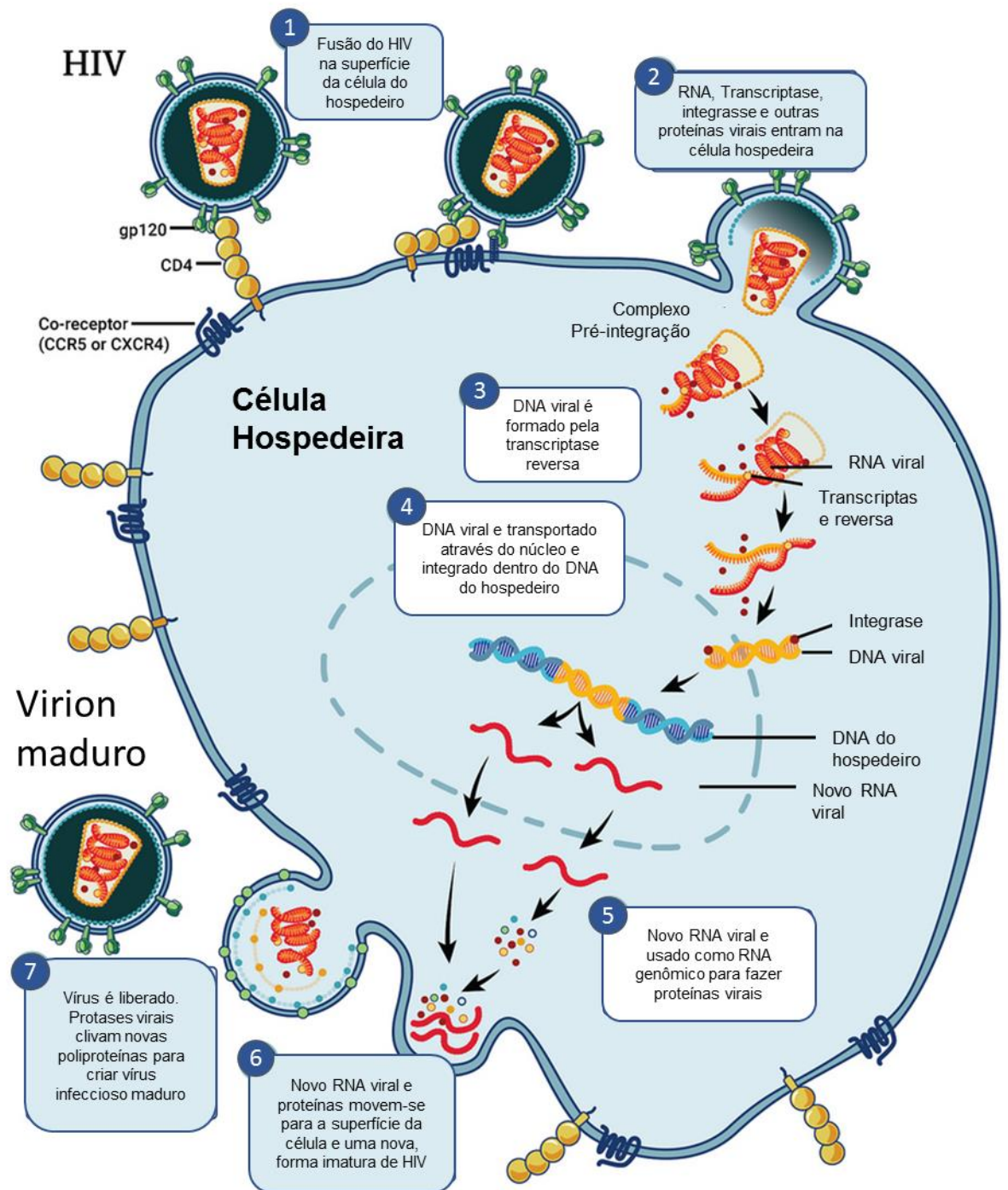


Figura 6 - Ciclo replicativo do HIV e papel de enzimas virais.

Fonte: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/hiv-replication-cycle>

Variantes do HIV-1

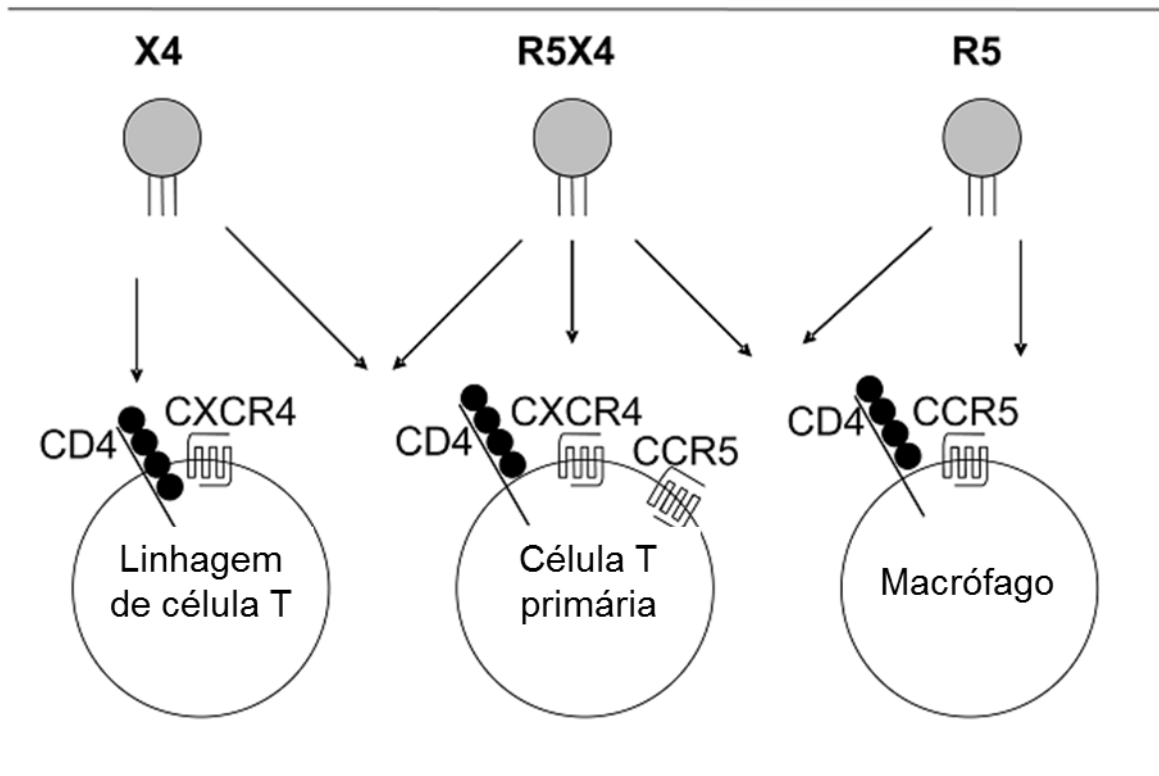


Figura 7 - **Tropismo viral para os correceptores CCR5 e CXCR4.**

Fonte: (ALKHATIB, 2009)

O capsídeo se desintegra, configurando a etapa de desnudamento, com liberação do RNA e enzimas virais, assim a transcriptase reversa do HIV inicia a retrotranscrição do RNA viral em DNA (Fig.6-3), após o material genético é transportado ao núcleo da célula onde será integrado pela ação da enzima integrase, ao DNA do hospedeiro (Fig.6-4), Contudo, um estudo recente demonstra que esse processo de desnudamento pode ocorrer no núcleo da célula (BURDICK et al., 2020). Uma vez que o provírus é integrado ao DNA do hospedeiro, a célula passa a produzir material genético viral (transcrição de RNA viral), produzindo múltiplas cópias do novo RNA do HIV. Parte deste RNA torna-se o genoma de um novo vírus, enquanto a célula usa outras cópias do RNA para fazer novas proteínas do HIV (Fig.6-5). Essas

proteínas virais se reúnem próximos a membrana plasmática (Fig.6-6) e os novos vírions são montados próximos a membrana brotando para fora da célula. Somente após brotamento estes passam por processo de maturação e através da ação da protease viral, e então, os vírions maduros são capazes de infectar novas células (Fig. 6-7) (CHAN; KIM, 1998; HOPE, 1997).

A história natural da infecção pelo HIV é caracterizada inicialmente pela infecção do HIV às células do sistema imunológico, principalmente células T CD4⁺, dando início a fase aguda da infecção. A infecção de células T CD4⁺ levando a uma depleção maciça destas (DOUEK, 2007) ocorre juntamente com uma alta viremia (>10⁷ cópias de RNA/mL de plasma) (Fig. 8), caracterizada por sintomas clínicos conhecidos como síndrome retroviral.. Para contrabalancear essa injúria causada pela infecção ocorre uma expansão significativa de células T CD8⁺ efectoras contra o HIV e conseqüentemente a produção de anticorpos por linfócitos B dando início a resposta imune humoral (BORROW et al., 1994; KOUP et al., 1994).

Após a fase aguda da infecção, há um declínio na viremia, marcando assim, o início da fase crônica da infecção, e apesar de ocorrer recuperação do número de linfócitos T CD4⁺, que se mantém estável em determinado período do curso da infecção e com o passar dos anos irá sofrer um declínio gradual (KASSUTTO; ROSENBERG, 2004). Essa alteração clínica pode passar despercebida pois a maioria das PVHIVA se mantém assintomáticas (PARANJAPE, 2005). Assim, o declínio progressivamente lento de linfócitos T CD4⁺ somado ao aumento da replicação viral resultam na fase de aids, na qual o organismo fica vulnerável às infecções oportunistas, aumentando o risco de vida na ausência de tratamento (LANGFORD; ANANWORANICH; COOPER, 2007) (Figura 8).

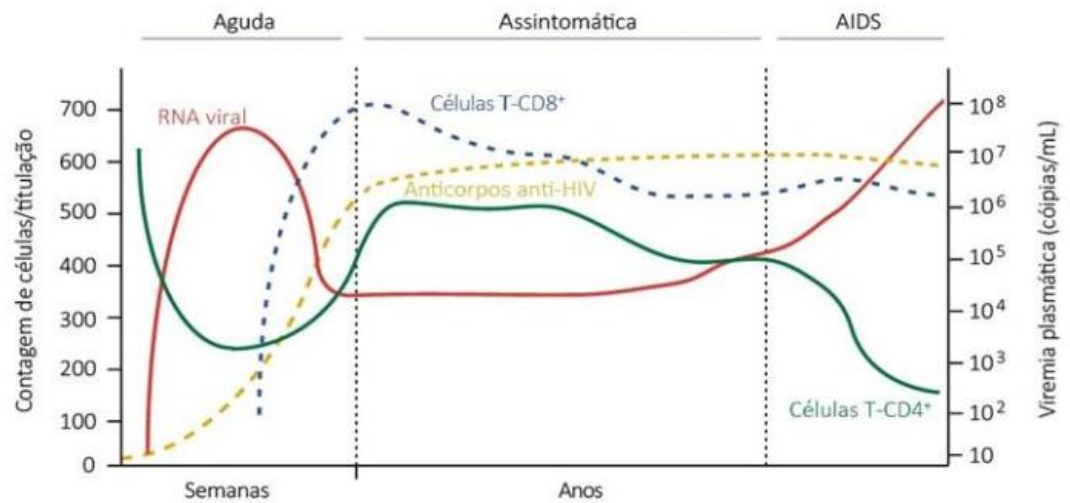


Figura 8 - **História natural da infecção pelo HIV.** Carga viral plasmática (vermelho), contagem de linfócitos T CD4⁺ (verde) e linfócitos T CD8⁺ (azul) titulação de anticorpos anti-HIV (amarelo) estão indicadas no gráfico em função das fases clínicas da infecção por HIV e do tempo. Fonte: adaptado de Simon e Abdool (2006).

1.5 Terapia antirretroviral

A terapia antirretroviral (TARV) consiste na combinação de drogas antirretrovirais (ARV) tendo como objetivo bloquear etapas ou enzimas do ciclo replicativo do HIV, suprimindo a replicação viral (Fig. 9). A TARV pode ser composta por inibidores de fusão ou entrada, inibidores da transcriptase reversa análogos à nucleotídeo (ITRN) ou inibidores da transcriptase reversa não análogos à nucleosídicos (ITRNN) inibidores de protease (IP) e inibidores da integrase (INI). A TARV resultou na melhoria substancial na qualidade de vida dos PVHIVA e no declínio de mortes associadas à aids em todo o mundo (BRASIL, 2018; UNAIDS, 2020a).

Inibidores de ligação bloqueiam o HIV de se conectar à célula CD4.

mAbs bloqueiam a entrada do HIV na célula CD4.

Inibidores CCR5 bloqueiam o anexo a um co-receptor denominado CCR5.

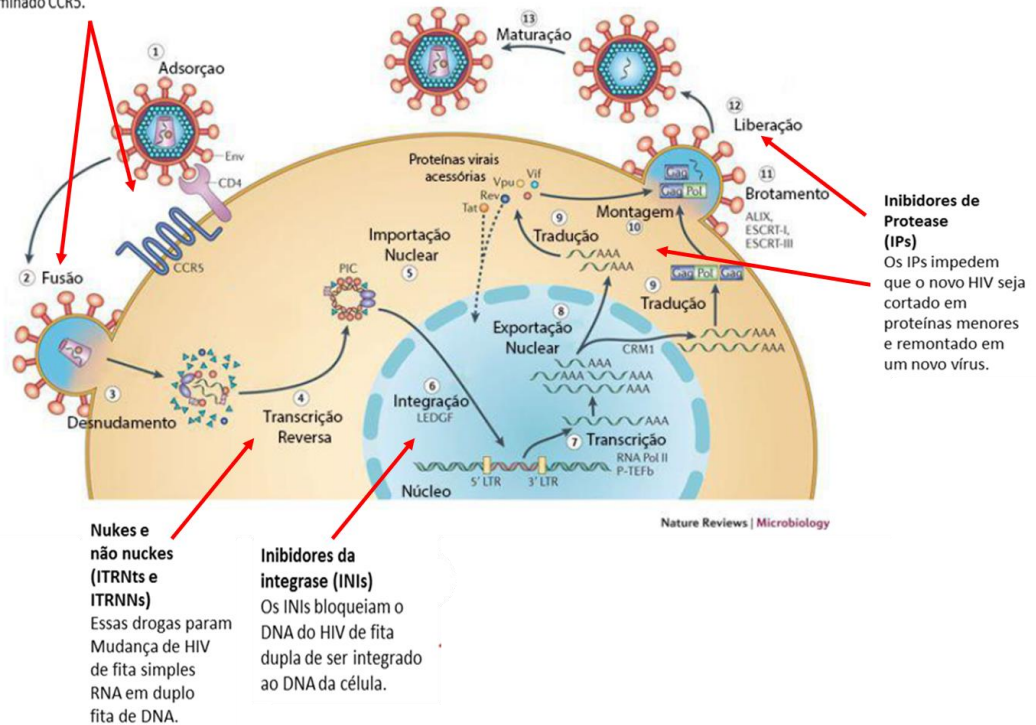


Figura 9 - Principais alvos das drogas antirretrovirais e como atuam no ciclo de replicação do vírus. As principais classes de fármacos usadas na terapia antirretroviral (TARV) para combater o HIV incluem inibidores da entrada do vírus na célula, como o inibidor da fusão vírus-célula (enfuvirtida) e o antagonista de CCR5, (maraviroque), inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (ITRNT), inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN), inibidor de integrase (raltegravir, dolutegravir) e inibidores de protease (IP). Fonte: adaptado de Engelman e Cherepanov, 2012).

1.5.1 Inibidores de entrada e fusão

Como descrito anteriormente, os ARV têm por objetivo bloquear uma etapa do ciclo biológico do HIV. O primeiro alvo é a entrada do vírus nas células imunológicas que expressam receptores que possibilitarão a invasão do vírus, os ARVs que agem sobre essa fase são classificados como inibidores de entrada e inibidores de fusão, podendo ser antagonistas do receptor de quimiocina CCR5 ou inibidores da gp41.

Os inibidores de fusão são peptídeos que mimetizam domínios da *gp41* e tem por objetivo impedir a ação da glicoproteína gp41, interrompendo assim interações moleculares desta proteína viral com a membrana celular (KILBY et al., 1998; LALEZARI et al., 2003; WILD; GREENWELL; MATTHEWS, 1993; WILD et al., 1994).

Por outro lado, os antagonistas CCR5 são pequenos peptídeos que se ligam regiões hidrofóbicas transmembranas do correceptor CCR5 dispondo de um mecanismo inovador com atividade alostérica. Este induz ao não reconhecimento do vírus a esse correceptor na célula alvo impedindo sua invasão (DORR et al., 2005). Porém, mesmo se ligando ao CCR5, não impede que esse correceptor continue exercendo sua função imunológica na célula alvo (VEAZEY et al., 2003).

Outros alvos farmacológicos podem estar relacionados com a glicoproteína do envelope viral gp120, alvo de inibidores baseados em anticorpos. Esses anticorpos podem se ligar em regiões da gp120 importantes para a ligação ao CD4 e alterar a conformação da proteína envelope, impedindo assim o reconhecimento do receptor CD4 nas células alvo, revisado por Acharya et al. (2015)

1.5.2 Inibidores da transcriptase reversa

O uso de Inibidores da enzima transcriptase reversa análogos de nucleotídeos/nucleosídeos (ITRN) foram a primeira classe de antirretrovirais a serem aprovados contra o HIV (YOUNG, 1988). Esses medicamentos se ligam ao sítio catalítico da enzima transcriptase reversa através de um processo de fosforilação impedindo a formação da ligação fosfodiéster do nucleosídeo resultando no término do crescimento cadeia de DNA viral (CHENG et al., 1987; RICHMAN, 2001).

Por outro lado, os inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos possuem mecanismo diferente, não necessitam da etapa de fosforilação, pois inibem a enzima transcriptase reversa por interação a um sítio de ligação alostérica no sítio polimerase da enzima transcriptase reversa (FURMAN et al., 1986; SPENCE et al., 1995), sendo ambos visualizados na figura 10.

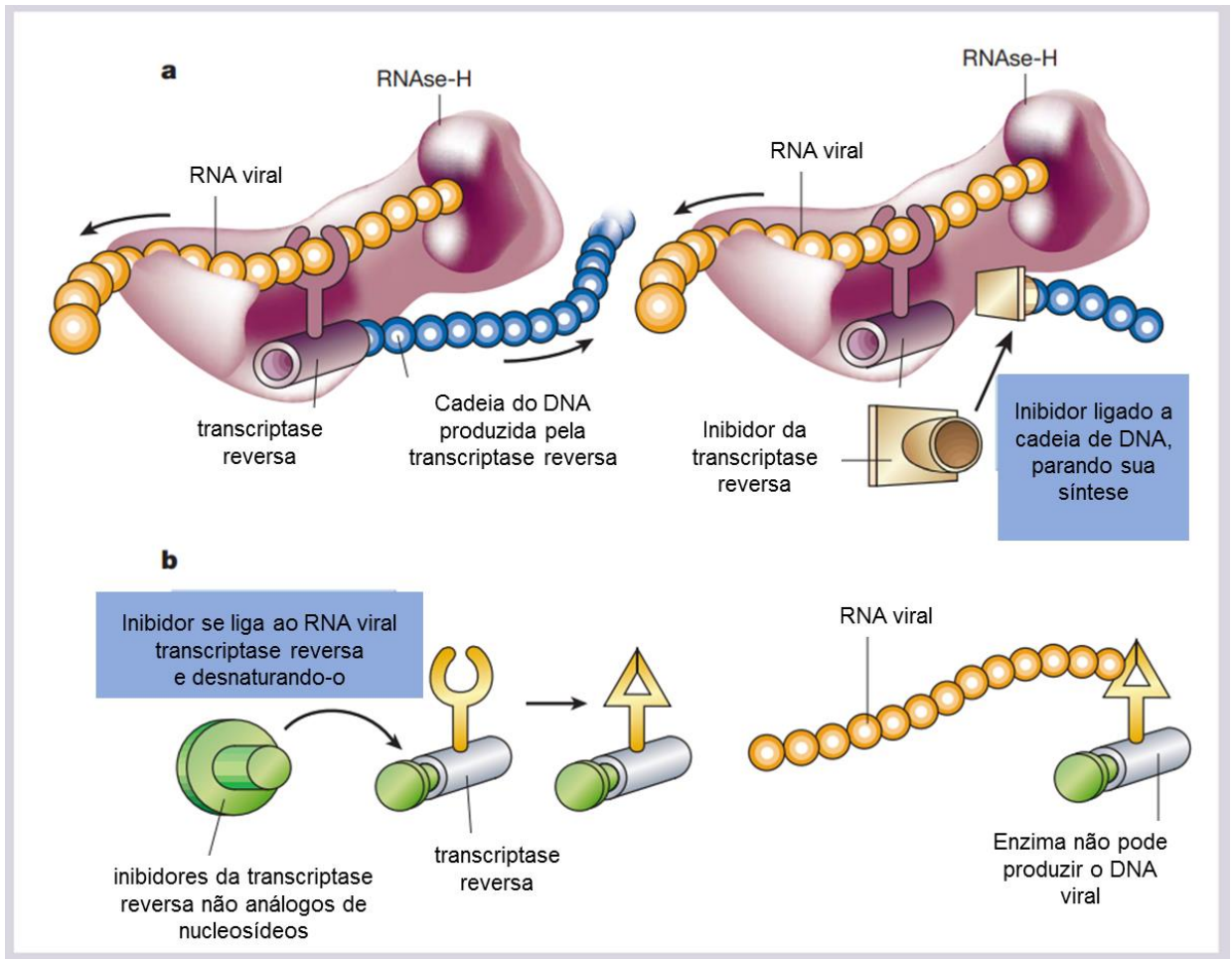


Figura 10 - **Mecanismo de ação de Inibidores da transcriptase reversa.** (a) mecanismo de ação de Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos, (b) mecanismo de ação de inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (RICHMAN, 2001)

1.5.3 Inibidores de protease

A protease do HIV-1 é uma enzima com apenas 11kDa que é responsável processamento de poliproteínas do HIV (gag-pol) (SHAFER et al., 2001). Sua ação é importante para a maturação do vírion, etapa que ocorre após brotamento da nova

partícula (PARK; MORROW, 1993). A ação farmacológica dos inibidores de protease tem por objetivo incapacitar partículas virais formadas de se replicar, produzindo, apenas vírions sem capacidade de infectar novas células alvo (MEEK; DREYER, 1990).

1.5.4 Inibidores de integrase

Integrase é uma enzima do HIV-1 de 32 kDa, a mais recente a ser direcionada com sucesso para o desenvolvimento de drogas (ESPESETH et al., 2000). O processo da enzima integrase é composto por 4 fases, descritas na figura 11. 1) importação nuclear (importação do complexo de pré-integração viral através dos poros nucleares), 2) processamento da região 3'- final (a integrase quebra um dinucleotídeo de cada fita de DNA viral nas regiões LTR, produzindo grupos hidroxil reativos que serão em uma reação nucleofílica ligados ao DNA do hospedeiro alvo), 3) etapa de transferência de fitas de DNA, e 4) reparação final de DNA que é realizado por mecanismos de reparação de DNA celular (SLOAN; WAINBERG, 2011).

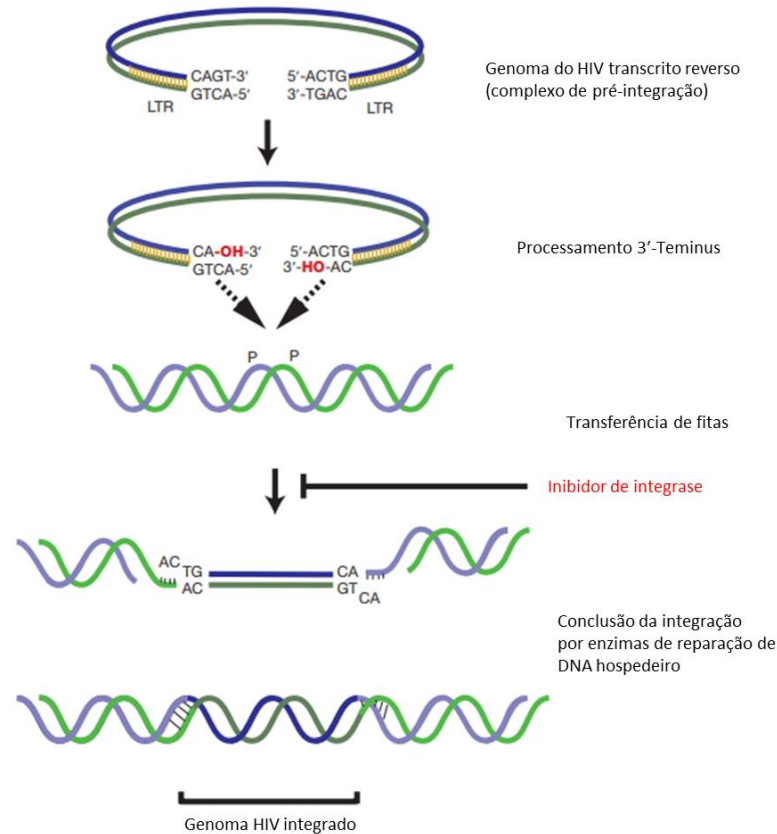


Figura 11. **Processamento da enzima integrase do HIV-1 e mecanismo de ação de inibidores de integrase.** (INGALE; BHATIA, 2011).

1.6 Tratamento do HIV no Brasil

O Brasil atravessou uma mudança significativa em relação às políticas de saúde pública desde a criação do SUS – Sistema Único de Saúde que através da Constituição Federal de 1988, passou a oferecer medicamentos para infecções oportunistas (BRASIL, 1988). Desde 1996, o Brasil através do Departamento Nacional de Vigilância, Prevenção, e Controle das IST, HIV/AIDS e Hepatites Virais do Ministério da Saúde, distribui gratuitamente, pelo SUS, os ARV para as pessoas vivendo com HIV (BRASIL, 1996).

O primeiro tratamento no Brasil, surgiu em 1991, com a utilização do AZT (Zidovudina) indicada inicialmente para uma quantidade significativa de pessoas vivendo com HIV/Aids, devido a eficácia na redução da multiplicação viral, apesar do medicamento ser, até então, utilizado para tratar pacientes com câncer (BRASIL, 1996). Contudo, não houve uma alta cobertura de distribuição do medicamento, gerando assim pressões populares para obtenção do acesso a terapia antirretroviral nos anos de 1991 a 1996. Devido a este movimento foi criada a Lei Nº 9.313, em 13 de novembro de 1996, onde o Brasil passa a ter distribuição gratuita de medicamentos retrovirais pelo Departamento Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS que disponibilizava o AZT (NUNN et al., 2009).

Ao longo dos anos a TARV sofreu importantes modificações, iniciando com a aprovação da zidovudina (AZT) como monoterapia pelo Food and Drug Administration (FDA). Apesar dos benefícios clínicos observados com desse ARV, foi verificado que sua eficácia durava por curto prazo (SIMBERKOFF et al., 1996), dessa forma foi necessária a associação de outros ARVs para uma resposta terapêutica mais eficiente. Durante a década de 1990, novos ARVs da classe dos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos (ITRN) foram liberados, assim dado início ao período de uso da terapia dupla, constituída pela associação de dois ITRN (CHENG, 1995; ENGLUND et al., 1997; HAMMER et al., 1996).

Na mesma década, outros ARV deram novas esperança ao tratamento de aids com a inclusão dos inibidores da protease (IP) (MISSON; CLARK; KENDALL, 1997), consequentemente resultando na maior duração da resposta terapêutica e maior recuperação do número de linfócitos T CD4+ além de maior e mais rápida redução da carga viral. A inclusão desses ARVs acompanhou também as dos inibidores da

transcriptase reversa não análogos de nucleotídeos (ITRNN) que foram incluídos à terapia antirretroviral (STASZEWSKI et al., 1999).

Logo após esse período, o Brasil demonstra avanços significativo no tratamento do HIV/Aids, passando a oferecer uma variedades de antirretrovirais, momento em que as mortes por AIDS começaram a diminuir substancialmente, aumentando assim o que é chamado de sobrevida das PVHIVA (BRASIL, 2018). Em janeiro de 2007, o Brasil anuncia o licenciamento compulsório do medicamento antirretroviral Efavirenz (RODRIGUES; SOLER, 2009), sendo o primeiro antirretroviral produzido por laboratório público no país.

Diversos estudos trouxeram um consenso sobre o melhor momento para se iniciar o tratamento da infecção pelo HIV-1, e qual a melhor combinação de ARVs poderiam favorecer a supressão viral. Em 2013, o Brasil foi o terceiro país, depois de França e Estados Unidos a fornecer os ARVs independentemente da contagem de células TCD4+, estratégia conhecida como Tratamento como prevenção (TASP, em inglês, ou TcP, em português) .(GULICK et al., 2007; RHAME, 2011; RIDDLER et al., 2008)

O tratamento para todos imediatamente após o diagnóstico do HIV trouxe uma recuperação rápida do sistema imunológico, e essa vantagem é alcançada devido à variedade de antirretrovirais que são oferecidos pelo SUS (BRASIL, 2018). O resultado foi a diminuição gradativa de mortes por aids (AI LIAN et al., 2007; MOCROFT et al., 2003), aumentando assim a sobrevida das pessoas que vivem com HIV e aids (BRASIL, 2018).

Segundo dados do UNAIDS, no final de 2020, foram registrados 27,4 milhões (73%) de PVHIVA acessavam TARV em todo o mundo. Impactando diretamente no

número de pessoas com novas infecções por HIV que diminuiu ao longo dos anos. Estima-se que 1,5 milhão de pessoas em todo o mundo adquiriram HIV em 2020, marcando um declínio de 30% nas novas infecções por HIV desde 2010(UNAIDS, 2021). Historicamente no Brasil, a primeira linha terapêutica recomendada em 2008, envolvia o uso de dois ITRNs e uma terceira droga, que era preferencialmente um ITRNN. Na segunda linha, caso houvesse falha aos medicamentos de primeira linha, era indicado o uso de IP e por fim, na terapia de resgate, caso houvesse uma falha a segunda linha, o uso de um inibidor de integrase ou inibidores de fusão ou entrada (BRASIL, 2008, 2010a). Com o passar dos anos, novos tipos de esquemas terapêuticos foram incorporados, conferindo melhor adesão ao tratamento devido a diminuição da quantidade de comprimidos e uma rápida resposta contra o vírus (BRASIL, 2018). Em 2015, um novo medicamento foi incorporado ao tratamento antirretroviral através do SUS incluído como medicamento de terceira linha no tratamento da infecção pelo HIV, o dolutegravir. Posteriormente este medicamento passou a ser recomendado no primeiro esquema para início de tratamento e trouxe um ganho significativo para a rápida supressão viral e manutenção do status indetectável, além de possuir maior barreira genética para desenvolvimento de mutações de resistência às drogas (BRASIL, 2018).

Para estabelecer diretrizes e recomendações para PVHIVA foram criados Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas (PCDT) pelo Ministério da Saúde. Atualmente, o PCDT de adultos determina que a terapia inicial deve sempre incluir combinações de três antirretrovirais, sendo dois da classe ITRN associados a classe de antirretrovirais (ITRNN, IP/r ou INI). A exemplo, os casos no início de tratamento, devem seguir o esquema inicial preferencial: dois ITRN/ITRNt – lamivudina (3TC) e tenofovir (TDF) – associados ao inibidor de integrase (INI) – dolutegravir (DTG) (tabela

1). Algumas particularidades clínicas apresentadas por PVHIVA podem alterar a dinâmica de indicação de ARV (tabela 1).

Tabela 1 – Esquema de indicações de terapia antirretroviral combinada

SITUAÇÃO	TERAPIA ANTIRRETROVIRAL	DOSE DIÁRIA	OBSERVAÇÃO
Adultos em início de tratamento ^(a)	TDF ^(b) /3TC + DTG ^(c)	(300mg/300mg) "2 x 1"+ 50mg 1x/dia	
Coinfecção TB-HIV ^(d) sem critérios de gravidade (conforme critérios elencados abaixo)	TDF ^(b) /3TC/EFV	(300mg/300mg/600mg) – DFC 1x/dia	Concluído o tratamento completo para TB, poderá ser feita a mudança (switch) do EFV para DTG.
Coinfecção TB-HIV com um ou mais dos critérios de gravidade abaixo ^(d) : LT-CD4+ <100 céls/mm ³ Presença de outra infecção oportunista Necessidade de internação hospitalar/ doença grave Tuberculose disseminada	TDF ^(b) /3TC + RAL	(300mg/300mg) "2 x 1" 1x/dia + 400mg 12/12h	Concluído o tratamento completo de TB, deverá ser feita a mudança (switch) do RAL para DTG em até 3 meses

Outro grande passo para acompanhar os avanços alcançados pela TARV foi a adoção da estratégia 90-90-90, proposta pela Organização das Nações Unidas (ONU), que tem como metas combater e reverter a tendência atual de propagação do HIV/aids, do qual o Brasil é signatário. Esta tem como meta que 90% das PVHIV do país tenham acesso a diagnóstico; 90% das PVHIV diagnosticadas estejam sob uso de TARV; e 90% das pessoas em TARV tenham carga viral (CV) do HIV-1 suprimida (BRASIL, 2019b; BRASIL, 2018).

Estima-se que, ao final de 2019 havia aproximadamente 920 mil PVHIV no Brasil, das quais 821 mil (89%) estavam diagnosticadas. Em relação às PVHIV 84% (721 mil) estavam vinculadas à serviços de saúde; e 682 mil (74%) estavam retidas

nos serviços, com 69% (634 mil) em uso de antirretroviral, e 65% (597 mil) alcançaram supressão viral do HIV-1 (CV inferior a 1.000 cópias/mL). (BRASIL, 2020b) (Fig. 12). Nesse sentido, mesmo com os ganhos estratégicos obtidos ao longo do tempo gerados pelo uso da TARV ainda existem entraves em relação ao tratamento e monitoramento de PVHIVA que representam um significativo problema de saúde em todo mundo.

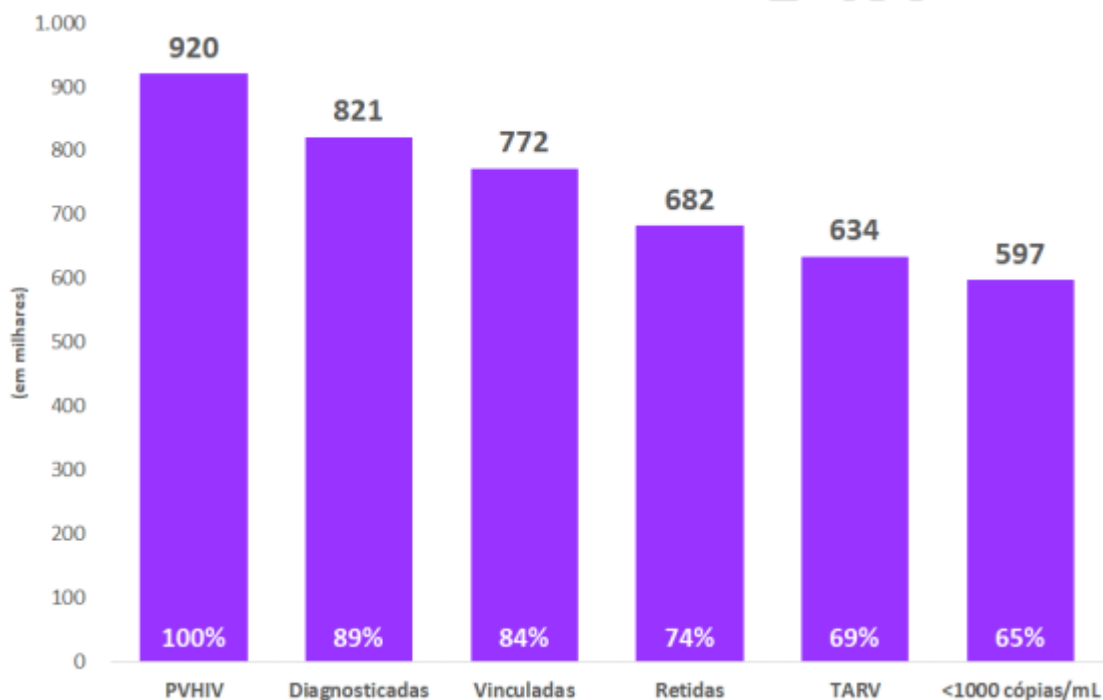


Figura 12 - **Cascata de cuidado contínuo do HIV. Brasil, 2019.**

As Nações Unidas iniciam a implementação de novos objetivos que compreendem o desafio até 2030, classificada como metas 95–95–95 para teste e tratamento em todas as PVHIVA. As novas recomendações antevêm a eliminação da transmissão vertical e a possibilidade de acabar com a aids pediátrica, priorizando principalmente a igualdade de gênero e os direitos femininos diminuindo o risco e o impacto do vírus. Os dados estatísticos têm demonstrado que caso sejam alcançadas

essas metas em 2025 resultará numa redução de bem aproximada de 90% nas infecções anuais até 2030 (UNAIDS, 2020b)

Pessoas vivendo com HIV podem desenvolver a falha virológica devido à supressão parcial e a persistência de carga viral detectável, mesmo em níveis baixos, podendo levar ao acúmulo de mutações que conferem resistência não só aos medicamentos em uso, mas também a outros da mesma classe. A não supressão da carga viral do HIV-1 pode resultar na necessidade de novos esquemas antirretrovirais que agem em alvos que ainda não apresentem mutações de resistência a drogas (BRASIL, 2010b; 2018)

A falha virológica será definida pela detecção de carga viral detectável (viremias persistentes com mais de 200 cópias/mL) seis meses após início do tratamento antirretroviral ou em qualquer momento após (BRASIL, 2018; 2019), e sua causa pode ser multifatorial, conforme descrito abaixo:

- Má adesão ao tratamento pode resultar na aquisição mutações de resistência pelo o uso de doses subótimas dos ARV (DEEKS, 2008; MANFREDI; SABBATANI; CALZA, 2008; RABOUD et al., 2002)
- Necessidade de comprometimento dos pacientes nas mudanças de hábitos para a promoção de uma maior qualidade de vida durante o tratamento contra o HIV (BRASIL, 2015; CALVETTI et al., 2014; GIFFORD et al., 2000; MURPHY et al., 2004)
- Intolerância medicamentosa, biodisponibilidade e metabolismo dos medicamentos, e interações medicamentosas (BONFANTI et al., 2000; DRESSER; SPENCE; BAILEY, 2000; SILVA et al., 2015)
- Necessidade de acompanhamento cuidadoso dos pacientes por parte dos profissionais da saúde para identificação precoce das

características acima mencionadas, assim auxiliando na criação de políticas de retenção ao uso regular de ARV (BRASIL, 2010b; VENKAT et al., 2008).

De modo geral, a falha virológica ocorre mais precocemente, seguida da falha imunológica e, finalmente, da piora clínica (BRASIL, 2018). Portanto, é inegável que o sucesso para manutenção da supressão viral está fortemente relacionado a adesão ao tratamento sendo necessária a retenção de mais de 95% do uso de doses prescritas para se manter uma carga viral indetectável (BARTLETT et al., 2001; PATERSON et al., 2002).

Variantes virais contendo mutações de resistência ocorrem naturalmente em indivíduos não tratados, no entanto, estas variantes são raramente detectáveis devido ao seu menor “fitness” em comparação com variantes suscetíveis às drogas. A seleção de variantes resistentes aos medicamentos irá depender da extensão da replicação viral durante o uso subótimo da TARV (ABRAM et al., 2010; COFFIN, 1995; PERELSON; RIBEIRO, 2013). Portanto, as mutações de resistência levam a alterações na estrutura genética do HIV que afetam a capacidade de ação parcial ou total de uma droga, ou combinação específica de drogas para bloquear a replicação do vírus, podendo ser identificadas através de exame de genotipagem (BRASIL, 2019a; WHO, 2019) , podendo ser solicitado o exame, segundo o PCDT, 2018, em duas condições principais:

- PVHIV em tratamento:
 - Falha virológica - O critério para a realização do exame é a confirmação da falha virológica em coleta consecutiva de carga viral após intervalo de quatro semanas, com a última carga viral

superior a 500 cópias/mL, e em uso regular de TARV por pelo menos seis meses.

- PVHIV que ainda não iniciaram tratamento (genotipagem pré-tratamento):
 - Pessoas que tenham se infectado com parceiro em uso de TARV (atual ou pregresso) - O critério para a realização do exame é a carga viral superior a 500 cópias/mL;
 - Gestantes infectadas pelo HIV - O critério para a realização do exame é a carga viral superior a 500 cópias/mL;
 - Crianças infectadas pelo HIV - O critério para a realização do exame é a carga viral superior a 500 cópias/mL;
 - Pacientes com diagnóstico de coinfeção tuberculose e HIV.

Na genotipagem do HIV-1 são analisadas as informações genéticas através das diferenças entre um vírus sequenciado e a sequência de referência selvagem. As mutações são representadas usando um código representado por uma letra referente ao aminoácido encontrado na referência do tipo selvagem, seguido pela posição de aminoácido e a letra referente ao aminoácido na sequência analisada. Por exemplo, a mutação na transcriptase reversa 'M184V' indica que, em vez de ter uma metionina (M ;ATG;) na posição 184, o vírus sequenciado tem uma valina (V; GTG (TANG; SHAFER, 2012)

A definição das principais mutações de resistência que poderiam causar um impacto no tratamento do HIV foi vista como estratégica de enfrentamento a essa problemática (SHAFER; RHEE; BENNETT, 2008). Anualmente, uma lista que inclui mutações que podem contribuir para uma resposta virológica reduzida a uma droga

são reportadas (*Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1*) considerando apenas os dados obtidas através dos estudos científicos publicados. Na figura 13 temos a representação de mutações de resistência aos medicamentos da classe de ITRNN .

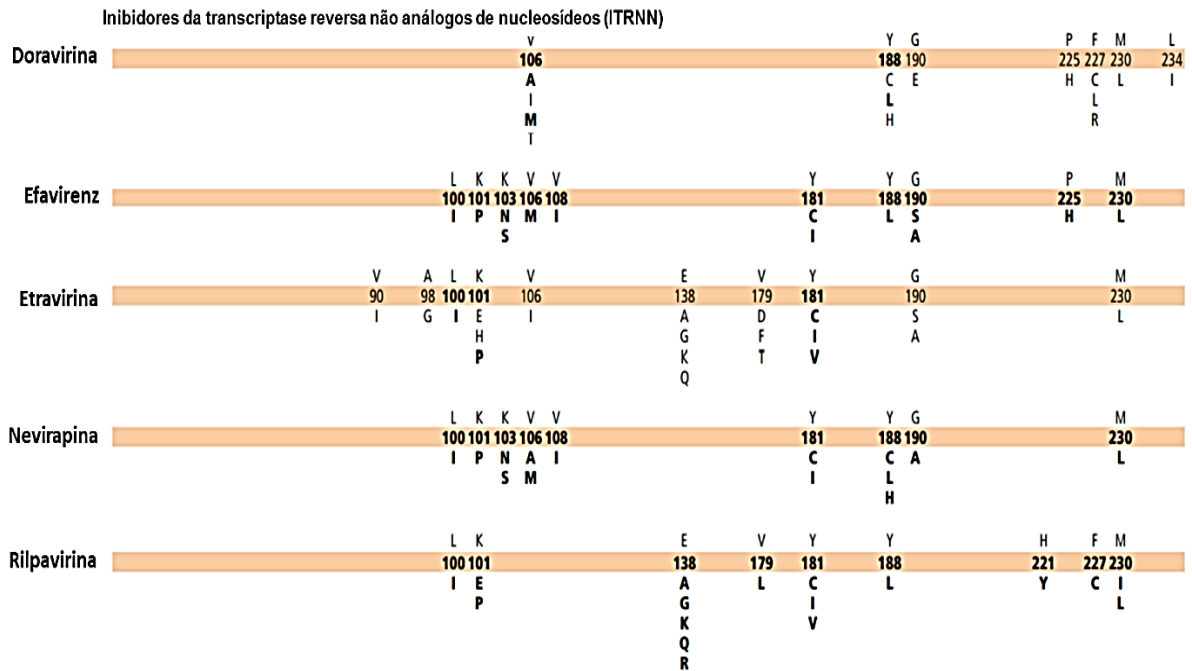


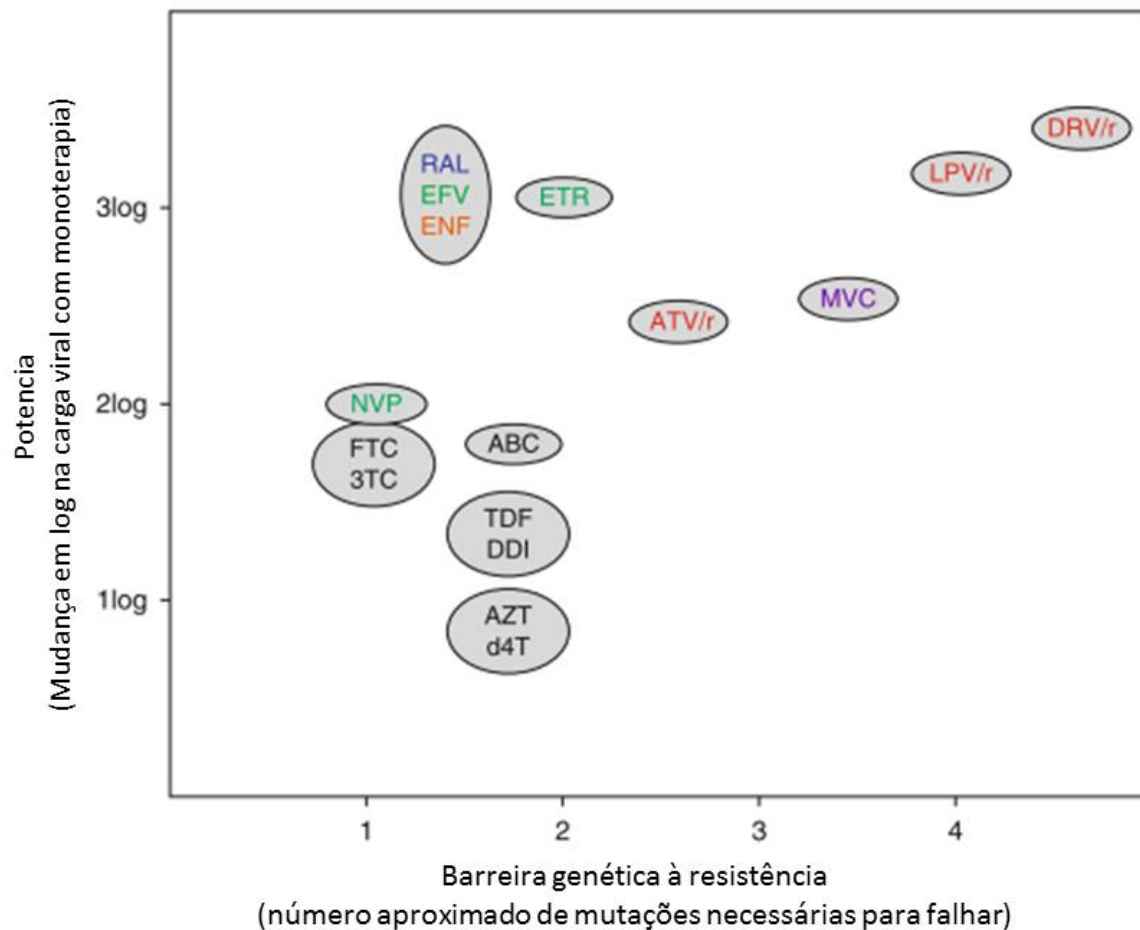
Figura 13- **Mutações resistência associados aos inibidores de transcriptase reversas não análogos de nucleosídeos.** (WENSING et al., 2019).

Uma ferramenta que auxilia na detecção destas mutações de resistência às drogas está albergada no “site” da faculdade de Stanford, o “*Stanford HIV Drug Resistance Database*” (HIVDB). Este fornece um laudo “online” contendo genótipo de dada sequência de nucleotídeos submetida, podendo descrever as mutações e para quais medicamentos essa mutação tem o poder de diminuir a susceptibilidade farmacológica.

É importante salientar que a dinâmica entre mutação de resistência e a redução da suscetibilidade de um ARV pode depender da presença de uma única mutação de

resistência (DRM primária), ou pela presença de DRM acessórias, que aumentam o condicionamento viral de uma variante contendo DRM primária e diminuem ainda mais a suscetibilidade a determinado ARV ou sua classe, podendo ainda também ser decorrente da associação de várias mutações. Ou seja, o efeito de cada mutação de resistência no vírus contribui no entendimento do nível de barreira genética a um ARV. Em outras palavras, a susceptibilidade de um ARV depende do número de mutações necessárias para conferir resistência, e a facilidade ou frequência em que essa mutação se desenvolve. A potência de cada ARV juntamente com a barreira genética à resistência influencia na habilidade de proteger um regime terapêutico da falha virológica (CLUTTER et al., 2016).

Conforme demonstrado na figura 14, alguns ARV da mesma classe podem apresentar barreira genética distinta quando comparados a outros da mesma classe, por exemplo, entre ITRN (em preto), a lamivudina - 3TC e emtricitabina necessitam apenas de uma mutação de resistência para prejudicar sua susceptibilidade, enquanto os demais desta classe necessitam de duas. Entre os ITRNN (em verdes), a etravirina – ETR é o de maior barreira genética. Os inibidores de protease (em vermelho) possuem uma alta barreira genética, assim como, Maraviroque (roxo).



ITRN (abacavir – ABC, didanosina – DDI, emtricitabina – FTC, lamivudina - 3TC, estavudina - d4T, tenofovir – TDF, zidovudina – AZT) em preto, os ITRNN (efavirenz – EFV, etravirina – ETR, nevirapina – NVP) em verde, os IP (atazanavir/ritonavir – ATV/r, darunavir/ritonavir – DRV/r, lopinavir/ritonavir - LPV/r,) em vermelho, em roxo os inibidores de fusão (enfuvirtide (T20) – ENF, Maraviroque – MVC), e em azul os INI (Raltegravir- RAL)

Figura 14 - **Esquema de barreira genética à resistência e potência de antirretrovirais selecionados.** (TANG; SHAFER, 2012) .

Segundo a organização mundial da saúde (OMS), a classificação da resistência aos medicamentos contra o HIV podem ser:

Resistência adquirida (do inglês *Acquired HIV drug resistance* – ADR) o, é decorrente da pressão seletiva exercida por medicação antirretroviral usada em doses subótimas em indivíduos cronicamente infectados (DEEKS, 2008;

DELAUGERRE et al., 2005), onde mesmo com o uso de antirretrovirais existe a permanência de replicação viral detectável (200 cópias/mL a 500 cópias/mL) resultando na fixação seletiva de vírus com mutações de resistência, podendo persistir por vários anos (BARBOUR et al., 2004)

Resistência transmitida (*Transmitted HIV drug resistance* - TDR) ou primária, ocorre quando indivíduo é infectado com vírus que tem mutações de resistência à droga, sendo assim detectada em pacientes virgens de tratamento, sem história de uso de ARV(CHIN-HONG et al., 2005). Conseqüentemente podendo comprometer resposta ao primeiro esquema antirretroviral (WHO, 2019).

Em virtude do aumento de casos de vírus resistentes a TARV em várias regiões do mundo, o Brasil, em 2001, elaborou um Projeto de Implantação de uma Rede Nacional para Genotipagem do HIV-1 (RENAGENO) em pacientes com falha terapêutica aos ARVs tendo como objetivo instalar uma rede de laboratórios nas diferentes macrorregiões do país para realizar exames de genotipagem em pacientes da rede pública de saúde infectados pelo HIV. Assim, o Programa Nacional DST e Aids do Ministério da Saúde, decidiu implantar, por meio de um estudo operacional, para detectar a ocorrência de resistência genotípica do HIV-1 frente aos ARVs, auxiliando na seleção da terapia de resgate, em pacientes atendidos da rede pública de saúde. Essa política adotada pelo Ministério da Saúde causou um grande impacto na epidemia de HIV/aids, reduzindo a morbidade e a mortalidade (BRASIL, 2018).

1.7 Origem e classificação molecular do HIV

O Vírus da Imunodeficiência Humana – HIV-1 se originou através de múltiplas transmissões zoonóticas do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV), em um processo

evolutivo de adaptação entre espécies diferentes (BIBOLLET-RUCHE et al., 2004), resultando nos seus distintos tipos e grupos (Fig 14). O HIV-1 tem como representante importante o grupo M, maior responsável pela pandemia da aids no mundo, teve origem em SIV de chimpanzés - *Pan troglodytes* (SIVcpz) , assim como o grupo N (BAILES, 2003; HAHN et al., 2000; SHARP; HAHN, 2010). Por sua vez, ocorreu transmissão zoonótica entre chimpanzés e gorilas (*Gorilla gorilla*), e os SIV de gorilas foram transmitidos ao homem dando origem aos grupos O e P (VAN HEUVERSWYN et al., 2006). Já o vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (HIV-2) se originou de SIVs de *sooty mangabeys* (SIVsm), e se encontra concentrado em alguns países, geralmente na África ocidental (LEMEY et al., 2003).

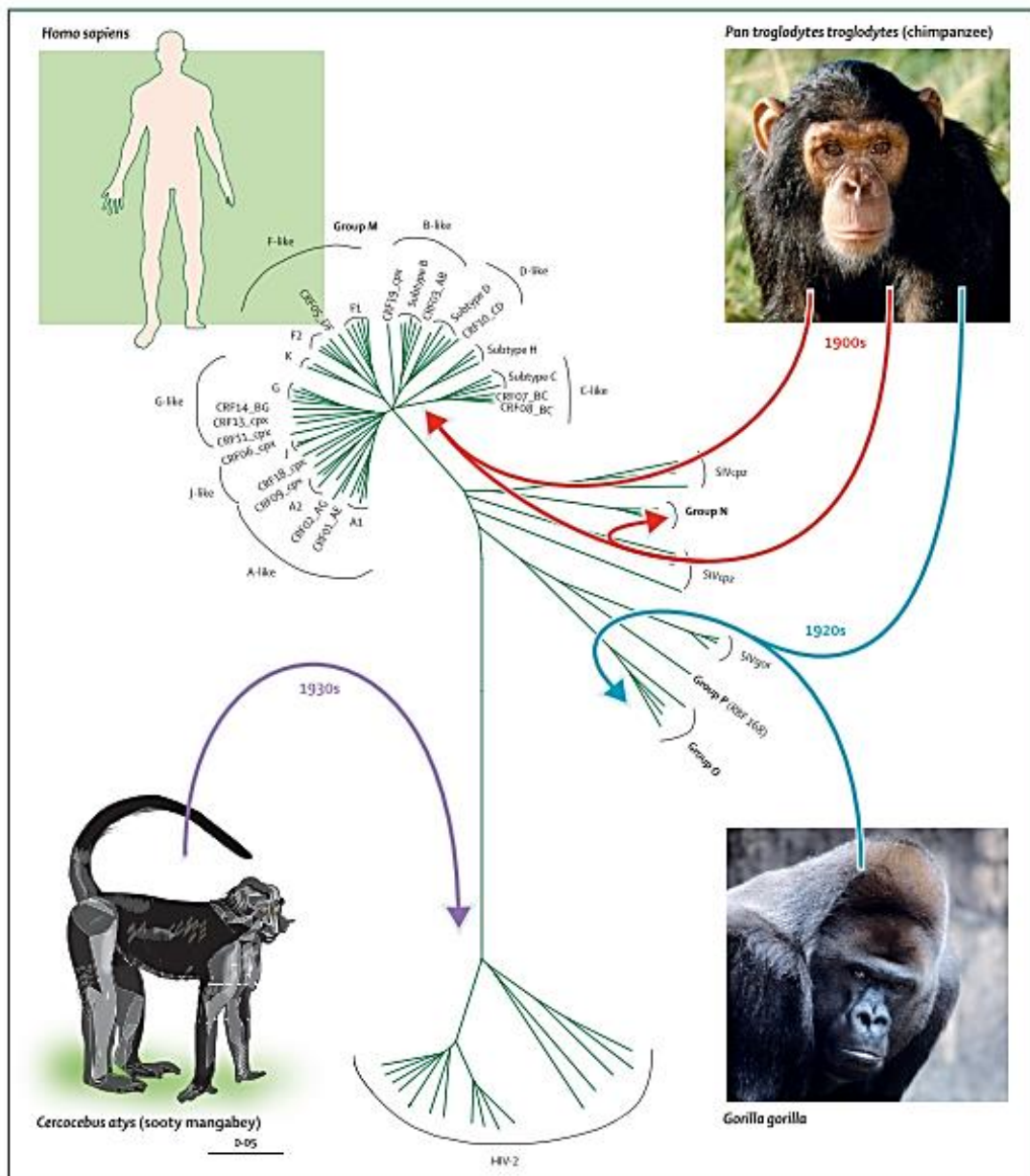


Figura 15 - Origem do HIV e sua diversidade genética.

Fonte: (TEBIT; ARTS, 2011) .

De maneira geral, durante um ciclo de replicação viral podem ser liberados, aproximadamente, 10 bilhões de partículas virais (PERELSON et al., 1996). Adicionalmente, a alta taxa de erros decorrente da ausência de mecanismos de autocorreção da enzima transcriptase reversa leva à incorporação de inserções, deleções e substituições de nucleotídeos por ciclo de replicação viral, que resulta em milhares de mutações virais a cada dia. Esse conjunto de sequências genéticas

similares coexistindo em um único hospedeiro são denominadas quasispécies virais (LEVY et al., 2004). O HIV-1 também possui alta taxa de recombinação resultante dos saltos da transcriptase reversa durante a formação da fita complementar. Em conjunto esses mecanismos conferem alta variabilidade genética ao HIV e resultam em uma classificação complexa.

O HIV-1 responsável pela pandemia, está distribuído em quatro grupos designados M (principal, de Main), O (de outlier), N (não M ou O) e P (DE LEYS et al., 1990; PLANTIER et al., 2009; ROBERTSON et al., 2000; SIMON et al., 1998)

O grupo M, possui maior variabilidade resultando na classificação de 10 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J, K, L), subsubtipos, além de formas recombinantes circulantes (*circulating recombinant forms* - CRF) e formas únicas recombinantes (*unique recombinant forms* - URF) (HEMELAAR et al., 2006, 2020a). Os CRF's recebem essa classificação quando identificados em ao menos três genomas que possuem o mesmo perfil de recombinação, e são identificados em indivíduos epidemiologicamente não-relacionados, caso este parâmetro não seja cumprido, será classificado como uma URF. Alguns subtipos (A e F) ainda podem ser classificados com subsubtipos (A1-A2-A3-A4-A6-A7-A8 e F1-F2) (DÉSIRÉ et al., 2018; MENDES DA SILVA et al., 2021; YAMAGUCHI et al., 2020) (Fig 15). Numa análise sistemática, Désiré e colaboradores propõem a junção dos subtipos B e D devido à baixa diversidade genética entre estes, e ainda a classificação deste em subsubtipos B, D1, D2, D3 (Fig.15) (DÉSIRÉ et al., 2018).

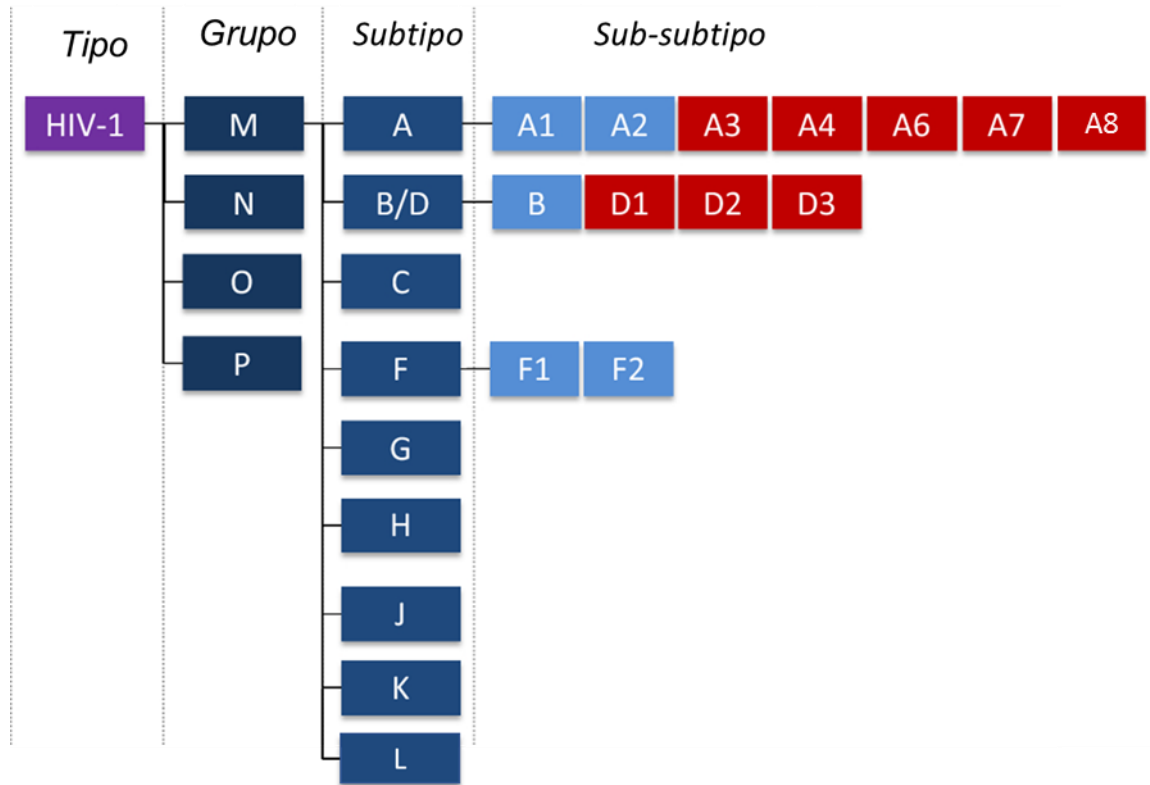


Figura 16 – **Classificação Genética do HIV-1.**

Fonte: (DÉSIRÉ et al., 2018; MENDES DA SILVA et al., 2021; ROBERTSON et al., 2000; YAMAGUCHI et al., 2020).

1.7.1 Subtipo B do HIV-1

Os estudos de epidemiologia molecular apontam que o subtipo B é o mais prevalente nas américas, estima-se que seu ancestral comum mais recente circulava na região de Kinshasa, em 1944 (1935–1951) (FARIA et al., 2014), e que este foi exportado para o Haiti provavelmente em 1964 (1960–1967) (GILBERT et al., 2007) (Fig. 17). A grande emigração para países distintos favoreceu na dispersão global do novo vírus (FARIA et al., 2014).Conseqüentemente, a resultante desse processo

de dispersão do subtipo B do HIV-1 foi a geração de variantes, uma dessas alcançou, no fim dos anos 60 e nos anos 70, os EUA, se expandiu sendo disseminada em outros países ao redor do mundo, devido ao escoamento e rotas comerciais que essas regiões dos EUA tinham, sendo esta denominada, filogeneticamente, de variante B pandêmica (B_{PAN}). No Brasil, a entrada do subtipo B ocorreu entre os anos 1960-1970 (BELLO; GUIMARÃES; MORGADO, 2006; GILBERT et al., 2007).

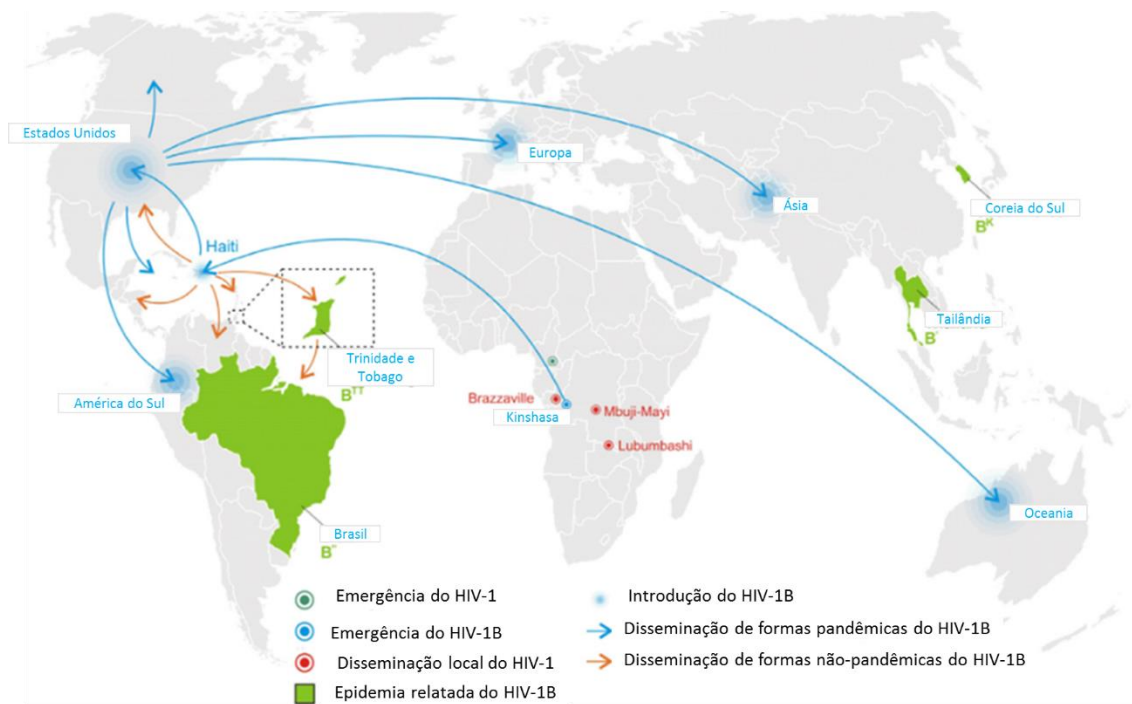


Figura 17 - Dinâmica espacial do Subtipo B do HIV-1 e variantes em todo o mundo. (JUNQUEIRA; ALMEIDA, 2016)

Outras variantes do subtipo B, todavia, permaneceram restritas principalmente à região do Caribe sendo classificadas como não pandêmicas e com denominação caribenha- B_{CAR} (CABELLO; JUNQUEIRA; BELLO, 2015; CABELLO; MENDOZA; BELLO, 2014; GILBERT et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que a formação da variante B_{CAR} ocorreu devido um surto de HIV-1 na ilha espanhola, no início da década de 1970, a circulação do vírus com transmissão limitada em países culturalmente relacionados, favoreceu a dispersão e circulação fechada mas sem causar surtos de grande significância, acarretando na formação da variante não-pandêmica que começou a se espalhar da Ilha de Espanhola atingindo Trinidad Tobago, Jamaica, México, Venezuela, Panamá, Colômbia, Equador, El Salvador, Honduras, Suriname e Brasil, na década de 1980. (CABELLO; JUNQUEIRA; BELLO, 2015; CABELLO; MENDOZA; BELLO, 2014).

Através da análise do genoma completo foram identificados pelo menos quatro variantes do subtipo B do HIV-1: B-Tailândia, B-Trinidad e a Tobago , B-Coreia e a B-Brasil (Fig. 17) (JUNQUEIRA; ALMEIDA, 2016). A variante brasileira, por outro lado, foi descoberta durante estudos voltados ao entendimento de processos de neutralização de proteínas do envelope viral originalmente realizada com base na análise do gene envelope para fins vacinais, o que levou à descrição desta variante, caracterizada pela diferença do B_{PAN} pela presença do motivo GWGR no topo da alça V3 da gp120 do envelope, no lugar do GPGR, ou seja, a troca do aminoácido W (triptofano) no lugar da P (prolina) no topo da alça V3 da gp120 do envelope viral (Fig. 17) (MORGADO et al., 1994; POTTS et al., 1993).

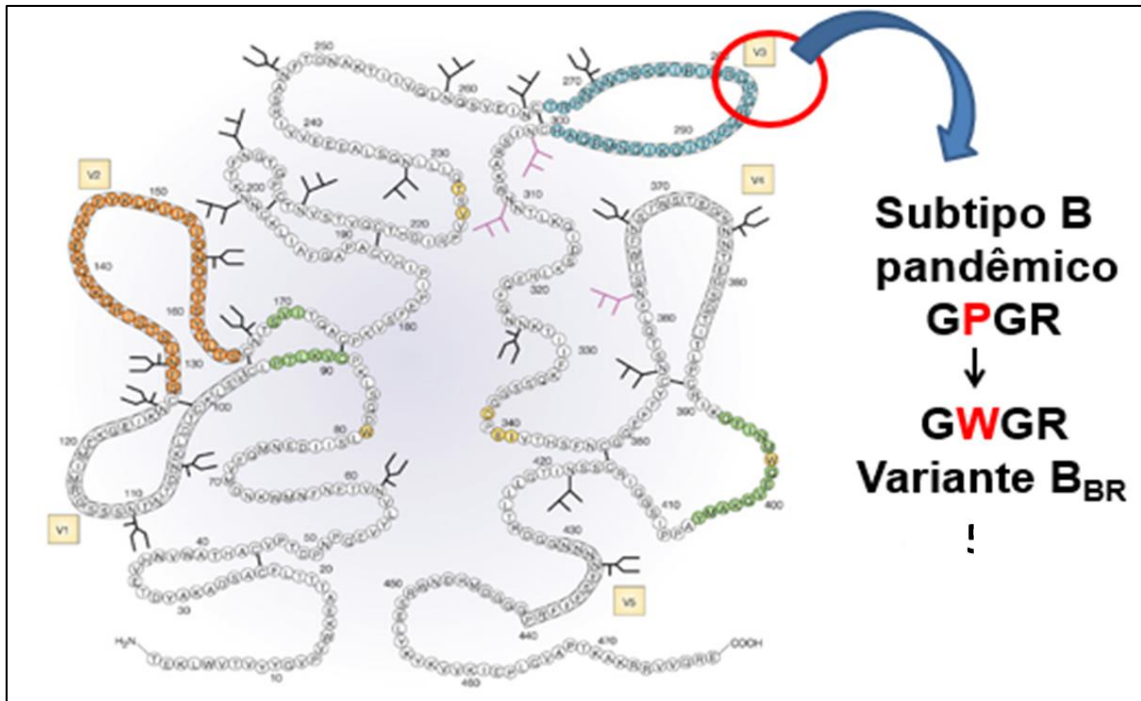


Figura 18 – Estrutura tridimensional da glicoproteína gp120 mostrando as regiões variáveis (v) e entre estas as regiões conservadas. Destacando no topo da alça v3 a troca da prolina (P) pelo triptofano (W) característico da variante B_{BR}.
Fonte: (MORGADO et al., 1998a; PIMENTEL et al., 2013)

1.8 Epidemiologia molecular do HIV

Mundialmente, a pandemia de HIV-1 tem com representante mais prevalente dentro do grupo M, o subtipo C que concentra cerca de 46,6% de infecções reportadas, circulando nos países africanos com maior número de indivíduos infectados; além disso, esse subtipo predomina no sul da África, na África Meridional, Etiópia e Índia. O subtipo B é a linhagem mais dispersa pelo mundo e predomina em grande parte da Europa, Oceania e Américas e representa 12,1%. O subtipo A (10,3%), e a forma recombinante circulante - CRF02_AG são encontrados, predominantemente, na região leste da África assim como nordeste da Europa e Ásia Central. O subtipo D

está, geralmente, limitado à região central da África, enquanto o subtipo F tem sido encontrado na África Central, na América do Sul e na Europa Oriental. O subtipo G e a forma recombinante circulante CRF02_AG foram encontrados no Leste e Oeste da África, assim como na região central da Europa (Fig. 19).

As formas recombinantes circulantes e únicas, desde 1990, foram ganhando destaque alcançando maiores prevalências alcançando 22.8% das infecções no período de 2010 a 2015. Dentre as formas recombinantes destacam-se as CRF02_AG (33,9%) e CRF01_AE (23,0%) e formaram-se no início da epidemia de HIV na África Central e se dispersaram globalmente. As URFs também apresentaram um aumento significativo ao longo dos anos, alcançando 26,7% no mesmo período. Contudo, regiões diferentes podem apresentar prevalências distintas em relação aos CRF do HIV-1, a exemplo disso, observa-se nos anos de 2010-15, em algumas regiões do mundo, proporções muito altas de recombinantes com os CRFs, representando entre 80 a 99% na África Ocidental e Central, temos alta prevalência da CRF02_AG, no Sudeste Ásia (CRF01_AE), na China (CRF01_AE, CRF07_BC, CRF08_BC), no Irã (CRF35_AD), na Estônia (CRF06_cpx) e na Argélia (CRF06_cpx). E em outras regiões foram encontradas proporções mais baixas de até 20% (nas Américas, Índia, Austrália e Leste a Sudeste de África) (HEMELAAR et al., 2019, 2020b).

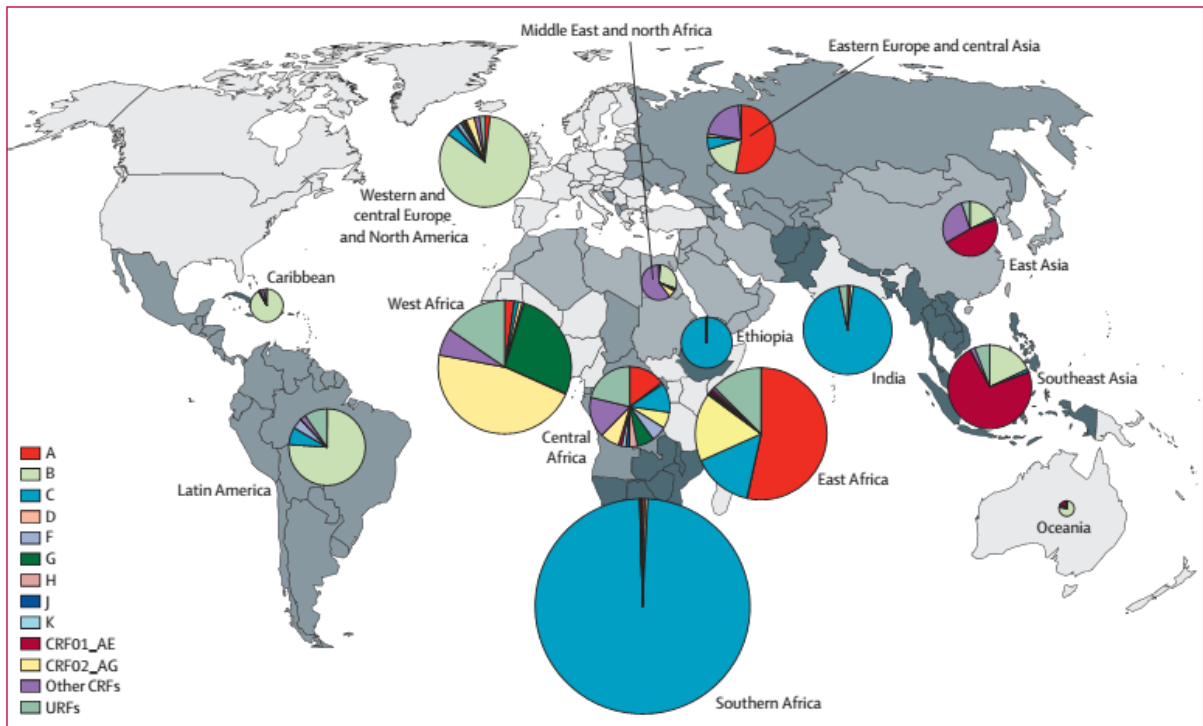


Figura 19 - Distribuição global dos subtipos do HIV-1 e formas recombinantes.

Fonte: (HEMELAAR et al., 2019)

1.8.1 Epidemiologia molecular do HIV no Brasil

Diversos estudos descrevem as prováveis rotas de entrada ou origem dos subtipos de HIV-1 mais prevalentes encontrados no Brasil. O subtipo B teve sua entrada pelo Haiti (GILBERT et al., 2007), o subtipo F1 ainda não tem sua origem definida, mas é estimado ter tido origem em países da África central, e o subtipo C em países no leste da África (BELLO et al., 2007; BELLO; GUIMARÃES; MORGADO, 2006; CABELLO; JUNQUEIRA; BELLO, 2015; SALEMI et al., 2005) (Figura 20).

De modo geral, os subtipos e formas recombinantes de HIV-1 podem apresentar dispersão distinta entre as regiões do Brasil, apresentando uma diversidade representada principalmente pelo subtipo B, o mais prevalente no Brasil com 68,8%, seguido pelos subtipos C (11,9%) e F (9%) (ARRUDA et al., 2018;

HEMELAAR et al., 2019, sendo estes percentuais baseados nas sequências de pol
brasileiras disponíveis no banco de sequências de Los Alamos. Com relação às CRF
é possível observar que a região Sudeste possui maior variedade de descrição CRFs
(BF) em relação a outras regiões do país, representadas pelas CRF_BF 28, 29, 39,
40, 46 e 72, enquanto que na região Centro Oeste apresenta CRF_BF_ 90 e 99 e
CRF81_cpx (BCF). Na região do Nordeste são observadas as CRF_BF 70 e 71, na
região Sul a única CRF_BC descrita no Brasil, a CRF31_BC (Fig 13)

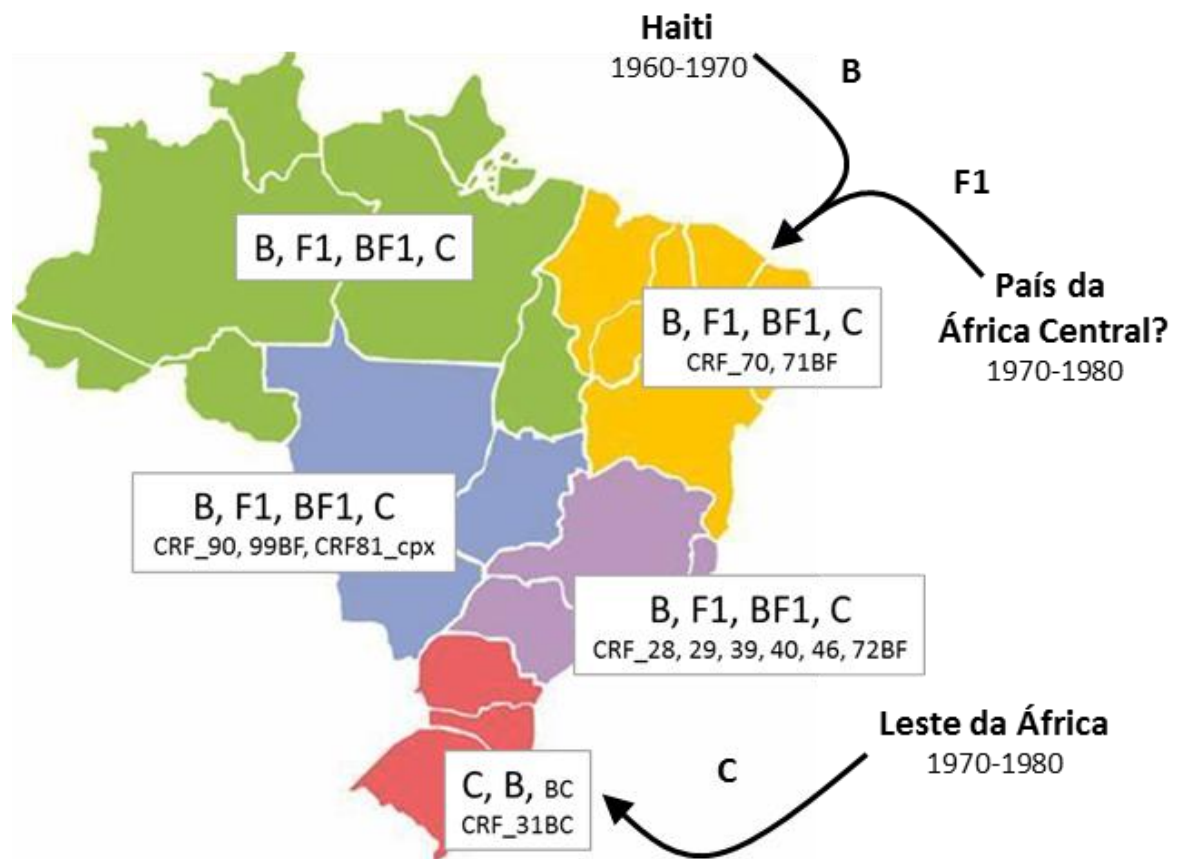


Figura 20 - **Diversidade do HIV no Brasil e origem dos subtipos B, C e F1 brasileiros.** Fonte: Adaptado de MORGADO; GUIMARÃES; GALVÃO-CASTRO, 2002. (ALVES et al., 2019; FILHO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008; PESSÔA et al., 2014a, 2014b; REIS et al., 2017, 2019; SANABANI et al., 2010; SANTOS et al., 2006).

Além disso a diversidade genética do HIV-1 no Brasil é composta também pelas formas recombinantes únicas (URFs), sendo a prevalência nacional de BF1 de 6,5% e BC de 2,1% (Fig. 21)

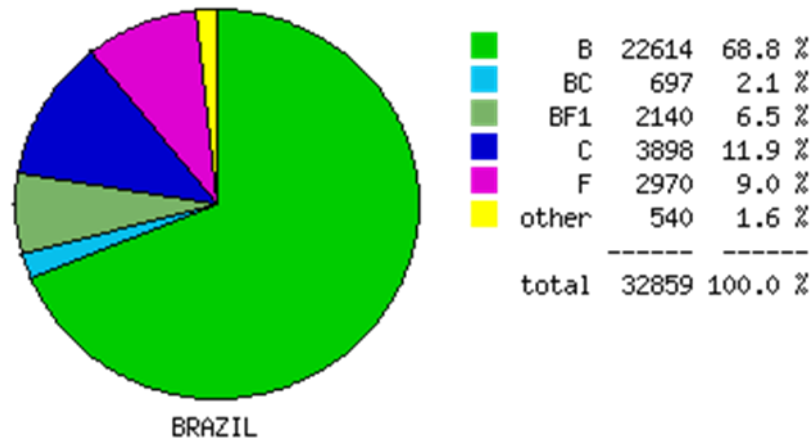


Figura 21. **Prevalência de Subtipos e Recombinantes do HIV-1 no Brasil baseada no número de sequências do gene *pol* (PR/RT), posição 2253–3272 (relativa ao isolado HXB2), acesso em 27/01/2021.** Fonte: (www.hiv.lanl.gov).

A respeito da prevalência de variantes subtipo B nos estados brasileiros, os dados epidemiológicos evidenciam que em média 95% são variantes B_{PAN} e que apenas 5% são B_{CAR}. No entanto, alguns estados da região norte (Amazonas) e nordeste (Maranhão), apresentam maior prevalência da variante B_{CAR} (14%), enquanto que no estado de Roraima que apesar de ser um dos estados brasileiros mais isolados, apresenta cerca de 41% da variante B_{CAR} (DIVINO et al., 2016), esse tipo de semelhança entre Amazonas e Roraima também é evidenciado em relação a prevalência de recombinantes BF em relação aos demais da região Norte (Figura 23) (DA COSTA et al., 2016).

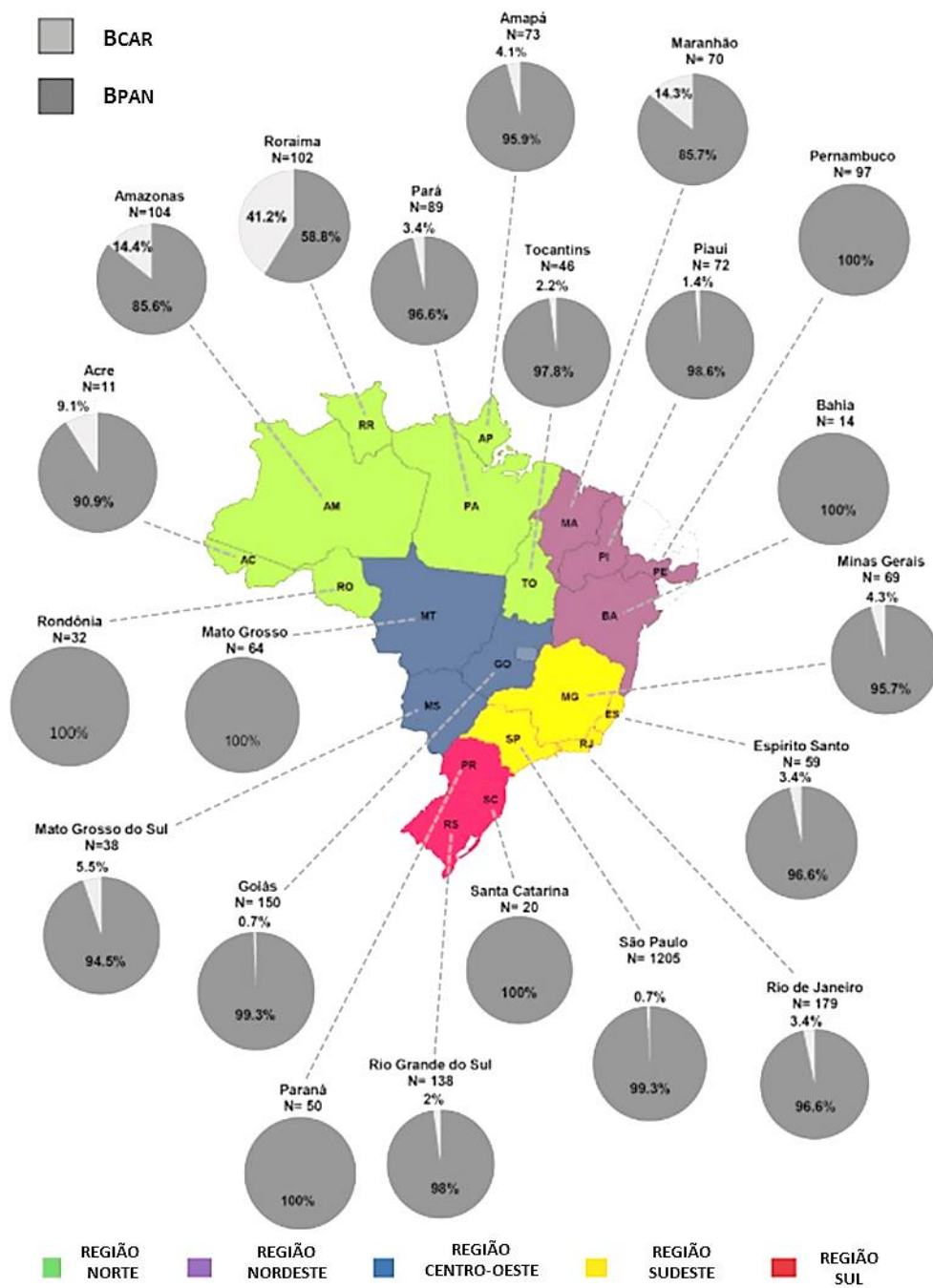


Figura 22. Proporção estimada de das variantes B_{CAR} e B_{PAN} entre indivíduos infectados pelo subtipo B do HIV-1 de diferentes estados brasileiros. (DIVINO et al., 2016).

1.8.2 Região Norte

A região apresenta uma escassez de informações em relação a epidemiologia molecular do HIV-1 quando comparada com outras regiões do Brasil, evidenciando a necessidade de novos estudos e monitoramento contínuo. A diversidade genética do HIV-1 encontrada nessa região é similar a das outras regiões do Brasil. (ALVES et al., 2019; FILHO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008; MORGADO; GUIMARÃES; GALVÃO-CASTRO, 2002; REIS et al., 2017, 2019; SANABANI et al., 2010; SANTOS et al., 2006), caracterizada principalmente pela prevalência de subtipo B que varia de 63% em Rondônia a 92% no Acre), subtipo F1 (0% no Acre a 14% no Amapá), subtipo C (0% no Acre e Roraima a 6% Tocantins), BF1 (4% Pará a 18% em Rondônia) e BC (0% no Acre, Roraima e Tocantins a 8% em Rondônia)(CARVALHO et al., 2011; CUNHA et al., 2012; DA COSTA et al., 2016b; DOS ANJOS SILVA et al., 2016; LOPES et al., 2015) (Figura 23).

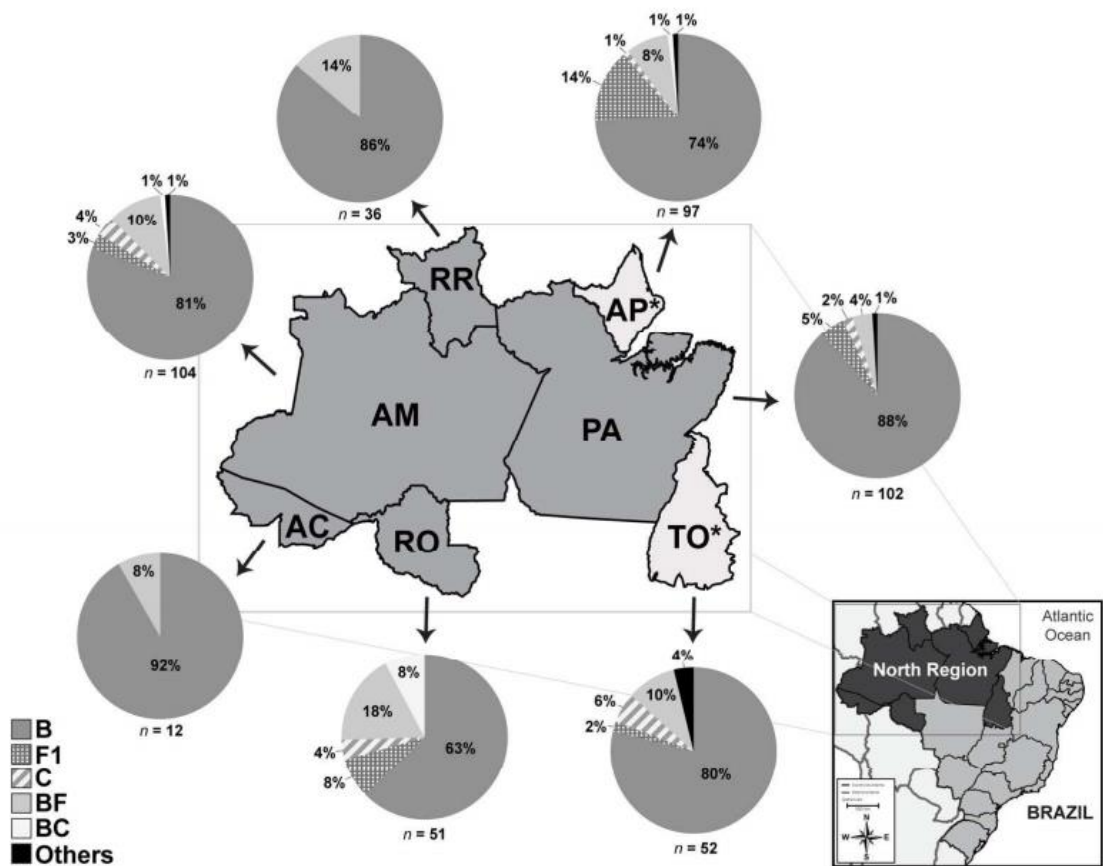


Figura 23 - Mapa região Norte brasileira retratando a prevalência estimada de subtipos e formas recombinantes do HIV entre indivíduos infectados pelo HIV nos diferentes estados. (DA COSTA et al., 2016)

2. JUSTIFICATIVA

As ações combinadas de prevenção e o avanço no tratamento de PVHIVA levaram a diminuição de novas infecções pelo HIV-1 e de casos de aids na maioria das regiões geográficas do Brasil, com exceção das regiões Norte e Nordeste que apresentaram aumento quando comparados os anos de 2019 e 2009 (BRASIL, 2020a).

Principalmente em regiões que vem apresentando um aumento nas taxas de detecção de HIV-1 e aids, é consenso a relevância do monitoramento contínuo do HIV-1, com obtenção de informações epidemiológicas e clínicas de PVHIVA para a detecção rápida de problemas relacionados à falha terapêutica ao longo do tratamento, para retomada da supressão da replicação, impedindo a progressão da doença e a transmissão do vírus. Aliado a estas informações epidemiológicas e clínicas, as ferramentas moleculares que permitem a identificação da diversidade genética, e das possíveis mutações em regiões alvo da terapia, que estão associadas à falha terapêutica, têm importante papel na vigilância epidemiologia e genômica do HIV-1. (BRENNER; COUTSINOS, 2009; LOPES et al., 2015; PALMA et al., 2012).

Percebe-se, com isso, que o cenário epidemiológico e de epidemiologia molecular de Manaus é problemático, com poucos dados clínicos, sociodemográficos, e sobre a diversidade do HIV-1 e DRMs, levando a necessidade de investigar estas. Principalmente porque a região Norte do Brasil possui sete estados (Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), e corresponde a cerca de 45% do território nacional. Esta região faz divisa com outras regiões brasileiras (Centro-Oeste e Nordeste) e fronteira com países como Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana,

Suriname e Guiana Francesa (IBGE, 2021) e devido a essa localização geográfica favorecer um cenário epidemiológico distinto de outras regiões do Brasil.

Diante do exposto nos propusemos a avaliar indivíduos com falha virológica a esquemas de TARV em curso. As informações obtidas neste estudo podem ajudar a agregar conhecimento com relação a epidemiologia molecular do HIV-1 com base nas regiões da protease e transcriptase reversa e *gp12* do envelope viral de pacientes acompanhados na região Norte, verificar a prevalência das mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa (RT) e protease (PR), assim como verificar a suscetibilidade aos antirretrovirais.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade genética do HIV-1 e as mutações de resistência às drogas em pessoas vivendo com HIV/aids apresentando falha à terapia antirretroviral no Amazonas.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Verificar o perfil sociodemográfico e clínico de pessoas vivendo com HIV/aids em falha à terapia antirretroviral em Manaus.
- ✓ Estimar a prevalência dos subtipos de HIV-1 circulantes e variantes do subtipo B (B pandêmico, B caribenho e brasileiro) em Manaus.
- ✓ Investigar a prevalência de mutações de resistência às drogas nos genes da protease e na transcriptase reversa.
- ✓ Investigar a susceptibilidade aos antirretrovirais.
- ✓ Avaliar genotipicamente o tropismo viral

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População de Estudo

A Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) é o centro de referência de Manaus para o acompanhamento de pessoas vivendo com HIV e AIDS, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos 2018 e 2019 foram atendidos 1.033 indivíduos (HIV) e 992 indivíduos (aids).

Visando melhor acompanhamento pessoas vivendo com HIV/aids foi criado em 2018, o ambulatório de falha, em conjunto com o setor de farmácia e ambulatórios, onde todos que apresentavam falha virológica eram encaminhados para o mesmo.

As PVHIVA atendidas no ambulatório que estavam sob uso de TARV há pelo menos seis meses e apresentaram falha virológica, (contagem de RNA superior a 1000 cópias/mL de plasma) e, portanto, elegíveis para solicitação de genotipagem pelo infectologista conforme diretrizes do Ministério da Saúde na época do estudo foram convidados a participar do estudo prospectivo de corte transversal. No período de 05/2018 a 07/2019 foram recrutados 100 s PVHIVA s que aceitaram participar do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE- anexo1)

Os dados demográficos e clínicos foram coletados por meio de um questionário estruturado (ficha clínica e de investigação soroepidemiológica, anexo 2). Após a coleta de sangue, as amostras foram processadas para separação do plasma e sangue total e armazenados a -80°C para posterior análise. O estudo foi aprovado no

comitê de ética da FIOCRUZ sob protocolo CAAE 87171018.4.0000.5248 e FMT-HVD CAAE 87171018.4.3001.0005.

4.2 Coleta de Amostras e processamento das amostras

Para realização do estudo foram coletados via punção venosa a vácuo 4mL de sangue com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após centrifugação por 10min à 15.000 rpm, em temperatura ambiente, foram separadas duas alíquotas de plasma (2mL) e uma de sangue total (1mL) e ambas foram armazenadas em ultra freezer com temperatura -80°C para posterior análise genômica. As análises genômicas foram realizadas no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ-RJ (LABAIDS) ou na plataforma de sequenciamento do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ-AM.

4.3 Extração de RNA e RT-PCR

A extração do material genético foi realizada através do kit da Qiagen (QIAamp RNA mini kit, Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo instruções do fabricante. Seguido da transcrição reversa para obtenção de cDNA utilizou-se o protocolo da enzima MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) utilizando iniciadores específicos para cada alvo gênico (MMRT6 para *PR/RT* e ED12 para C2-V3)

4.4 Amplificação, purificação e sequenciamento da PR/RT e C2-V3

A PCR do gene *pol* (PR/RT) foi realizado seguindo o protocolo descrito por Delatorre (2017), e para a amplificação da região C2V3 da gp120 do envelope viral os

iniciadores externos ED5/ED12 e os internos ED31/ED33 (DELATORRE et al., 2017; DELWART et al., 1993) com base em uma metodologia “*in house*” já padronizada de nested-PCR usando a enzima Platinum® Taq Polimerase (Invitrogen, EUA) conforme a tabela 2.

Tabela 2 - **Primers utilizados na reação de nested-PCR para regiões *PR/RT* e *Env* metodologia “*in house*”:**

Round/ Região	Primers	Posição em relação ao genoma do HXB2	Orientação	Sequência 5'-3'
1° <i>PR/RT</i>	G17S	2017-2040	senso	AAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGA
	MMRTR6	3628-3647	anti-senso	TTTTACATCATTAGTGTGGG
2° <i>PR/RT</i>	MMRT10	2077-2096	senso	CAGGCTAATTTTTTAGGGAA
	MMRTR5	3555-3574	anti-senso	TAAATTTGATATGTCCATTG
1° <i>Env</i>	ED5	6556-6581	senso	ATGGGATCAAAGCCTAAAAGCCATGTG
	ED12	7822-7792	anti-senso	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG
2° <i>Env</i>	ED31	6816-6844	senso	CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG
	ED33	7359-7380	anti-senso	TTACAGTAGAAAAATCCCCTC

Para a região *pol* foi gerado um fragmento final de 1478 pb (posições 2077-3574 em relação ao HXB2), e *env* um fragmento final de 563 pb (posições 6816-7380 em relação ao HXB2). Para ambas as reações foi utilizado como protocolo de ciclagem: 94°C por dois minutos para desnaturação inicial, em seguida 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por dois minutos; e 10 minutos a 72°C para extensão.

Os produtos de PCR amplificados foram purificados utilizando-se o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, UK), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos foram quantificados em gel de agarose 2% comparando-se a intensidade da banda amplificada com o marcador *Low DNA mass ladder* (Thermo Scientific, MA, EUA). Os produtos foram submetidos

posteriormente à reação de sequenciamento utilizando-se o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, CA, EUA). Os iniciadores utilizados foram ED31 e ED33 para região do envelope viral, e para a polimerase foram utilizados os primers MMRT10, LR51, DP16, RT4, RT9, Pol4, SEQRT e MMRT5, conforme a tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados somente no sequenciamento

Primers	Posição em relação ao genoma da HXB2	Orientação	Sequência 5'-3'
LR51	2813-2837	anti-senso	CCTYCAAGTTAATCCTTATGGTGTA
DP16	2253-2274	senso	CCTCARRTCACTCTTTGGCARC
RT4	3234-3250	anti-senso	AGTTCATAMCCCATCCA
RT9	2470-2492	senso	GTACAGTRTTAGTAGGACCTACA
LR50	2709-2734	senso	AATCCATAYAAYACTCCAGTATTTGC
Pol4	2982-3001	senso	CARTAYAATGTGCTTCCACA
SEQRT	3003-3024	senso	GGATGGAAAGGATCACCAGCAA

As amostras foram sequenciadas no sequenciador automático ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, CA, EUA) pertencentes as Plataforma de sequenciamento do Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ-AM e do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ – RJ.

As sequências correspondentes às regiões do *env* e da *pol* foram editadas utilizando-se o software SeqMan do programa DNASTAR 4.00, e alinhadas pelo programa MEGA 6.0 juntamente com sequências de referência correspondentes dos diferentes subtipos de HIV-1 obtidas do banco de dados de Los Alamos (<http://hiv.lanl.gov>) até março 2020. Os alinhamentos *pol* e *env* finais continham um fragmento de 1478 nucleotídeos (nt) e (posições 2253-3272 em relação ao HXB2), e um fragmento de 563nt e (posições 6921-7279 em relação ao HXB2), respectivamente.

As análises filogenéticas para a determinação dos subtipos de HIV-1 foram realizadas utilizando o programa MEGA 7.0. As árvores filogenéticas foram computadas usando o método de Neighbor-Joining usando parâmetros para avaliar a taxa de substituição de Tamura-Ney utilizado Bootstrap com 1000 réplicas para estimar o nível de confiança da ramificação na árvore filogenética. A detecção de possíveis recombinações foi realizada por meio de análise de varredura, que foi realizada usando o programa bootscan do Simplot 3.5.1. Essas análises foram realizadas em uma janela deslizante de 200 nt movendo-se em etapas de 10 nt.

Para a caracterização da variante BBR na região C2V3, no alinhamento *env* foi realizada a tradução das sequências em aminoácidos usando o programa MEGA 7.0, e todas as sequências que apresentaram o motivo GWG no topo da alça V3 foram consideradas como pertencentes a esta variante.

Para a caracterização das variantes do subtipo B em B_{CAR} e B_{PAN} foi confeccionado alinhamento da PR/RT retirando as regiões relacionadas à resistência. As árvores de máxima verossimilhança foram reconstruídas com o programa PhyML (GUINDON et al., 2010) usando um servidor web online (GUINDON et al., 2005). A busca heurística da árvore foi realizada usando o algoritmo de troca de galhos “Subtree-Pruning-Regrafting” (SPR), e a confiabilidade da topologia obtida foi estimada com o teste de razão de verossimilhança aproximada (ANISIMOVA; GASCUEL, 2006). As árvores de máxima verossimilhança foram visualizadas usando o programa FigTree v1.4.0.

4.5 Predição genotípica dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4

A predição do uso do correceptor foi realizada com base na sequência de aminoácidos da região V3 da gp120 do envelope de cada indivíduo utilizando o programa Geno2pheno (<https://coreceptor.geno2pheno.org/>), com falso positivo igual a 10%, conforme as orientações europeias de testes de tropismo. Sendo as sequências preditoras de vírus com tropismo pelo CCR5 ou não CCR5 (HAYASHIDA et al., 2017; LENGAUER et al., 2007).

4.6 Análise de mutações de resistência aos ARV

As sequências do tipo fasta da PR/RT de cada amostra foram submetidas ao site Stanford HIV Drug Resistance Database (hivdb.stanford.edu). Foram consideradas todas mutações principais de resistência da lista atualizada deste site (https://hivdb.stanford.edu/pages/download/resistanceMutations_handout.pdf) e (<https://www.iasusa.org/resources/hiv-drug-resistance>) para gerar o laudo final contendo as mutações de resistência detectadas e a implicação do conjunto delas na susceptibilidade aos inibidores de PR e RT.

4.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio dos softwares GraphPad Prism versão 5 e R, com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. As comparações estatísticas entre e dentro dos grupos foram feitas usando o teste exato de Fisher, o teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis quando apropriado.

5. RESULTADOS

Dos 100 indivíduos recrutados para participar do presente estudo, foi possível amplificar a região da PR/RT de 95% das amostras. Destas, obtivemos 92 sequências para subtipagem e análise de mutações de resistência às drogas, sendo estes indivíduos alvo das análises subsequentes.

5.1 Dados epidemiológicos e clínicos

Dos 92 indivíduos portadores de infecção pelo HIV-1 em falha virológica incluídos no estudo, a maioria (72%) eram homens, com idade média geral de 40 anos (IQR, 31-46), e de modo geral aproximadamente 95% eram residentes em Manaus, capital do estado do Amazonas. Em relação à orientação sexual, 74,4% se autodeclararam heterossexuais, 19,2% homossexuais e 6,4% bissexuais. de acordo com o estado civil declarado no questionário 51% solteiros, 16,3% declaram ter união estável, 14,1% dos indivíduos eram casados e 18,4% não relataram, Nos últimos 2 anos, 22,8% disseram ter se relacionado com mais de 3 pessoas e 36,9% se relacionaram entre 1 a 3 pessoas, 22,8% relataram não ter se relacionado durante esse período e 17,3% não relataram. A carga viral média do HIV-1 (\log_{10}) foi 4,4 (IQR, 4-5), e a contagem média de células T-CD4⁺ foi 168 células/mm³ (IQR, 50,5-342,5) em data próxima ao recrutamento e coleta da amostra para o estudo. Os pacientes desta coorte apresentavam em média seis anos (IQR, 4-7) em uso de TARV, sendo que 57,6% deles estavam uso de ARV indicados no primeiro esquema, representado pelo uso de 2 ITRN + 1 ITRNN, enquanto 42,4% já haviam passado por mudanças de ARV de primeiro esquema, onde 31,5% tomavam 2 ITRN + IP, e 10,9% estavam sob uso de 2 ITRN + INI (Tabela 4).

Tabela 4 - **Dados epidemiológicos dos 92 pacientes portadores de infecção pelo HIV-1 em falha virológica sob uso da terapia antirretroviral.**

Variáveis	Total
	n=92 (percentual)
Sexo	
Mulher	26 (28,3)
Homem	66 (71,7)
Idade	
Mediana (IQR)	40 (31,4)
Residente em	
capital do Amazonas	87 (94,6)
interior do estado do Amazonas	5 (5,4)
Orientação sexual	
Bissexual	5 (6,4)
Heterossexual	58 (74,4)
Homossexual	15 (19,2)
Não declarados	14 (15,2)
HIV (log)	
Mediana (IQR)	4,4 (4,5)
CD4⁺ células/mm³	
Mediana (IQR)	168 (50,5-342,5)
Tempo de tratamento ARV total (anos)	
Mediana (IQR)	6 (4-7)
Esquema terapêutico em uso	
Primeiro esquema	55 (59,7)
Troca do esquema terapêutico	37 (40,2)
Combinação de classes de ARV em uso	
2 ITRN + 1 ITRNN	53 (57,6)
2 ITRN + INI	10 (10,9)
2 ITRN + IP	29 (31,5)

IQR-, Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleotídeos -ITRN, Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleotídeos -ITRNN, inibidores de Inegrase - INI, inibidores de protease - IP.

A análise filogenética das 92 amostras sequenciadas em *pol* demonstraram que 83 sequências (90,2%) se alinharam as sequências de referência do subtipo B, assim como apenas três sequências ao sub-subtipo F1 e apenas duas amostras ao subtipo C (Figura 23b). Conforme a figura 23a, apenas quatro amostras, analisadas na região em *pol*, não se agruparam a nenhum clado de subtipo de HIV-1 com amostras de referência na árvore filogenética, com isso foi realizada a análise de recombinação através da análise de bootscan utilizando árvores permutadas, conforme observado na figura 24.

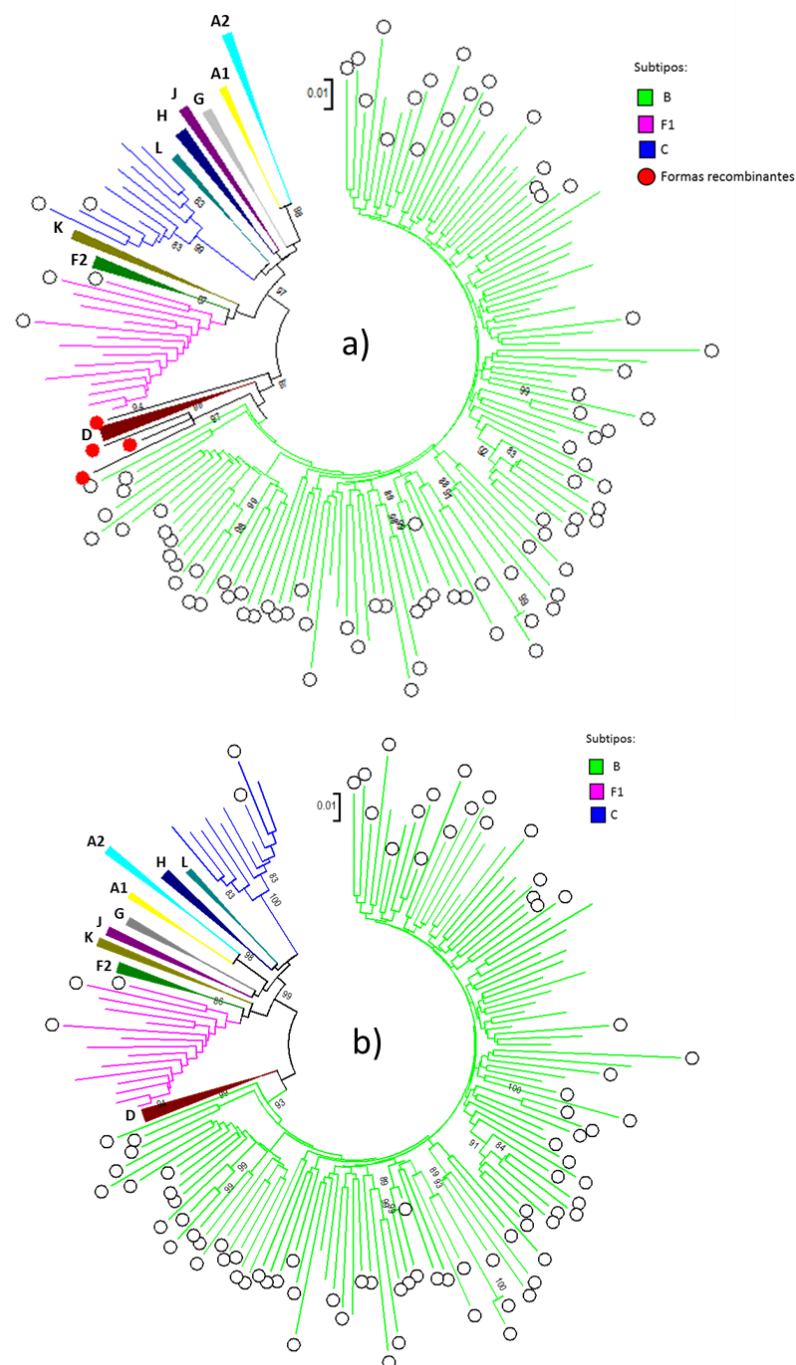


Figura 24 - **Árvore filogenética de Neighbor-Joining das 92 amostras amplificadas e sequenciadas na região PR/RT.** a) árvore filogenética das 92 seqüências, incluindo as classificadas como subtipos puros e as recombinantes, b) árvore filogenética com apenas seqüências dos subtipos puros encontrados. Bootstrap foi aplicado usando 1.000 réplicas e os valores acima de 80 estão apresentados. Subtipos do HIV-1 representados pelas cores: verde (subtipo B) rosa (sub-subtipo F1) azul (subtipo C). Os círculos brancos representam as seqüências do presente estudo, já os círculos em vermelho amostras deste estudo a serem investigadas quanto ao perfil de recombinação.

Conforme a figura 24, a sequência 18BRAM014 foi classificada como subtipo B na posição 0 – 800 bp, e na posição 800 – 1100 bp como subtipo C. A sequência 17BRAM012 foi classificada como subtipo B na posição 0 – 450 bp e 750 – 1100 bp, enquanto de 450-750 bp como subtipo F1. Por outro lado, a sequência 18BRAM068 não foi classificada na posição 0 – 750 bp, e na posição 750 – 1100 bp é subtipo B. A sequência 17BRAM067 foi classificada como subtipo B nas posições de 400 a 650 bp e 950 a 1150 bp, com os demais fragmentos não classificados. De acordo com árvore filogenética destas amostras recombinantes e CRF já descritos (Figura 25), a sequência 18BRAM014, classificada como BC (figura 24), não se agrupou a nenhum CRF de referência, sendo assim um URF_BC. Já a sequência 17BRAM012, a qual confirmou ser BF no bootscan (figura 24), se agrupou com as sequências 17BRAM067 e 18BRAM068, que apresentaram regiões inconclusivas no bootscan (figura 25). Um novo bootscan foi gerado colocando-se a amostra 17BRAM012 como referência e retirando-se as referências dos subtipos B e F, e confirmou-se que as sequências 17BRAM067 e 18BRAM068 são caracterizadas como URF_BF, contudo estas têm alta similaridade no fragmento analisado. Visto este agrupamento e a ausência de relação epidemiológica entre estes indivíduos, há necessidade de investigação de outras regiões genômicas destes para investigar a possibilidade de descrição do primeiro CRF na cidade de Manaus.

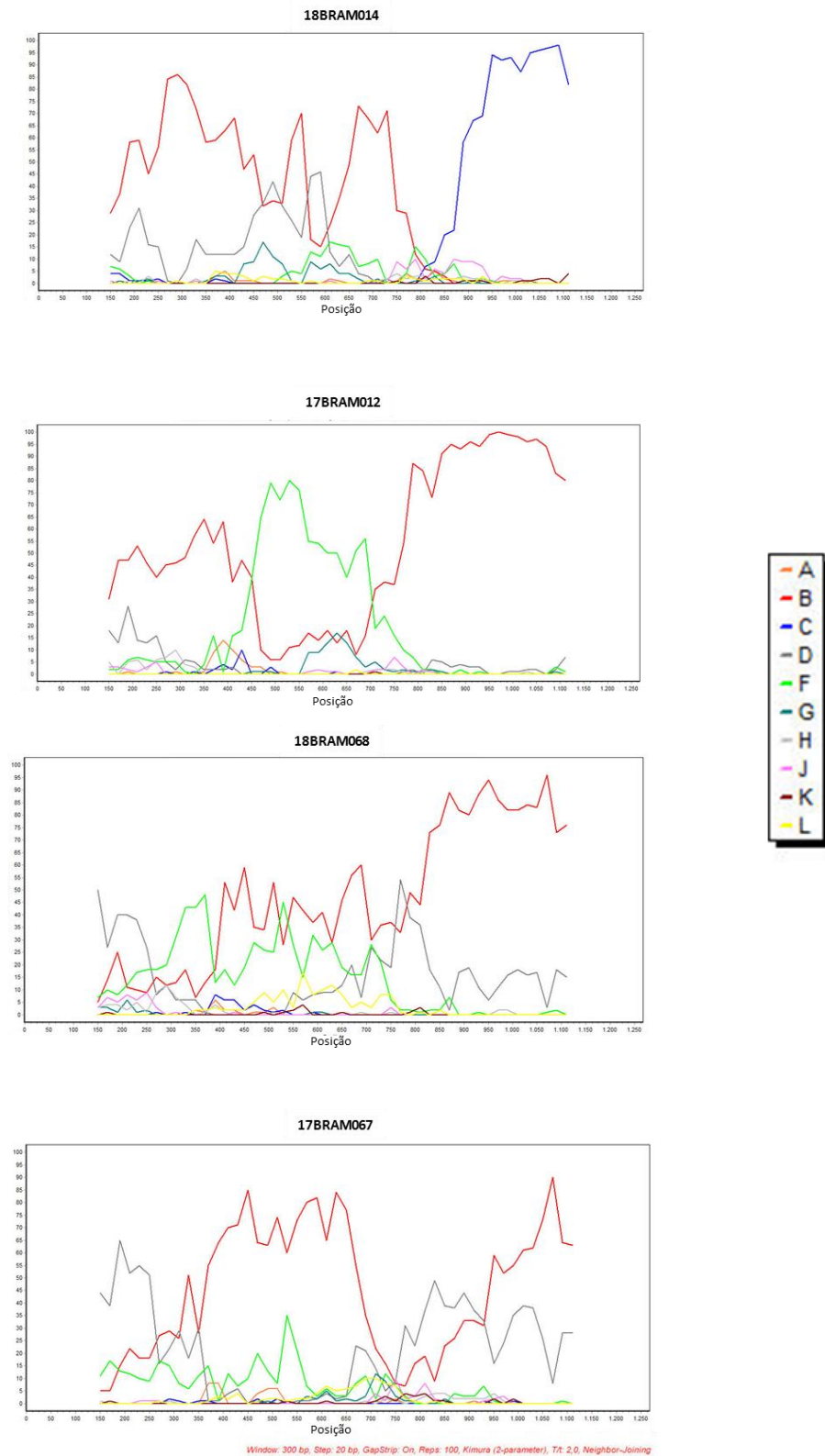


Figura 25 – **Análise das quatro amostras possíveis recombinantes entre as 92 amostras amplificadas na região *pol***. Análise de recombinações usando o programa boostcan do Simplot 3.5.1. usando o método análise neighbor-joining (NJ) com o modelo de dois parâmetros de Kimura realizadas em uma janela deslizante de 300 bp movendo-se em etapas de 20 bp.

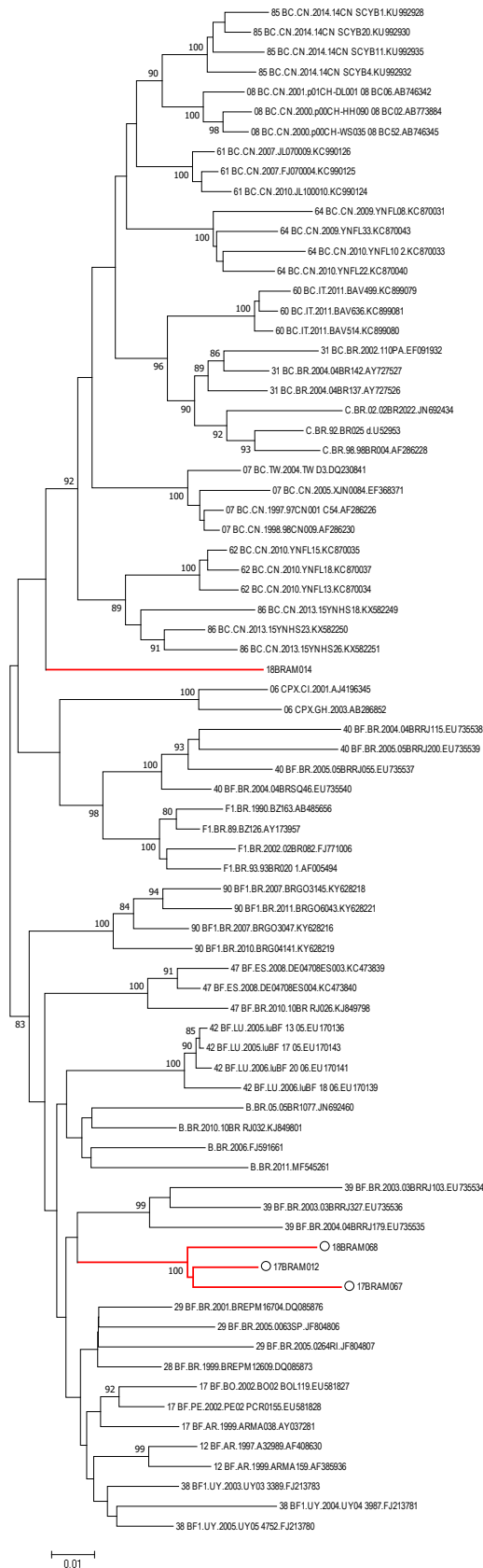


Figura 26 - Árvore filogenética de Neighbor-Joining das quatro amostras amplificadas e sequenciadas na região PR/RT recombinantes e seqüências CRF_BF e BC de referência.

Das 83 sequências classificadas como subtipo B na região *pol* analisadas, 13 agruparam-se às sequências de referência da variante caribenha, e 70 com a variante pandêmica (Figura 26)

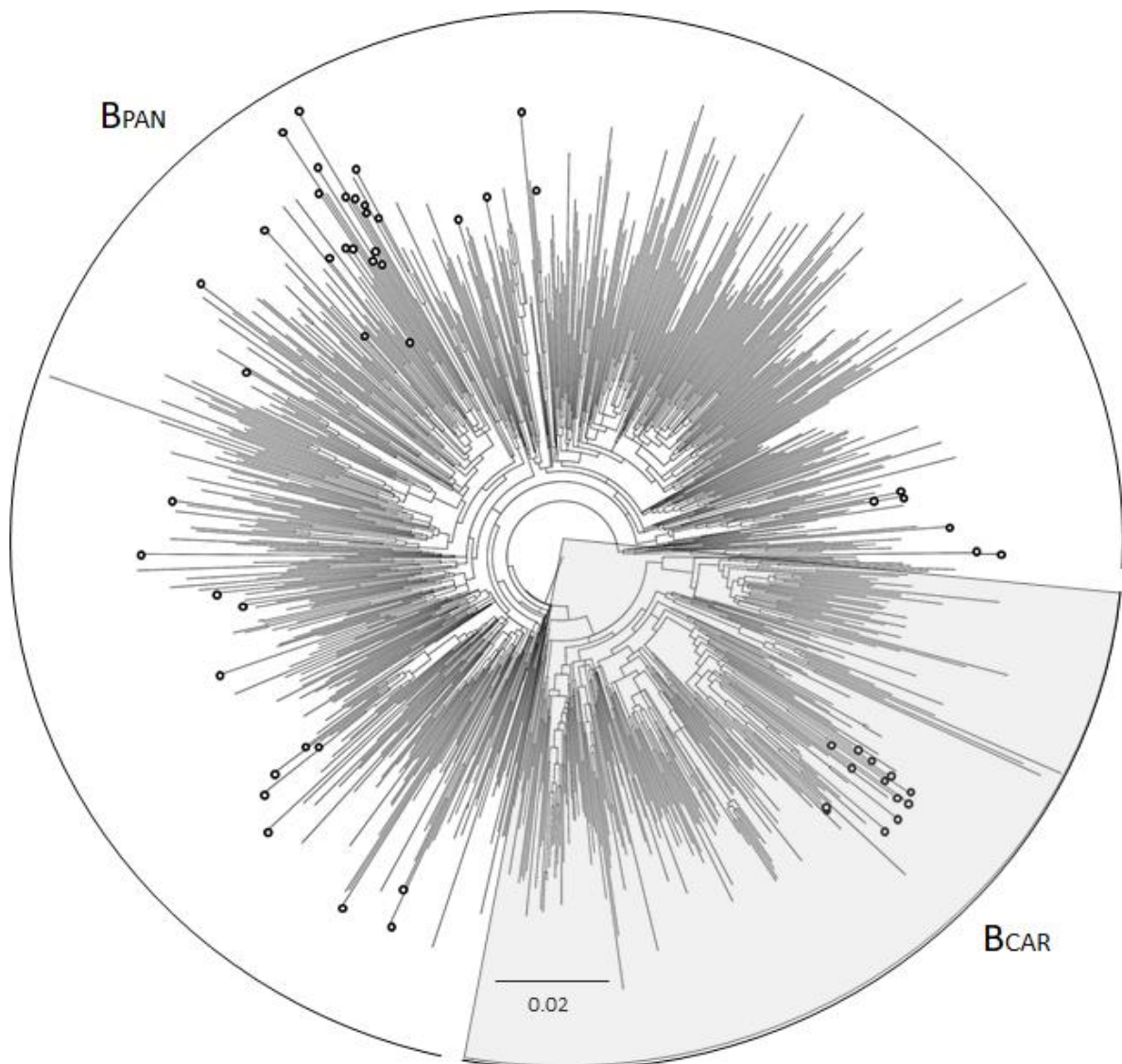


Figura 27 - **Árvore Filogenética máxima verossimilhança das 83 amostras do subtipo B amplificadas na região *pol***. As sequências de Manaus foram analisadas conjuntamente com sequencias referências dos clados B PANDEMICO e B CAR. As sequências deste estudo estão destacadas com círculos.

Dos 92 indivíduos cujo material biológico foi amplificado e sequenciado para PR/RT, apenas 78 amostras foram amplificadas e sequenciadas na região do envelope. Na árvore filogenética da figura 27 é possível observar que 65 seqüências se alinharam as seqüências B de referência, 11 se alinharam as seqüências do sub-subtipo F1, e apenas 1 ao subtipo C. Visto que apenas duas das três seqüências recombinantes em *pol* se agrupam em *env*, não convém a realização da amplificação e análise do genoma, visto que não será possível a descrição de um CRF.

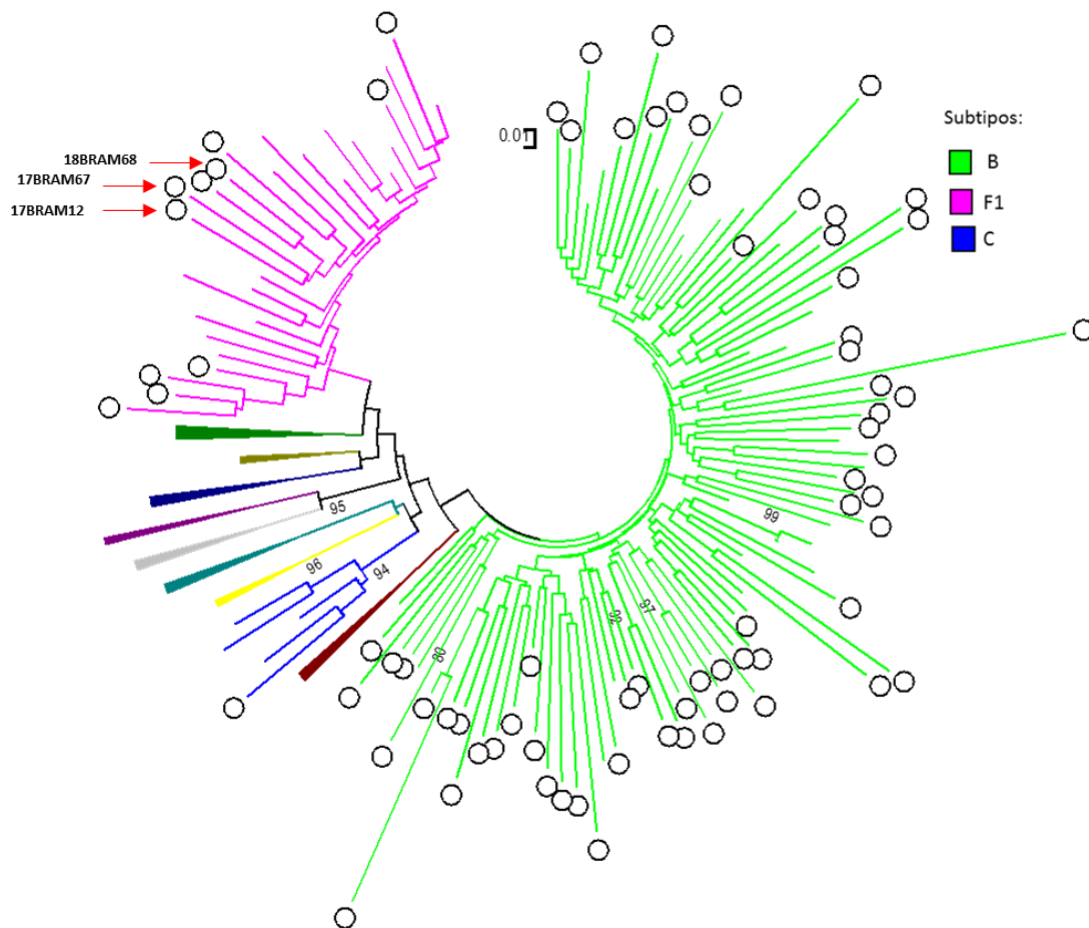


Figura 28 - **Árvore Filogenética de Neighbor-Joining das 78 amostras amplificadas e sequenciadas na região *env*.** Bootstrap foi aplicado usando 1.000 réplicas e os acima de 80 estão apresentados. Subtipos do HIV-1 representados pelas cores: verde (subtipo B) rosa (sub-subtipo F1) e azul (subtipo C). Os círculos brancos representam as seqüências do presente estudo.

Assim, de acordo com a inferência filogenética das regiões *pol* (RT/PR) (Fig 24) e *env* (Fig 28) juntas, foi possível classificar essas 78 sequências de HIV-1 (*pol/env*) como: 67,4% subtipo B/B, F1/F1 (1,1%), C/C (1,1%) e 15,3% eram genomas em mosaico, dos quais 14,2% BF1 (B/F1 - 8,7%, F1/B - 2,2% e BF1/F1- 3,3%), e 1,1% BC/B. No entanto, para as 14 sequências restantes (15,1%) obtidas apenas na região *pol*, 14% eram do subtipo B e 1,1% era do subtipo C (tabela 5).

Tabela 5 - **Subtipagem e genotipagem dos 92 pacientes HIV com falha virológica**

Variáveis	Total
	n=92 (percentagem)
HIV-1 subtipo (PR/RT/<i>env</i>)	
B/B	62 (67,4)
F1/F1	1 (1,1)
C/C	1 (1,1)
B/F1	8 (8,6)
F1/B	2 (2,2)
BF1/F1	3 (3,3)
BC/B	1 (1,1)
B/_	13 (14,1)
C/_	1 (1,1)
Variante do subtipo B (PR/RT)	
B _{PAN}	70 (84,3)
B _{CAR}	13 (15,7)

Em relação às variantes do subtipo B do HIV-1 (Tabela 5) 84,3% (n=70) foram classificadas como pandêmicas, e 15,7% (n=13) como caribenhas na região *pol* conforme a figura 27. Com base nas análises dos 78 indivíduos estudados

sequenciados em *env* foi possível verificar que das 65 amostras do subtipo B do HIV-1, 9% eram variantes brasileiras (B_{BR}). Verificamos também que a maioria (66,7%) dos 78 amostras sequenciadas na região *env* tinha o vírus R5 (Tabela 5).

Entre os 92 indivíduos estudados, DRMs foram observadas em 82 sequências (89,1%), e apenas 10 (10,9%) não apresentavam DRM. Destes 82 indivíduos 91,5% apresentavam DRMs associadas à ITRN (n=75), e 84,1% aos ITRNN (n=69), figura 28. As DRM mais frequentemente detectadas foram M184I/V (68/82; 82,9%), K70E/R (16/82; 19,5%) e T215F/Y (17/82; 20,7%) para ITRN, e K103N/S (52 /82;63,4%), P225H (15/82; 18,3%) e V106A/I/M (14/82; 17,1%) para os ITRNN (Fig. 28). Mutações análogas da timidina (TAM) foram detectadas em 35,4% dos indivíduos, sendo 17,1% (14/82) pertencentes a via mutacional TAM-1, incluindo as mutações M41L, L210W e T215Y, e 20,7% (17/82) pertencentes a TAM-2, incluindo as mutações D67N, K70R, T215F e K219Q/E, conforme a figura 29. Por outro lado, apenas 17% dos indivíduos apresentaram DRM associadas à resistência aos inibidores da protease (n=14), e as mutações mais frequentes foram V82A/L/M (6/82; 7,3%) e I54L/M/V (5/82; 6%), L90M (4/82; 4,8%), M46L/I (4/82; 4,8%), figura 29.

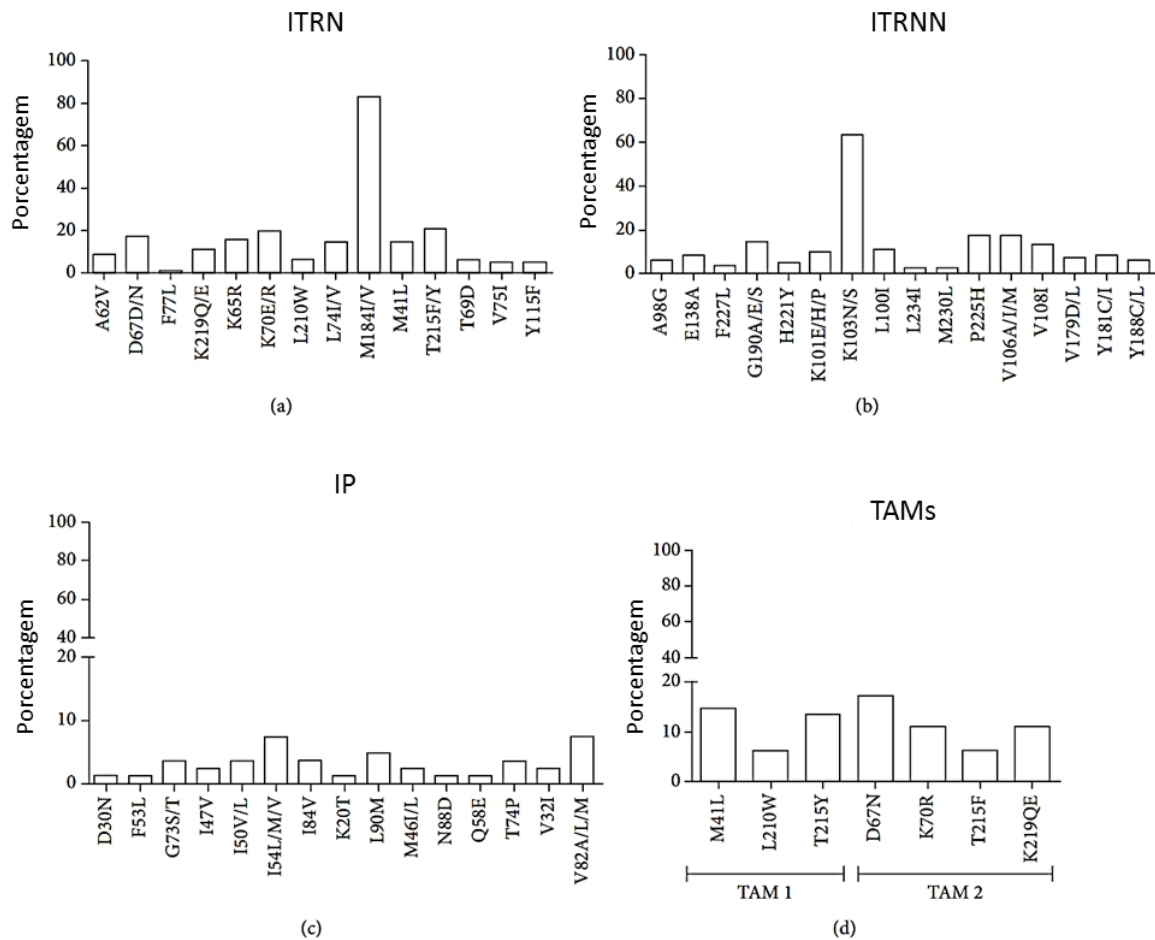


Figura 29 - Frequência de mutações de resistência à drogas do HIV-1 de acordo com a classe de inibidores e TAMs detectados em 82 indivíduos. a) DRM para ITRN- inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeo (91,5%, n = 75/82), b) DRM para ITRNN- inibidor da transcriptase reversa de não-nucleosídeo (84,1%, n = 69/82) c) DRM para IP -protease inibidores (17%, n = 14/82) e d) Mutações de análogos da timidina TAM [TAM-1 (n = 14), TAM-2 (n = 17)].

Alto nível de resistência à classe ITRN foi verificado em 85,3% dos casos (n=70/82), sendo a maioria 82,9% (n = 68/82) entre aqueles em uso de 3TC, e a mutação M184I/V estava presente em todos eles. No entanto, apenas seis daqueles 70 indivíduos que estavam tomando TDF (8,5%) tinham alto nível de resistência contra TDF, apesar de seu alto uso nos esquemas antirretrovirais (Tabela 6), da mesma forma como alto nível de resistência foi detectado apenas em seis daqueles 46 indivíduos que faziam uso de IP (13,0%). TDF permaneceu aceitável quanto ao uso

para a maioria dos indivíduos estudados (91,5%). assim como o DRV para todos os indivíduos (Tabela 6).

Em relação aos ITRNN, alto nível de resistência aos ARVs foi detectado em aproximadamente 90,0% deles, representando 64 desses 71 indivíduos que estavam tomando EFV, e mutações K103N/S (71,8%) e P225H (21,1%) foram os mais prevalentes entre eles. Entre os indivíduos em uso de ITRNs, a presença de DRM cruzada conferiu alto nível de resistência ao abacavir em 47,5% deles. Alta resistência cruzada aos ITRNN (66,4%) foi verificada para a nevirapina, seguido de 39,4% para rilpivirina, 19,7% para doravirina, e apenas 7,7% para a etravirina.

Tabela 6 - Prevalência de ARV usados em qualquer momento durante o tratamento, prevalência dos DRMs mais prevalentes para cada classe de ARV em relação ao ARV em uso corrente e percentual de indivíduos com alta resistência aos ARV em relação ao ARV utilizado.

ARV	ARV usado n (%)	ARV em uso corrente n (%)	Mutação de resistência à droga n (%)			ARV alto nível de resistência n (%)
			M184I/V	K70E/R	T215F/Y	
Total						
ITRNN	82/82 (100)	82/82 (100)	68/82 (82.9)	16/82 (19.5)	17/82 (20.7)	70/82 (85.3)
3TC	82/82 (100)	76/82 (92.6)				68/82 (82.9)
TDF	70/82 (85.3)	69/82 (84.1)				6/70 (8.5)
AZT	41/82 (50.0)	5/82 (6.0)				9/41 (21.9)
			K103N/S	V106A/I/M	P225H	
Total						
ITRNN	71/82 (86.5)	48/82 (58.5)	51/71 (71.8)	11/71 (15.4)	15/71 (21.1)	64/71 (90.1)
EFV	71/82 (86.5)	52/82 (63.4)				64/71 (90.1)
			V82A/L/M	I54L/M/V	M46L/I	
Total PI	46/82 (50.0)	26/82 (31.7)	5/46 (10.8)	5/46 (10.8)	4/46 (8.6)	6/46(13.0)
LPV	18 /82 (21.9)	1/82 (1.2)				2/18 (11.1)
ATZ/r	24/82 (29.2)	19/82 (23.1)				4/24 (16.6)
DRV	6/82 (7.3)	4/82 (4.8)				0 (0)

ARVs: 3TC-lamivudina, EFV-efavirenz, TDF-tenofovir, AZT-zidovudina e AZT/r-atazanavir/ritonavir, DRV-darunavir, LPV-lopinavir. IP- Inibidores da protease. Resistência aos ARVs atribuída de acordo com o alto nível de resistência no banco de dados Stanford HIV Drug Resistance (<https://hivdb.stanford.edu/>).

Em relação às mutações de resistência, as combinações inter-classes de ARV mais prevalentes foram M184/K103 e M184/K103/P225 (12,1%) cada, e M184/K70/K103 (8,5%) conforme descrito na tabela 7. Mutações de resistência a múltiplas drogas foram verificadas nas 82 sequências do estudo e 72% apresentavam multirresistência para ITRNN/ITRN, 5% ITRN/IP e 3% ITRNN/ITRN/IP.

Tabela 7 - Prevalência de mutações de resistência às múltiplas drogas

Mutações de resistência às drogas	n (%)
M184/K103	10 (12,1)
M184/K103/P225	10 (12,1)
M184	9 (10,9)
M184/K70/K103	7 (8,5)
M184/V106	6 (7,3)
M184/T215/K103	6 (7,3)
K103	5 (6,0)
M184/T215	5 (6,0)
M184/K103/V106	5 (6,0)
M184/K70	4 (4,8)
M184/K70/T215/K103/V106	2 (2,4)
M184/K70/T215/K103/P225	2 (2,4)
V106	1 (1,2)
M184/P225	1 (1,2)
T215/K103	1 (1,2)
K103/P225	1 (1,2)
K103/V106	1 (1,2)
M184/K70/K103/V106	1 (1,2)
M184/K70/K103/P225	1 (1,2)
M184/K70/T215/K103	1 (1,2)

Ao comparar o perfil de resistência de indivíduos com variantes B_{CAR} e B_{PAN}, foi verificado que as mutações mais frequentes nas variantes do subtipo B foram M184I/V (ITRN) e K103N/S (ITRNN), e que estas apresentaram prevalência semelhante em ambos os grupos (Fig. 30a). Foi observado que algumas mutações de resistência à IP foram mais frequentes em B_{CAR} das quais se destacam V82A e L90M (15,3%) cada e I54V (7,6%). Apesar das baixas frequências de TAMs no grupo geral abaixo de 20% (Fig. 30), quando os comparamos entre B_{CAR} e B_{PAN}, foi possível observar que o padrão mutacional TAM-2 estava mais presente ($P=0,0294$) na variante B_{CAR} (Fig. 30 b) representados principalmente pelas mutações D67N (38,4%), K70R (23%), T215F (15,3%) e K219QE (23%), e TAM-1 nas variantes de B_{PAN} ($P = 0,1000$).

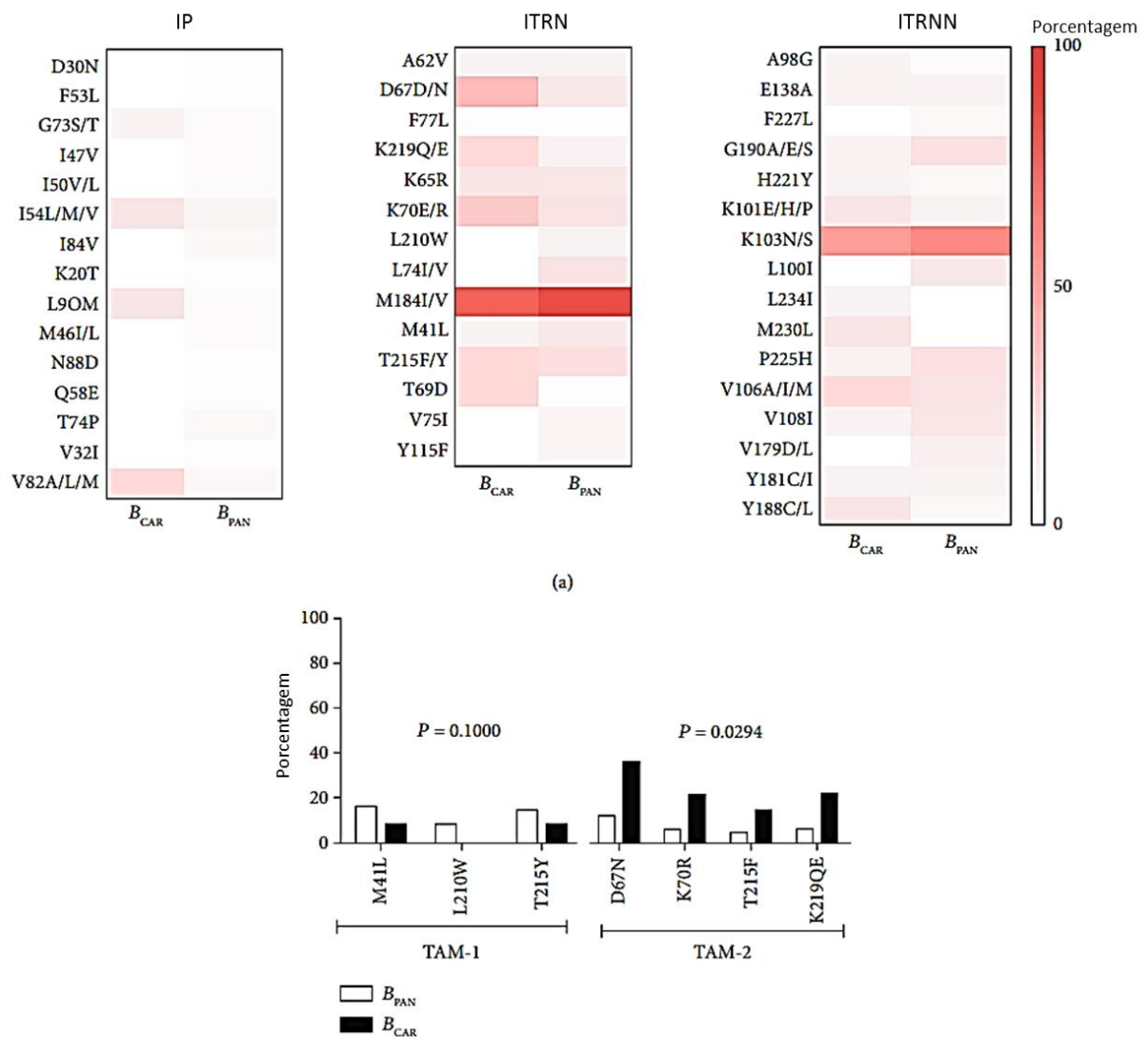


Figura 30: **Comparação de DRM entre variantes de subtipo B: B_{CAR} (n = 13) e B_{PAN} (n = 61).** a) Mapa de calor das diferentes classes de antirretrovirais: inibidores da protease (IP), inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos (ITRN) e inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN) e a frequência de mutações resistentes aos medicamentos. b) Perfil das vias de mutação associadas à timidina - TAMs (TAM-1 B_{CAR} (n = 1) e B_{PAN} (n = 10) e TAM-2 B_{CAR} (n = 5) e B_{PAN} (n = 9) entre as variantes do subtipo B). Análise estatística usando o teste de *Mann-Whitney*: TAM-1 ($P = 0,1000$) TAM-2 ($P = 0,0294$).

Todas as amostras classificadas como B_{CAR} (n=13), apresentaram mutações de resistência principalmente para ITRNN e ITRN 92,3% (n=12) cada, enquanto apenas três amostras (23%) apresentavam mutações contra IP. Através da análise do alto perfil de resistência aos ARVs e o esquema terapêutico em uso, foi possível

observar a falha terapêutica no esquema de uso em 92,3% (n=12). Verificou-se que 50% (n=6) das sequências que representam de falha a 3TC e EFV conjuntamente, 15,3 (n=2) para 3TC e ATZ, 15,3 (n=2) apenas para 3TC, 7,6% (n=1) apenas para EFV. Entretanto, apenas uma sequência (17BRAM016) apesar de apresentar mutações de resistência esta não estava relacionada ao esquema de uso.

Tabela 8 - Perfil de resistência aos ARVs das 13 sequências de HIV-1 variante B_{CAR} de acordo com o algoritmo de interpretação de resistência genotípica do programa Stanford HIVdb.

Amostra	IP DRMs (n=3)		ITRNN DRMs (n=12)	Perfil de resistência aos ARV			Esquema em uso
	ITRN DRMs (n=12)			Baixo	Intermediário	Alto	
17BRAM016		T215D	K238T	AZT	EFV, NVP		3TC, TDF, ATZ/r
17BRAM059		M184V	Y188L	ABC, ETR		3TC, FTC, EFV, NVP, RPV	3TC, TDF, ATZ/r
18BRAM015		D67N, K70E, M184I, T215TI	G190Q	AZT	ABC, TDF, RPV, ETR	3TC, FTC, EFV, NVP	3TC, TDF, EFV
18BRAM036	V82A, L90M, G481	D67N, T69D, K70R, M184V, K219Q	E138A	EFV, RPV, ETR	AZT, ATZ, LPV	ABC, TDF, 3TC	3TC, TDF, ATZ/r
18BRAM048		K65R, M184V	K103N, V106I, Y188C, M230L, L234I		TDF, ETR	ABC, 3TC, FTC, EFV, NVP, RPV	3TC, TDF, EFV
18BRAM053		K70Q, L741, M184V	K103N, V106I, V108I, Y181C, H221Y	TDF	ETR	ABC, 3TC, FTC, EFV, NVP, RPV	3TC, TDF, EFV
18BRAM055		D67N, T69D			AZT		3TC, TDF, EFV
18BRAM056		A62V, K65R, M184V	K103N, V106I, M230L		TDF, ETR	ABC, 3TC, FTC, EFV, NVP, RPV, ETR	3TC, TDF, EFV
18BRAM062		K70E, M184V	K101P, K103N	TDF	ABC	3TC, FTC, EFV, NVP, RPV	3TC, TDF, EFV
18BRAM071	I50L, V82A	D67N, K70R, M184V, T215F, K219E	K103N, P225H, K238T	LPV	TDF	ABC, 3TC, AZT, FTC, EFV, NVP, ATZ	3TC, TDF, ATZ/r
18BRAM075		D67N, T69D, K70R, M184, T215F, K219Q	K101H, K103N, G190A	TDF, RPV, ETR		ABC, 3TC, AZT, FTC, EFV, NVP	3TC, TDF, EFV
18BRAM084			K103NS			EFV, NVP	3TC, TDF, EFV
18BRAM108	M461, 154V, V82A, L90M, L33F, K43T, G73T	M41L, M184V, T215Y	A98G	TDF, EFV, RPV, ETR	ABC, AZT, NVP	3TC, FTC, ATZ, LPV	3TC, TDF, ATZ/r

* Perfil de resistência aos ARVs: baixo, intermediário e alto, de acordo com o Algoritmo de Interpretação de Resistência Genotípica do Programa (Stanford HIVdb) e o Esquema Atual. ABC = abacavir; AZT = zidovudina; EFV = efavirenz; ETR = etravirina; FTC = emtricitabina; NVP = nevirapina; RPV = rilpivirina; TDF = tenofovir; 3TC = lamivudina.

6. DISCUSSÃO

Embora a região Norte tenha apresentado um dos piores cenários epidemiológicos do HIV-1 em relação as outras regiões brasileiras nos últimos anos, ainda há escassa vigilância epidemiológica e de mutações de resistência às drogas. No presente estudo sobre indivíduos com HIV-1 falhando a TARV, foram analisados os dados epidemiológicos, diversidade genética do HIV-1 e frequência de DRMs e seus ARVs usados. Observamos tanto alta prevalência de indivíduos com falha virológica sem DRMs, quanto elevada frequência de DRMs, o que pode levar ao aumento de TDRM (DRMs transmitidos) e na transmissão do HIV-1 na região, como foi observado recentemente (ESASHIKA CRISPIM et al., 2019).

A razão geral masculino/feminino (M/F) detectada em nosso estudo foi de 2,5 bem próximo a taxa de 2,6 encontrado em nível nacional em 2019 (BRASIL, 2020a) e a taxa de 2,3 registrada em 2012 no estado do Amazonas (OLIVEIRA et al., 2015). Nossos resultados mostram uma maior prevalência de indivíduos que se auto declararam heterossexuais. Esta categoria representa 71% dos homens do estudo, em contraste com os 31,4% observados nacionalmente de 2007 a junho de 2019 em homens acima de 13 anos (BRASIL, 2019c) .

A maioria dos pacientes em nosso estudo tinha contagens de linfócitos T-CD4+ abaixo de 200 células/mm³, mesmo sob um período mais longo de TARV. Isso pode

ser resultado de um longo período de falha virológica até a genotipagem do HIV-1 e troca do ARV, e também devido ao atraso no acesso ao diagnóstico da infecção e chegada dos indivíduos ao atendimento, levando, conseqüentemente, ao diagnóstico tardio da infecção pelo HIV. Isso pode ser demonstrado pela baixa contagem de linfócitos T-CD4+ ao analisar o estado imunológico de pacientes que se apresentam pela primeira vez, onde metade dos pacientes apresentava contagens de células T-CD4+ abaixo de 350/mm³ e um terço abaixo de 200/mm³ no diagnóstico inicial de HIV (DIAZ et al., 2015). Esses resultados também indicam um avanço significativo na progressão da infecção para aids nesses indivíduos.

Ao descrever o panorama epidemiológico do HIV-1 na região Norte, os principais estudos publicados levam em consideração alguns fatores que podem contribuir para o entendimento da epidemiologia molecular do HIV-1 na região, tais como o fluxo migratório entre estados e países que fazem divisa com esta região, a distribuição geográfica dos estados e municípios que a compõem, além das dificuldades de acesso à esta região. Assim, por esta se situar muito distante dos grandes centros urbanos, sugere-se que ocorre de forma mais lenta a entrada de novos subtipos e formas recombinantes, que podem ser bastante comuns nas outras regiões do Brasil (DA COSTA et al., 2016).

O estudo de Machado e colaboradores menciona que o estado do Pará pode ser considerado como uma das principais entradas do HIV-1 no Norte do Brasil

(MACHADO et al., 2009). Contudo, estudos posteriores destacam que o estado de Roraima, apresenta uma epidemiologia molecular do HIV-1 bastante distinta, até mesmo entre os estados que compõem a região Norte, e que isso pode estar relacionado a intensa migração decorrente de crises econômicas enfrentadas pelos países que fazem fronteira com o estado (CORADO et al., 2017).

Nossos resultados mostram uma alta prevalência do HIV-1 subtipo B, e uma presença muito baixa dos subtipos F1 e C, conforme relatado anteriormente em outros estudos no estado do Amazonas (CRISPIM et al., 2019; CUNHA et al., 2012; DA COSTA et al., 2016a; DE ANDRADE et al., 2017). Verificou-se um aumento do número de formas recombinantes do HIV BF1 (13%) quando comparado a outros estudos baseados apenas na região *pol* – PR/RT (4,3% -10%), principalmente devido à inclusão da região *env* na análise. Apesar da baixa conectividade espacial e da densidade populacional encontrada na região Norte do Brasil, as introduções virais de formas recombinantes BF1 eram comparáveis às encontradas nas outras regiões brasileiras (Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste) (ARRUDA et al., 2018). Embora tenhamos aumento de recombinantes BC e BF, como no estudo de da Costa e cols. 2016, no presente estudo detectamos apenas URF, enquanto no citado estudo estas eram maioria, mas também foram verificados recombinantes semelhantes a CRF28 e 29_BF e a CRF31_BC encontradas em outras regiões do Brasil.

Verificou-se um aumento do número de formas recombinantes do HIV-1 BF1 (13%) quando comparado a outros estudos baseados apenas na região *pol* – *PR/RT* (4,3% -10%), principalmente devido à inclusão da região *env* na análise. Variantes caribenhas do subtipo B *pol* foram detectadas em alta taxa (15,7%), sendo esta similar à taxa de 22% em estudos prévios (DIVINO et al., 2016), taxa bem superior quando comparada a outras regiões brasileiras. O elevado percentual dessa variante nessas regiões pode ter relação com o grande fluxo migratório de oriundo do Caribe (CABELLO; JUNQUEIRA; BELLO, 2015; DIVINO et al., 2016). A variante B Brasileira (GWGR) está presente em todo o país, em nosso estudo foi observada uma baixa prevalência (5,1%) da variante B_{BR} do HIV-1 subtipo B (*env*) (MORGADO et al., 1998b), em contraste com 20-60% encontrados em amostras B em estudos de outras regiões do país (COVAS et al., 1998; JUNQUEIRA et al., 2013; MORGADO et al., 1998a, 1994; PIMENTEL et al., 2013; POTTS et al., 1993b)

Em relação ao tropismo viral baseado nas sequências da região *env* encontramos que cerca de 33% dos vírus apresentam tropismo X4; ao considerar apenas *env* do subtipo B do HIV-1 (n = 66), o vírus X4 foi verificado em 38% dos indivíduos, o que é muito semelhante a relatos anteriores de 40% de troca do vírus do subtipo B durante a progressão da doença (MILD et al., 2010; TSCHERNING et al., 1998). Por outro lado, 66,7% das amostras analisadas em nosso estudo ainda

apresentavam tropismo viral R5 e poderiam ser elegíveis para terapias de resgate envolvendo o uso de maraviroque (BON et al., 2013).

Os indivíduos estudados apresentam elevada prevalência de DRMs associados a ITRN (91%) e a ITRNN (84%). Outros estudos brasileiros documentaram um aumento em DRMs para ITRNN ao longo do tempo, bem como a diminuição na taxa de DRMs para ITRN (DIAZ et al., 2015; DUANI; ALEIXO; TUPINAMBÁS, 2017). O aumento da resistência aos ITRNN está relacionado principalmente à presença da mutação K103N, que foi detectada em 71,8% dos indivíduos que fazem uso de ITRNN, conforme descrito anteriormente (LOPES et al., 2015). A prevalência de K103N/S sendo esta superior à média de 40% detectada para as cinco maiores cidades brasileiras (São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo - região Sudeste e Bahia e Ceará - região Nordeste), e também em Belém, outra cidade da região Norte (DIAZ et al., 2015; LOPES et al., 2015).

Elevada frequência de M184V (75%) também foi detectada neste estudo, assim como no estudo realizado em Belém (LOPES et al., 2015); isso variou de 54,4% em São Paulo a 81,2% na Bahia (DIAZ et al., 2015). Apesar do baixo impacto do M184V sozinho na resistência dos ITRN, quando somado com outras DRMs para ITRN, pode levar a um aumento no nível de resistência e conseqüentemente a falha de alguns ARVs dessa classe, conforme mostrado neste estudo e em outros (BACHELER et al., 2001; HARRIGAN et al., 2000; MELIKIAN et al., 2014).

Nossos resultados demonstraram uma alta prevalência de mutações de resistência para ITRN e ITRNN, estas vem ganhando destaque principalmente no cenário de TDRM ao longo dos anos. Um estudo relacionado a mutações primárias publicado em 2003, demonstrou que o Brasil, apresentou 6,6% mutações primárias de resistência a drogas, sendo 2,24% de mutações relacionadas à resistência ao inibidor da protease (IP), 2,36% à inibidores da transcriptase reversa de nucleosídeos (ITRN) e 2,06% à inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeos (ITRNN) (BRINDEIRO et al., 2003), já em 2009, apresentou um aumento mutações primárias de resistência a drogas (8,1%), principalmente para mutações relacionadas à resistência ao ITRNN (4,2%) seguido de ITNR (2,3%) e IP (1,9 %) (INOCENCIO et al., 2009).

Um estudo conduzido pelo Ministério da Saúde em grandes centros de testagem por todo o Brasil demonstrou a prevalência de resistência transmitida variando de 4,5% no Nordeste e Centro-oeste a 7,0% no Sul do Brasil, onde a resistência aos ITRNN foi significativamente maior em todas as regiões brasileiras, contudo, a região Norte apresentou uma característica distinta por apresentar mutações de resistência para três classes de antirretrovirais (0,4%)(ARRUDA et al., 2018). Outros autores demonstraram que a região Norte apresentou uma elevada porcentagem de TDR (11%), todos oriundos do estado do Amazonas, com o predomínio de mutações para ITRNN de 10,1%, seguidas por mutações para ITRN (5,3%) e mutações IP (0,4%) (ESASHIKA CRISPIM et al., 2019).

Um estudo brasileiro, em 2008, já demonstrava que apenas 27,5% dos pacientes mantiveram a manutenção das cargas virais indetectáveis durante um ano, e o impacto na falha virologia resultou em 95% dos pacientes possuírem mutações relacionadas à resistência antirretroviral (CASEIRO et al., 2008), por outro lado, um estudo realizado em grandes cidades brasileiras concluiu que o perfil mutacional de resistência dos pacientes brasileiros que falham na terapia antirretroviral é bastante variável, dependendo da cidade onde os pacientes foram testados (BRITES et al., 2016). Atualmente, estudos reforçam a necessidade da detecção precoce e prevenção da falha virológica, para reduzir a mortalidade associada a este evento (HAGUIHARA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2018), com isso revelando a necessidade de criação e estratégias de monitoramento contínuo (BENNETT et al., 2008).

Verificou-se aqui maior prevalência de TAM-1, bem como menor prevalência de TAM-2, semelhantes às relatadas por Lopes et al. na região Norte (LOPES et al., 2015). É importante ressaltar que algumas mutações de resistência adquiridas observadas em nosso estudo, e em outros estudos transversais conduzidos com indivíduos que não haviam iniciado TARV podem resultar do vírus transmitido, uma vez que, até pouco tempo, a genotipagem antes do início do tratamento do HIV-1 era necessária apenas em alguns casos, como para mulheres grávidas no Brasil, por exemplo.

Observamos alta resistência ao 3TC e EFV e também demonstramos que os ITRNs (TDF e AZT) ainda apresentam alta viabilidade de uso para a maioria dos indivíduos. Devido à presença de mutações, como L100I, K101P, Y181C, M230L, observadas em indivíduos que falham no uso do EFV, a viabilidade do uso de ETR em esquema de resgate é reduzida para poucos indivíduos (dados não mostrados)

Os altos níveis de resistência encontrados para esses ARVs (3TC> EFV> TDF) refletem seu alto uso e a barreira genética à resistência desses ARVs (TANG; SHAFER, 2012). Embora alguns estudos sugiram que a viabilidade do uso de ARVs de primeira linha possa estar relacionada à combinação de fármacos com baixa e / ou alta barreira genética, conseqüentemente a escolha de fármacos com baixa barreira pode favorecer a rápida seleção de DRMs causadores de terapêutica falha (KATUSIIME; OCAMA; KAMBUGU, 2014).

A alta prevalência de resistência cruzada a Nevirapina em pessoas vivendo com HIV/aids sob o uso do ITRNN EFV em nosso estudo dificíil o manejo clínico para o resgate terapêutico, isto porque a ausência da comercialização de Rilpivirina e Doravirina faria com que com que a única opção disponível de ARV dessa classe fosse a Etravirina. Entretanto a etravirina não é recomendada para uso em combinações com ITRNs. Assim, pacientes que apresentaram falha virológica em um regime contendo um ITRNN (Efavirenz ou Nevirapina) e um ITRN, pode-se associar a Etravirina à um IP com Ritonavir. Cabe ressaltar também que não é recomendo o

uso de Etravirina em combinação com INI pois este diminui a concentração do INI circulante (BRASIL 2010c; 2018; SONG et al., 2011).

Nossos resultados demonstraram um alto nível de resistência para a dupla classe de ARVs (ITRN/ITRNN) ao longo dos anos, o que está em concordância com vários estudos que observaram que a resistência a ITRNN e ITRN são as formas mais comuns de TDRM (GUPTA et al., 2012; RHEE et al., 2015; WENSING et al., 2019b).

Devido ao aumento da prevalência de resistência aos ITRN e regimes baseados em ITRNN, ARVs com foco em novos alvos no ciclo de replicação do HIV-1 foram desenvolvidos e implementados na terapia. Em um ensaio clínico comparando dolutegravir uma vez ao dia versus raltegravir duas vezes ao dia em indivíduos com experiência em antirretrovirais, o efeito virológico superior foi verificado no grupo do dolutegravir (CAHN et al., 2013). Dolutegravir tem uma alta barreira genética à resistência, que pode ser eficaz para o tratamento da infecção pelo HIV-1, tanto para esquemas de primeira linha quanto para esquemas de resgate. O estudo de Cahn et al subsidiou a OMS para recomendar o uso do dolutegravir como primeiro esquema terapêutico desde 2016, e foi implantado no Brasil em 2017. Após a genotipagem realizada no presente estudo vários dos indivíduos passaram a fazer uso deste ARV.

A multirresistência aos ARVs pode contribuir para que as DRMs potencializem a falha terapêutica e aumentem a transmissão do HIV-1 e a prevalência de TDRM na região. Assim, o monitoramento clínico e constante da carga viral do HIV-1 de PVHA

é essencial para reduzir o risco de acúmulo de DRM e, assim, detectar rapidamente a falha terapêutica, a fim de preservar a suscetibilidade a esquemas terapêuticos subsequentes (DE LUCA et al., 2017; SIGALOFF et al., 2012).

A baixa prevalência das principais mutações para IP observadas nos pacientes no nosso estudo pode estar relacionada ao fato de que 50% dos pacientes avaliados usaram IPs durante o tratamento e 31,7 % em uso no momento da falha virológica, e pelo fato dos IPs estarem associados com o ritonavir (RTV), apresentando alta barreira genética. Demonstrando que os inibidores de protease continuam sendo uma boa terapia de resgate.

Nenhuma diferença epidemiológica significativa foi observada entre os indivíduos infectados por variantes do subtipo B, conforme verificado anteriormente entre os subtipos virais específicos (KIWANUKA et al., 2008; VENNER et al., 2016). Nossos resultados mostraram que a via do TAM-2 foi mais prevalente nas variantes do B_{CAR}, enquanto o TAM-1 foi maior no B_{PAN}, como mostrado anteriormente na região Norte em doadores de sangue (ESASHIKA CRISPIM et al., 2019). É importante ressaltar que a via da TAM verificada pode ser decorrente do uso específico de análogos da timidina utilizados no tratamento desses indivíduos. No entanto, vias específicas de TAMs foram verificadas em alguns subtipos virais (MARCELIN et al., 2004; NOVITSKY et al., 2007), e essas vias estão potencialmente relacionadas à dificuldade em alcançar a supressão viral (HANNA et al., 2000). No entanto, mais

estudos são necessários para corroborar as características específicas das variantes do HIV-1 subtipo B (B_{CAR} e B_{PAN}) aqui detectadas.

No presente estudo apresenta algumas limitações, em relação a sua casuística podemos destacar que este não foi um estudo de amostragem probabilística, mas de conveniência e que a centralização do serviço de genotipagem apenas na Fundação de Medicina Tropical pode ter dificultado o acesso de indivíduos de outros bairros distantes e de outros municípios. Em razão do estudo ser de cunho prospectivo, e não ser possível o acesso a todo o histórico clínico dos indivíduos, não nos permitiu caracterizar melhor as possíveis diferenças de progressão para doença entre indivíduos infectados com as variantes B_{CAR} ou B_{PAN}. Apesar do foco do estudo não ser a adesão ao tratamento seria importante estudos que pudessem descrever quais fatores estavam relacionados a má adesão ao tratamento nesses pacientes. Com relação aos pontos positivos em decorrência dessa tese podemos destacar a criação de um ambulatório destinado apenas ao acompanhamento de indivíduos em falha virológica facilitando o manejo desses pacientes. Os resultados de genotipagem gerados no presente estudo e retornados a esse ambulatório permitiram uma revisão dos esquemas terapêuticos utilizados resultando em níveis de carga viral indetectáveis em mais de 40% dos pacientes do estudo. Além de trazer um panorama mais atualizado de epidemiologia molecular desta região.

7. CONCLUSÃO

- Em Manaus o grupo de indivíduos em falha virológica em terapia antirretroviral era majoritariamente de homens heterossexuais sob uso do primeiro esquema terapêutico 2 ITRN e 1 ITRNN e sem recuperação de linfócitos T-CD4⁺.
- Manaus é caracterizada por uma alta prevalência do HIV-1 subtipo B, com maior proporção de variante pandêmica. No entanto demonstramos percentual elevado de variante B_{CAR}, bem como um aumento de recombinantes BF1.
- Apesar da alta resistência ao 3TC caracterizada principalmente pela mutação M184I/V, a baixa resistência cruzada a ARVs da mesma classe pode favorecer o controle de replicação viral após a troca de ARV.
- A prevalência de resistência aos ITRNN foi muito superior à média detectada para as cinco maiores cidades brasileiras (São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo - região Sudeste e Bahia e Ceará - região Nordeste),
- Foi demonstrado alta susceptibilidade aos inibidores de protease, assim como aos ARVs: Darunavir, Etravirina e Maraviroque.
- As variantes do subtipo B (B_{CAR} e B_{PAN}) apresentaram uma diferença significativa na via TAM-2.
- Portanto, a vigilância epidemiológica e genômica do HIV-1 é essencial para compreender os diferentes obstáculos para a adesão ao tratamento, e à detecção rápida da falha terapêutica. Estas informações ajudarão ao Departamento de doenças de condições crônicas e infecções sexualmente transmissíveis do Ministério da Saúde e SUS a redirecionar suas estratégias para alcançar um maior controle da epidemia de HIV / aids.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAM, M. E. et al. Nature, Position, and Frequency of Mutations Made in a Single Cycle of HIV-1 Replication. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 9864–9878, 1 out. 2010.
- ACHARYA, P. et al. HIV-1 gp120 as a therapeutic target: navigating a moving labyrinth. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 19, n. 6, p. 765–783, 3 jun. 2015.
- AI LIAN, Y. L. et al. AIDS-Defining Illnesses: A Comparison Between Before and After Commencement of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). **Current HIV Research**, v. 5, n. 5, p. 484–489, 1 set. 2007.
- ALKHATIB, G. The biology of CCR5 and CXCR4. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 4, n. 2, p. 96–103, mar. 2009.
- ALVES, B. M. et al. Estimating HIV-1 Genetic Diversity in Brazil Through Next-Generation Sequencing. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. APR, p. 1–11, abr. 2019.
- ANISIMOVA, M.; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 539–552, 2006.
- BACHELER, L. et al. Genotypic Correlates of Phenotypic Resistance to Efavirenz in Virus Isolates from Patients Failing Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor Therapy. **Journal of Virology**, v. 75, n. 11, p. 4999–5008, 2001.
- BAILES, E. Hybrid Origin of SIV in Chimpanzees. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1713–1713, 13 jun. 2003.
- BARBOUR, J. D. et al. Persistence of primary drug resistance among recently HIV-1 infected adults. **AIDS**, v. 18, n. 12, p. 1683–1689, ago. 2004.
- BARRE-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868–871, maio 1983.
- BARTLETT, J. A. et al. Overview of the effectiveness of triple combination therapy in antiretroviral-naïve HIV-1 infected adults. **AIDS**, v. 15, n. 11, p. 1369–1377, jul. 2001.
- BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 263–270, mar. 2007.
- BELLO, G.; GUIMARÃES, M. L.; MORGADO, M. G. Evolutionary history of HIV-1 subtype B

and F infections in Brazil. **Aids**, v. 20, n. 5, p. 763–768, 2006.

BENKO, D. M. et al. A novel human immunodeficiency virus type 1 protein, tev, shares sequences with tat, env, and rev proteins. **Journal of Virology**, 1990.

BIBERFELD, G. et al. WHO Working Group on Characterization of HIV-Related Retroviruses: criteria for characterization and proposal for a nomenclature system. **AIDS (London, England)**, 1987.

BIBOLLET-RUCHE, F. et al. Complete genome analysis of one of the earliest SIVcpzPtt strains from gabon (SIVcpzGAB2). **AIDS Research and Human Retroviruses**, 2004.

BON, I. et al. Prevalence of R5 strains in multi-treated HIV subjects and impact of new regimens including maraviroc in a selected group of patients with CCR5-tropic HIV-1 infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, 2013.

BONFANTI, P. et al. Incidence of adverse reactions in HIV patients treated with protease inhibitors: A cohort study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 2000.

BORROW, P. et al. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 6103–6110, 1994.

BRASIL. **Constituição da República Federativa do Brasil: promulgado em 5 de outubro de 1988** Constituição da República Federativa do Brasil, 1988.

BRASIL. **Lei nº 9313, de 13 de Novembro de 1996** Diário Oficial da União. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9313.htm>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Recomendações para Terapia Anti-Retroviral em Adultos Infectados pelo HIV**. 2008.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Antirretroviral Em Adultos** Ministério da Saúde. 2010a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Adesão Ao Tratamento Antirretroviral No Brasil** 2010b

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Cuidado integral às pessoas que vivem com HIV pela Atenção Básica Manual para a equipe multiprofissional**. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. 2018a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Manual Técnico para Avaliação de Exames de Genotipagem do HIV**. 2018b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Boletim Epidemiológico HIV / Aids | 2019**. 2019a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **RELATÓRIO DE MONITORAMENTO CLÍNICO DO HIV Ministério da Saúde**. 2019b.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Boletim Epidemiológico HIV/Aids - 2020**. 2020a.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, A. E H. V. **Relatório de Monitoramento Clínico do HIV 2020**. 2020b

BRENNER, B. G.; COUTSINOS, D. The K65R mutation in HIV-1 reverse transcriptase: Genetic barriers, resistance profile and clinical implications. **HIV Therapy**, v. 3, n. 6, p. 583–594, 2009.

BURDICK, R. C. et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 10, p. 5486–5493, mar. 2020.

CABELLO, M.; JUNQUEIRA, D. M.; BELLO, G. Dissemination of nonpandemic Caribbean HIV-1 subtype B clades in Latin America. **Aids**, v. 29, n. 4, p. 483–492, 2015.

CABELLO, M.; MENDOZA, Y.; BELLO, G. Spatiotemporal dynamics of dissemination of non-pandemic HIV-1 subtype B clades in the caribbean region. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

CAHN, P. et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naive adults with HIV: Week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. **The Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 700–708, 2013.

CALVETTI, P. Ü. et al. Psychosocial factors associated with adherence to treatment and quality of life in people living with HIV/AIDS in Brazil. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 63, n. 1, p. 8–15, 2014.

CARVALHO, B. C. et al. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization

of HIV type 1 subtype C in the inland north state of Tocantins, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 27, n. 10, p. 1081–1087, 2011.

CDC. Current trends update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) – United States. **Mmwr**, 1982.

CHAN, D. C.; KIM, P. S. **HIV entry and its inhibition**Cell, 1998.

CHENG, B. Benefits of combination therapy confirmed. **PI perspective**, n. no 17, p. 3–4, dez. 1995.

CHENG, Y. C. et al. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 5, p. 2187–2189, fev. 1987.

CHIN-HONG, P. V. et al. High-Risk Sexual Behavior in Adults With Genotypically Proven Antiretroviral-Resistant HIV Infection. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 40, n. 4, p. 463–471, 1 dez. 2005.

CLUTTER, D. S. et al. HIV-1 drug resistance and resistance testing. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 46, n. 1, p. 292–307, dez. 2016.

COFFIN, J. et al. Human immunodeficiency viruses. **Science**, v. 232, n. 4751, p. 697–697, maio 1986.

COFFIN, J. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. **Science**, v. 267, n. 5197, p. 483–489, 27 jan. 1995.

COVAS, D. T. et al. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, 1998.

CRISPIM, M. A. E. et al. Homogenous HIV-1 subtype B from the Brazilian Amazon with infrequent diverse BF1 recombinants, subtypes F1 and C among blood donors. **PLOS ONE**, v. 14, n. 9, p. e0221151, set. 2019.

CUNHA, L. K. H. et al. Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the State of Amazonas, Brazil, and subtype C identification. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 104–112, 2012.

CURRAN, J. W.; JAFFE, H. W.; CENTERS FOR DISEASE CONTROL. AIDS: the early years and CDC's response. **MMWR. Surveillance summaries : Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries / CDC**, 2011.

DA COSTA, C. M. et al. High HIV-1 genetic diversity in patients from Northern Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 32, n. 9, p. 918–922, 2016a.

DA COSTA, C. M. et al. High HIV-1 genetic diversity in patients from Northern Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 32, n. 9, p. 918–922, 2016b.

DE ANDRADE, S. D. et al. Drug resistance in antiretroviral-naive children newly diagnosed with HIV-1 in Manaus, Amazonas. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1774–1783, 2017.

DE LEYS, R. et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. **Journal of virology**, v. 64, n. 3, p. 1207–16, mar. 1990.

DE LUCA, A. et al. Accumulation of HIV-1 drug resistance in patients on a standard thymidine analogue-based first line antiretroviral therapy after virological failure: Implications for the activity of next-line regimens from a longitudinal study in Mozambique. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017.

DEEKS, S. G. Transmitted Minority Drug-Resistant HIV Variants: A New Epidemic? **PLoS Medicine**, v. 5, n. 7, p. e164, jul. 2008.

DELATORRE, E. et al. High HIV-1 Diversity and Prevalence of Transmitted Drug Resistance among Antiretroviral-Naive HIV-Infected Pregnant Women from Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 1, p. 68–73, 2017.

DELAUGERRE, C. et al. Selection of a rare resistance profile in an HIV-1-infected patient exhibiting a failure to an antiretroviral regimen including tenofovir DF. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, n. 3, p. 241–244, mar. 2005.

DELWART, E. L. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: Analysis of HIV-1 env genes. **Science**, v. 262, n. 5137, p. 1257–1261, 1993.

DÉSIRÉ, N. et al. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D sub-subtypes reclassification. **Retrovirology**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2018.

DIAZ, R. S. et al. The virological and immunological characteristics of the HIV-1-infected population in Brazil: From initial diagnosis to impact of antiretroviral use. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2015.

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

DORR, P. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2005.

DOS ANJOS SILVA, L. et al. HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance in antiretroviral treatment-naive individuals from Amapá State, Northern Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 32, n. 4, p. 373–376, 2016.

DOUEK, D. HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. **Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA**, v. 15, n. 4, p. 114–117, 2007.

DRESSER, G. K.; SPENCE, J. D.; BAILEY, D. G. **Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition** *Clinical Pharmacokinetics*, 2000.

DUANI, H.; ALEIXO, A. W.; TUPINAMBÁS, U. Trends and predictors of HIV-1 acquired drug resistance in Minas Gerais, Brazil: 2002–2012. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 148–154, 2017.

ENGLUND, J. A. et al. Zidovudine, didanosine, or both as the initial treatment for symptomatic HIV-infected children. AIDS Clinical Trials Group (ACTG) Study 152 Team. **The New England journal of medicine**, v. 336, n. 24, p. 1704–1712, jun. 1997.

ESASHIKA CRISPIM, M. A. et al. Detection of human immunodeficiency virus Type 1 phylogenetic clusters with multidrug resistance mutations among 2011 to 2017 blood donors from the highly endemic Northern Brazilian Amazon. **Transfusion**, v. 59, n. 8, p. 2593–2601, 2019.

ESPESETH, A. S. et al. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 21, p. 11244–11249, 10 out. 2000.

FARIA, N. R. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, 2014.

FILHO, D. J. D. S. et al. Identification of Two HIV Type 1 Circulating Recombinant Forms in Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 1, p. 1–13, jan. 2006.

FRANKEL, A. D.; YOUNG, J. A. T. **HIV-1: Fifteen proteins and an RNA** *Annual Review of Biochemistry*, 1998.

FURMAN, P. A. et al. Phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human immunodeficiency virus reverse transcriptase. **Proceedings**

of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 83, n. 21, p. 8333–8337, 1986.

GALLO, R. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 865–867, maio 1983.

GALLO, R. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science**, v. 224, n. 4648, p. 500–503, maio 1984.

GALLO, R. C.; MONTAGNIER, L. AIDS in 1988. **Scientific American**, v. 259, n. 4, p. 40–48, out. 1988.

GALVÃO, J. 1980-2001:uma cronologia da epidemia de HIV/Aids no Brasil e no mundo. **Associação Brasileira Interdisciplinas de AIDS**, v. 2, p. 1–30, 2002.

GIFFORD, A. L. et al. Predictors of Self-Reported Adherence and Plasma HIV Concentrations in Patients on Multidrug Antiretroviral Regimens. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 23, n. 5, p. 386–395, abr. 2000.

GILBERT, M. T. P. et al. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 47, p. 18566–18570, nov. 2007.

GUIMARÃES, M. L. et al. **Identification of two new CRF_BF in Rio de Janeiro State, Brazil [1]AIDS**, 2008.

GUINDON, S. et al. PHYML Online - A web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. SUPPL. 2, p. 557–559, 2005.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v. 59, n. 3, p. 307–321, 2010.

GULICK, R. M. et al. Intensification of a triple-nucleoside regimen with tenofovir or efavirenz in HIV-1-infected patients with virological suppression. **AIDS**, v. 21, n. 7, p. 813–823, 23 abr. 2007.

GUPTA, R. K. et al. Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: A global collaborative study and meta-regression analysis. **The Lancet**, v. 380, n. 9849, p. 1250–1258, 2012.

HAHN, B. H. et al. **AIDS as a zoonosis: Scientific and public health implications** **Science**, 2000.

HAMMER, S. M. et al. A trial comparing nucleoside monotherapy with combination therapy in HIV-infected adults with CD4 cell counts from 200 to 500 per cubic millimeter. AIDS Clinical Trials Group Study 175 Study Team. **The New England journal of medicine**, v. 335, n. 15, p. 1081–1090, out. 1996.

HANNA, G. J. et al. Patterns of Resistance Mutations Selected by Treatment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection with Zidovudine, Didanosine, and Nevirapine. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 3, p. 904–911, 2000.

HARRIGAN, P. R. et al. Resistance Profile of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Inhibitor Abacavir (1592U89) after Monotherapy and Combination Therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 3, p. 912–920, 2000.

HAYASHIDA, T. et al. Emergence of CXCR4-Tropic HIV-1 variants followed by rapid disease progression in hemophiliac slow progressors. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–13, 2017.

HEMELAAR, J. et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. **Aids**, v. 20, n. 16, p. 13–23, 2006.

HEMELAAR, J. et al. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 19, n. 2, p. 143–155, fev. 2019.

HEMELAAR, J. et al. Global and regional epidemiology of HIV-1 recombinants in 1990 – 2015 : a systematic review and global survey. v. 7, n. November, 2020a.

HEMELAAR, J. et al. Country Level Diversity of the HIV-1 Pandemic between 1990 and 2015. **Journal of Virology**, v. 95, n. 2, 2020b.

HOPE, T. J. Viral RNA export. **Chemistry & Biology**, v. 4, n. 5, p. 335–344, maio 1997.

INGALE, K. B.; BHATIA, M. S. HIV-1 Integrase Inhibitors: A Review of Their Chemical Development. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 22, n. 3, p. 95–105, dez. 2011.

JUNQUEIRA, D. M. et al. Detection of the Bⁿ-GWGR variant in the southernmost region of Brazil: Unveiling the complexity of the human immunodeficiency virus-1 subtype B epidemic. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 6, p. 735–740, 2013.

JUNQUEIRA, D. M.; ALMEIDA, S. E. DE M. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. **Virology**, v. 495, p. 173–184, ago. 2016.

KASSUTTO, S.; ROSENBERG, E. S. Primary HIV type 1 infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 10, p. 1447–1453, 2004.

KATUSIIME, C.; OCAMA, P.; KAMBUGU, A. Basis of selection of first and second line highly active antiretroviral therapy for hiv/aids on genetic barrier to resistance: a literature review. **African Health Sciences**, v. 14, n. 3, p. 679, set. 2014.

KILBY, J. M. et al. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. **Nature Medicine**, 1998.

KIWANUKA, N. et al. Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Subtype on Disease Progression in Persons from Rakai, Uganda, with Incident HIV-1 Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 5, p. 707–713, 2008.

KOUP, R. A. et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. **Journal of Virology**, v. 68, n. 7, p. 4650–4655, 1994.

LALEZARI, J. P. et al. Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor, for Drug-Resistant HIV Infection in North and South America. **New England Journal of Medicine**, 2003.

LANGFORD, S. E.; ANANWORANICH, J.; COOPER, D. A. Predictors of disease progression in HIV infection: a review. **AIDS research and therapy**, v. 4, p. 11, maio 2007.

LEMEY, P. et al. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003.

LENGAUER, T. et al. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 1407–1410, 2007.

LEVY, D. N. et al. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 12, p. 4204–4209, 23 mar. 2004.

LEVY, J. et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, n. 4664, p. 840–842, ago. 1984.

LI, G. et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 18, dez. 2015.

LOPES, C. A. F. et al. The Evolving Genotypic Profile of HIV-1 Mutations Related to Antiretroviral Treatment in the North Region of Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 6–11, 2015.

MANFREDI, R.; SABBATANI, S.; CALZA, L. Antiretroviral Therapy Voluntarily Taken at Half-Dosage, but Fully Effective After 6-10 Years: A Provocative Issue for Adherence Requirements: Case Report. **Current HIV Research**, v. 6, n. 2, p. 171–172, 1 mar. 2008.

MARCELIN, A. G. et al. Thymidine Analogue Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Profiles and Association to Other Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Resistance Mutations Observed in the Context of Virological Failure. **Journal of Medical Virology**, v. 72, n. 1, p. 162–165, 2004.

MEEK, T. D.; DREYER, G. B. HIV-1 Protease as a Potential Target for Anti-AIDS Therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 616, n. 1 AIDS, p. 41–53, dez. 1990.

MELIKIAN, G. L. et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: Implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 12–20, 2014.

MENDES DA SILVA, R. K. et al. Genetic Characterization of a New HIV-1 Sub-Subtype A in Cabo Verde, Denominated A8. **Viruses**, v. 13, n. 6, p. 1093, 8 jun. 2021.

MILD, M. et al. Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 3, p. 356–364, 2010.

MISSON, J.; CLARK, W.; KENDALL, M. J. Therapeutic advances: protease inhibitors for the treatment of HIV-1 infection. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 109–117, abr. 1997.

MOCROFT, A. et al. Decline in the AIDS and death rates in the EuroSIDA study: an observational study. **The Lancet**, v. 362, n. 9377, p. 22–29, jul. 2003.

MONTAGNIER, L. et al. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. **Science**, v. 225, n. 4657, p. 63–66, jul. 1984.

MORGADO, M. et al. Molecular Epidemiology of HIV in Brazil: Polymorphism of the Antigenically Distinct HIV-1 B Subtype Strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 383–386, maio 1998a.

MORGADO, M. G. et al. V3 Region Polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of Subtype B Strains Divergent from North American/European Prototype and Detection of Subtype F. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 10, n. 5, p. 569–576, maio 1994.

MORGADO, M. G. 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. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, 1998b.

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

143–150, mar. 2002.

MURPHY, D. A. et al. Predictors of antiretroviral adherence. **AIDS Care - Psychological and Socio-Medical Aspects of AIDS/HIV**, 2004.

NOVITSKY, V. et al. The reverse transcriptase 67N 70R 215Y genotype is the predominant TAM pathway associated with virologic failure among HIV type 1C-infected adults treated with ZDV/ddl-containing HAART in Southern Africa. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, n. 7, p. 868–878, 2007.

NUNN, A. S. et al. AIDS Treatment In Brazil: Impacts And Challenges. **Health Affairs**, v. 28, n. 4, p. 1103–1113, jul. 2009.

OLIVEIRA, R. D. S. M. DE et al. Hiv/aids epidemic in the state of amazonas: Characteristics and trends from 2001 to 2012. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. May 2014, p. 70–78, 2015.

PALMA, A. C. et al. HIV-1 protease mutation 82M contributes to phenotypic resistance to protease inhibitors in subtype G. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. 1075–1079, 2012.

PARANJAPE, R. S. Immunopathogenesis of HIV infection. **The Indian journal of medical research**, v. 121, n. 4, p. 240–255, abr. 2005.

PARK, J.; MORROW, C. D. Mutations in the protease gene of human immunodeficiency virus type 1 affect release and stability of virus particles. **Virology**, 1993.

PATERSON, D. L. et al. Erratum: Adherence to protease inhibitor therapy and outcomes in patients with HIV infection (Annals of Internal Medicine (2000) 133 (21-30)). **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 3, p. 253, 2002.

PERELSON, A. S. et al. HIV-1 Dynamics in Vivo: Virion Clearance Rate, Infected Cell Life-Span, and Viral Generation Time. **Science**, v. 271, n. 5255, p. 1582–1586, 15 mar. 1996.

PERELSON, A. S.; RIBEIRO, R. M. Modeling the within-host dynamics of HIV infection. **BMC Biology**, v. 11, n. 1, p. 96, 3 dez. 2013.

PESSÔA, R. et al. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p. 2–3, 26 jun. 2014a.

PESSÔA, R. et al. Deep Sequencing of HIV-1 near Full-Length Proviral Genomes Identifies High Rates of BF1 Recombinants Including Two Novel Circulating Recombinant Forms (CRF) 70_BF1 and a Disseminating 71_BF1 among Blood Donors in Pernambuco, Brazil. **PLoS**

ONE, v. 9, n. 11, p. e112674, 17 nov. 2014b.

PIMENTEL, V. F. et al. Temporal Trends and Molecular Epidemiology of HIV Type 1 Infection in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 12, p. 1553–1561, dez. 2013.

PLANTIER, J. C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature Medicine**, v. 15, n. 8, p. 871–872, 2009.

POTTS, K. E. et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. Brazilian Collaborative AIDS Research Group. **AIDS (London, England)**, 1993a.

POTTS, K. E. et al. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. **AIDS**, v. 7, n. 9, p. 1191–1198, set. 1993b.

RABOUD, J. et al. Impact of adherence on duration of virological suppression among patients receiving combination antiretroviral therapy. **HIV Medicine**, v. 3, n. 2, p. 118–124, abr. 2002.

REIS, M. N. D. G. et al. Characterization of HIV-1 CRF90_BF1 and putative novel CRFs_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0178578, jun. 2017.

REIS, M. N. G. et al. Identification of New HIV-1 Circulating Recombinant Forms CRF81_cpx and CRF99_BF1 in Central Western Brazil and of Unique BF1 Recombinant Forms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, p. 1–13, fev. 2019.

RHAME, F. S. When to Start Antiretroviral Therapy. **Current Infectious Disease Reports**, v. 13, n. 1, p. 60–67, 14 fev. 2011.

RHEE, S. Y. et al. Geographic and Temporal Trends in the Molecular Epidemiology and Genetic Mechanisms of Transmitted HIV-1 Drug Resistance: An Individual-Patient- and Sequence-Level Meta-Analysis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1–30, 2015.

RICHMAN, D. D. **HIV chemotherapy** *Nature*, 2001.

RIDDLER, S. A. et al. Class-sparing regimens for initial treatment of HIV-1 infection. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 20, p. 2095–106, 15 maio 2008.

ROBERTSON, D. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 55–56, 2000.

RODRIGUES, W. C. V.; SOLER, O. Licença compulsória do efavirenz no Brasil em 2007: contextualização. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 26, n. 6, dez. 2009.

RUTHERFORD, G. W. et al. Course of HIV-I infection in a cohort of homosexual and bisexual

men: an 11 year follow up study. **BMJ**, v. 301, n. 6762, p. 1183–1188, nov. 1990.

SALEMI, M. et al. Different Epidemic Potentials of the HIV-1B and C Subtypes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 5, p. 598–605, maio 2005.

SANABANI, S. S. et al. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. **Virology Journal**, v. 7, n. 1, p. 74, 16 dez. 2010.

SANTOS, A. F. et al. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. **AIDS**, 2006.

SEELAMGARI, A. et al. **Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 2004.

SHAFER, R. W. et al. A Guide to HIV-1 Reverse Transcriptase and Protease Sequencing for Drug Resistance Studies. **HIV sequence compendium**, 2001.

SHAFER, R. W.; RHEE, S. Y.; BENNETT, D. E. Consensus drug resistance mutations for epidemiological surveillance: Basic principles and potential controversies. **Antiviral Therapy**, v. 13, n. SUPPL. 2, p. 59–68, 2008.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1552, p. 2487–2494, 27 ago. 2010.

SIGALOFF, K. C. E. et al. Accumulation of HIV Drug Resistance Mutations in Patients Failing First-Line Antiretroviral Treatment in South Africa. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 28, n. 2, p. 171–175, fev. 2012.

SILVA, J. A. G. et al. Factors associated with non-adherence to antiretroviral therapy in adults with AIDS in the first six months of treatment in Salvador, Bahia State, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 31, n. 6, p. 1188–11898, 2015.

SIMBERKOFF, M. S. et al. Long-term follow-up of symptomatic HIV-infected patients originally randomized to early versus later zidovudine treatment; report of a Veterans Affairs Cooperative Study. VA Cooperative Study Group on AIDS Treatment. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association**, v. 11, n. 2, p. 142–150, 1996.

SIMON, F. et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature Medicine**, v. 4, n. 9, p. 1032–1037, set. 1998.

SIMON, V.; HO, D. D.; ABDOL KARIM, Q. HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis,

prevention, and treatment. **Lancet**, v. 368, n. 9534, p. 489–504, 2006.

SLOAN, R. D.; WAINBERG, M. A. **The role of unintegrated DNA in HIV infection***Retrovirology*, 2011.

SPENCE, R. A. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. **Science**, 1995.

STASZEWSKI, S. et al. Efavirenz plus zidovudine and lamivudine, efavirenz plus indinavir, and indinavir plus zidovudine and lamivudine in the treatment of HIV-1 infection in adults. Study 006 Team. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 25, p. 1865–1873, dez. 1999.

TANG, M. W.; SHAFER, R. W. HIV-1 Antiretroviral Resistance. **Drugs**, v. 72, n. 9, p. 1–25, jun. 2012.

TEBIT, D. M.; ARTS, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. **The Lancet Infectious Diseases**, 2011.

TSCHERNING, C. et al. Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. **Virology**, v. 241, n. 2, p. 181–188, 1998.

UIAIDS. 2019-global-AIDS-update. **Communities at the Centre**. 2019.

UNAIDS. **UNAIDS. UNAIDS data 2020**.2020.

UNAIDS. **PREVAILING AGAINST PANDEMICS BY PUTTING PEOPLE AT THE CENTRE**. 2021.

UNAIDS. **UNAIDS report shows that people living with HIV face a double jeopardy, HIV and COVID-19, while key populations and children continue to be left behind in access to HIV services**. 2021.

VAN HEUVERSWYN, F. et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. **Nature**, 2006.

VEAZEY, R. S. et al. Use of a Small Molecule CCR5 Inhibitor in Macaques to Treat Simian Immunodeficiency Virus Infection or Prevent Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection. **Journal of Experimental Medicine**, 2003.

VENKAT, A. et al. Care of the HIV-Positive Patient in the Emergency Department in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. **Annals of Emergency Medicine**, v. 52, n. 3, p. 274–285, set. 2008.

VENNER, C. M. et al. Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of

Sub-Saharan Africa. **EBioMedicine**, v. 13, p. 305–314, 2016.

WENSING, A. M. et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in antiviral medicine**, v. 27, n. 3, p. 111–121, 2019a.

WENSING, A. M. et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in antiviral medicine**, v. 27, n. 3, p. 111–121, 2019b.

WHO, W. H. O. **HIV Drug Resistance Report 2019**Who. [s.l: s.n.].

WILD, C.; GREENWELL, T.; MATTHEWS, T. **A Synthetic Peptide from HIV-1 gp41 Is a Potent Inhibitor of Virus-Mediated Cell—Cell Fusion****AIDS Research and Human Retroviruses**, 1993.

WILD, C. T. et al. Peptides corresponding to a predictive α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1994.

WILEN, C. B.; TILTON, J. C.; DOMS, R. W. HIV: Cell Binding and Entry. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 8, p. a006866–a006866, ago. 2012.

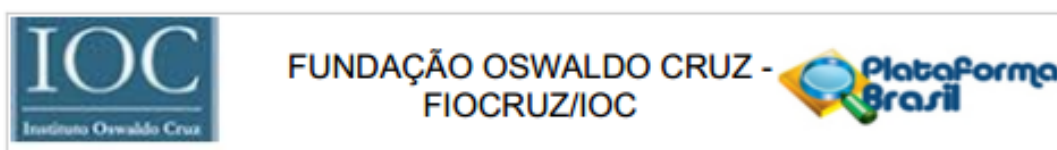
WOROBAY, M. et al. 1970s and ‘Patient 0’ HIV-1 genomes illuminate early HIV/AIDS history in North America. **Nature**, v. 539, n. 7627, p. 98–101, nov. 2016.

YAMAGUCHI, J. et al. Brief Report: Complete Genome Sequence of CG-0018a-01 Establishes HIV-1 Subtype L. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 83, n. 3, p. 319–322, 2020.

YOUNG, F. E. The role of the FDA in the effort against AIDS. **Public Health Reports**, 1988.

9. ANEXOS

Anexo 01 - Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diversidade genética do HIV-1 e mutações de resistência adquiridas em indivíduos da Amazônia.

Pesquisador: Monick Lindenmeyer Guimarães

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87171018.4.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM
Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

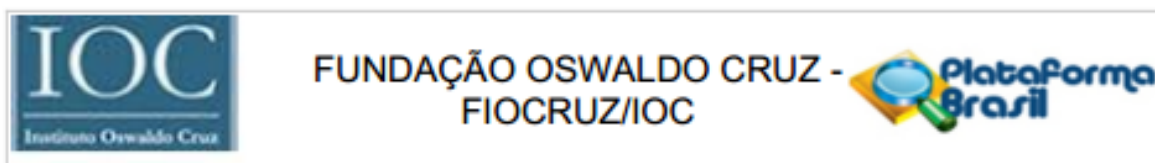
Número do Parecer: 2.590.802

Apresentação do Projeto:

Desde 1996, o Ministério da Saúde tem conduzido um programa de acesso universal ao tratamento, e mais recentemente aderiu ao programa da Organização Mundial de Saúde que estimula o oferecimento do tratamento a todos os indivíduos diagnosticados. No entanto, mutações em regiões alvo da terapia antirretroviral (ART) podem estar associadas ao decréscimo de susceptibilidade a estes fármacos, a ausência da supressão da replicação viral e as falhas à terapia.

Em um dos primeiros estudos conduzidos no Brasil, em indivíduos em falha terapêutica aos inibidores de protease e transcriptase reversa, verificou-se que 84,7% dos indivíduos apresentavam mutações de resistência. Recentemente, uma grande variação no perfil de mutações de resistência frente a estes inibidores foi verificada quando se comparou os dados de pacientes de cinco cidades brasileiras das regiões sudeste, sul e nordeste. Assim, novos medicamentos vêm sendo testados frente a outros alvos importantes no ciclo replicativo do HIV, como por exemplo, o Maraviroque (MVQ), que é um antagonista do correceptor CCR5, utilizado no Brasil desde 2013 na terapia de resgate de indivíduos em falha terapêutica, e visa bloquear a entrada do vírus na célula hospedeira.

A região Norte apresenta 6,3% dos casos de infecção pelo HIV notificados entre 2007-2016, e vem



Continuação do Parecer: 2.590.802

apresentando uma epidemia de HIV distinta da verificada na região sudeste. Enquanto a taxa de detecção de aids vem apresentando estabilização nos últimos 10 anos, com média de 20,7 casos/100 mil habitantes, uma tendência de crescimento tem sido verificada nas regiões norte (24,0) e nordeste (15,3), no ano de 2015. Este aumento também é refletido na taxa de detecção de HIV em gestantes e na taxa de mortalidade relacionada à aids comparando-se os anos de 2006 e 2015. No Brasil, a epidemia é composta majoritariamente pelo HIV-1 dos subtipos B, F1, C, recombinantes BF1 e BC. Além destes, observamos a presença de uma variante do subtipo B, denominada BBR, que apresenta o motivo GWGR no topo da alça V3 da gp120 do envelope viral ao invés do motivo GPGR característico do B pandêmico e da variante B caribenha. Diversos estudos têm evidenciado o grau de dispersão das variantes (B-pandêmico e B-caribenho) na América do Sul, mostrando por exemplo, que no Brasil este representa menos de 10% das infecções pelo subtipo B, no entanto foi verificado que em alguns estados da região norte e Nordeste estas têm uma maior representatividade.

Diante deste panorama, vale ressaltar que poucos estudos de epidemiologia molecular e de falha terapêutica têm sido conduzidos na região Norte. Assim buscamos com este estudo melhor compreender a epidemiologia molecular nesta região e verificar possíveis associações entre os subtipos/variantes e as mutações associadas à falha terapêutica e, este como possível fator com forte impacto no aumento dos números de casos HIV na região. Para tal, recrutaremos 100 indivíduos sob uso de terapia antirretroviral que apresentem falha virológica (carga viral >1000 cópias/mL) para investigação de falha terapêutica nas regiões da protease (PR), transcriptase reversa (RT). Através da avaliação de tropismo vamos investigar se os mesmos seriam elegíveis para terapia com maraviroque, e através das sequências geradas também poderão ser verificados o perfil epidemiológico molecular nesta região.

Metodologia Proposta:

Serão convidados a participar do estudo indivíduos com sorologia positiva para HIV atendidos pela Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com idades entre 18 e 65 anos, entre maio de 2018 a dezembro de 2019. Caso concorde em participar do estudo, o participante deverá assinar um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e autorizar serão coletados 4ml de sangue com ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) via punção venosa a vácuo. Após centrifugação de 10min a 15.000 rpm a temperatura ambiente. Serão separados 2 aliquotas de

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.590.802

plasma (2mL) e uma de "papa de células" e ambas serão armazenadas em ultrafreezer com temperatura - 80°C para posterior análise genômica. O estudo será corte transversal, os dados demográficos e clínicos serão coletados por meio de um questionário estruturado. Os pacientes em acompanhamento pela equipe médica (FMT-HVD) passarão por exame clínico de rotina. Indivíduos que estejam sob uso de terapia antirretroviral e apresentem falha virológica, (RNA superior a 1000 cópias/mL de plasma), e possível falha terapêutica (mutação de resistência aos antirretrovirais) serão submetidos às análises genômicas para verificação de mutações de resistência aos inibidores de protease e RT. Aos que apresentarem carga viral detectável menor do que 1000 cópias/mL ou indetectável serão excluídos do estudo. As amostras serão transportadas para o Instituto Leônidas e Maria Deane - ILM D FIOCRUZ-AM, onde serão processadas para separação do plasma e "papa de células" e armazenados a -70oC para posterior análise. As análises genômicas ocorrerão no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ-RJ (LABAIDS) ou na plataforma de sequenciamento do Instituto Leônidas e Maria Deane ILM D/FIOCRUZ-AM. Para processamento no LABAIDS as amostras serão transportadas em embalagem UN3373 , em gelo seco, pela transportadora contratada pela FIOCRUZ.

Critério de Inclusão:

Indivíduos com sorologia positiva para HIV atendidos pela Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com idades entre 18 e 65 anos, apresentem falha virológica, (RNA superior a 1000 cópias/mL de plasma) e possível falha terapêutica (mutação de resistência aos antirretrovirais)

Critério de Exclusão:

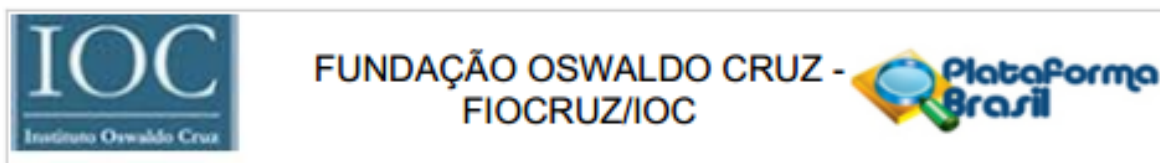
Indivíduos atendidos pela Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) que apresentarem: sorologia negativa para HIV ou sorologia positiva para HIV com carga viral detectável menor do que 1000 cópias/mL ou indetectável.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Devido a poucos estudos epidemiológicos sobre os subtipos circulantes e sua relação com mutações de resistência que conferem a falha terapêutica em pacientes HIV na cidade de Manaus e o aumento no crescente do número de casos e de Óbitos na Região norte, acredita-se que exista um possível impacto dos subtipos/variantes do subtipo B (B pandêmico, B caribenho e BBR) nas mutações de resistência em pacientes HIV na cidade de Manaus.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.590.802

Objetivo Primário:

Caracterizar a diversidade genética do HIV-1 e as mutações de resistência adquirida em indivíduos sob terapia antirretroviral em Manaus-AM.

Objetivo Secundário:

- 1) Estimar a prevalência dos subtipos de HIV-1 circulantes em Manaus.
- 2) Avaliar a prevalência das variantes do subtipo B (B pandêmico, B caribenho e BBR).
- 3) Investigar a prevalência de mutações de resistência adquirida na protease e na transcriptase reversa.
- 4) Avaliar genotipicamente o tropismo viral.
- 5) Avaliar possível impacto dos subtipos/variantes do subtipo B nas mutações de resistência.
- 6) Realizar sequenciamento de genoma completo de amostras B caribenha brasileira, CRF identificados, possíveis CRF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são basicamente o desconforto durante a coleta, onde algumas vezes, durante ou após colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa no local (hematoma), ou pode ocorrer punção acidental de uma artéria ou infecção. Os riscos que envolvem dor, formação de hematomas, punção em local errado poderão ser reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo-se corretamente todas as etapas. Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%, clorexidina ou solução de iodo.

As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações que visem tranquilizar o

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.590.802

paciente. As amostras serão coletadas, preferencialmente em locais isolados, caso não seja possível serão utilizados recursos como uso de vestimentas (bata) para não expor o paciente durante a coleta.

Benefícios:

Identificação de possíveis mutações de resistências às drogas terapêuticas em pacientes HIV soropositivos em Manaus. Estes resultados auxiliarão aos médicos responsáveis na indicação de propostas terapêuticas para cada participante do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está suficientemente claro em seus propósitos e devidamente fundamentado, e não necessita de submissão à CONEP antes de ser iniciado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram encaminhados ao CEP e aprovados.

Recomendações:

Apresentar relatórios parciais (anuais) e relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Qualquer modificação ou emenda ao projeto de pesquisa em pauta deve ser submetida à apreciação do CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), em sua 237ª Reunião Ordinária, realizada em 10.04.2018, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1104705.pdf	05/04/2018 21:11:42		Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.590.802

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	05/04/2018 21:10:07	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
Outros	FICHA_CLINICA.pdf	05/04/2018 18:36:44	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/04/2018 18:35:29	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	repositorioLABAIDSIOC.pdf	05/04/2018 18:34:58	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
Declaração de Pesquisadores	carta_pesquisador.pdf	05/04/2018 18:32:29	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_CEP.pdf	05/04/2018 18:23:50	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 10 de Abril de 2018

Assinado por:
José Henrique da Silva Pilotto
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 706 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfioacruz@ioc.fiocruz.br

Anexo 02 - Parecer Consubstanciado do CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Diversidade genética do HIV-1 e mutações de resistência adquiridas em indivíduos da Amazônia.

Pesquisador: Monick Lindenmeyer Guimarães

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 87171018.4.3001.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.611.418

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Projeto de pesquisa que tem Instituição proponente o Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro e tem como Pesquisadora responsável a Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães e, como Instituição Coparticipante a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado e tem como Pesquisadores responsáveis Dr. Flávio Ribeiro Pereira e Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda.

Serão convidados a participar do estudo indivíduos com sorologia positiva para HIV atendidos pela Fundação de Medicina Tropical – Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) com idades entre 18 e 65 anos, no período entre maio de 2018 a dezembro de 2019.

Os pesquisadores buscam com este estudo melhor compreender a epidemiologia molecular nesta região e verificar possíveis associações entre os subtipos/variantes e as mutações associadas à falha terapêutica e, este como possível fator com forte impacto no aumento dos números de casos HIV na região. Para tal, recrutarão 100 indivíduos sob uso de terapia antirretroviral que apresentem falha virológica (carga viral >1000 cópias/mL) para investigação de falha terapêutica nas regiões da protease (PR), transcriptase reversa (RT). Através da avaliação de tropismo, investigarão se os mesmos seriam elegíveis para terapia com maraviroque, e através das

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.611.418

sequências geradas também poderão ser verificados o perfil epidemiológico molecular nesta região.

Caso concorde, o participante deverá assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão coletados 4ml de sangue com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) via punção venosa a vácuo. Após centrifugação de 10min a 15.000 rpm a temperatura ambiente. Serão separados 2 alíquotas de plasma (2mL) e uma de "papa de células" e ambas serão armazenadas em ultrafreezer com temperatura - 80°C para posterior análise genômica. O estudo será corte transversal, os dados demográficos e clínicos serão coletados por meio de um questionário estruturado. Os pacientes em acompanhamento pela equipe médica (FMT-HVD) passarão por exame clínico de rotina. Indivíduos que estejam sob uso de terapia antirretroviral e apresentem falha virológica, (RNA superior a 1000 cópias/mL de plasma), e possível falha terapêutica (mutação de resistência aos antirretrovirais) serão submetidos às análises genômicas para verificação de mutações de resistência aos inibidores de protease e RT. Aos que apresentarem carga viral detectável menor do que 1000 cópias/mL ou indetectável serão excluídos do estudo. As amostras serão transportadas para o Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD FIOCRUZ-AM, onde serão processadas para separação do plasma e "papa de células" e armazenados a -70oC para posterior análise. As análises genômicas ocorrerão no Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ-RJ (LABAIDS) ou na plataforma de sequenciamento do Instituto Leônidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ-AM. Para processamento no LABAIDS as amostras serão transportadas em embalagem UN3373, em gelo seco, pela transportadora contratada pela FIOCRUZ.

O estudo tem apoio financeiro da Fundação de amparo à pesquisa do estado do Amazona FAPEAM, Instituto Leônidas e Maria Deane – Fiocruz-Manaus e Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular–IOC-FIOCRUZ-Rio de Janeiro.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a diversidade genética do HIV-1 e as mutações de resistência adquirida em indivíduos sob terapia antirretroviral em Manaus-AM.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.611.418

Objetivo Secundário:

- 1) Estimar a prevalência dos subtipos de HIV-1 circulantes em Manaus.
- 2) Avaliar a prevalência das variantes do subtipo B (B pandêmico, B caribenho e BBR).
- 3) Investigar a prevalência de mutações de resistência adquirida na protease e na transcriptase reversa.
- 4) Avaliar genotipicamente o tropismo viral.
- 5) Avaliar possível impacto dos subtipos/variantes do subtipo B nas mutações de resistência.
- 6) Realizar sequenciamento de genoma completo de amostras B caribenha brasileira, CRF identificados, possíveis CRF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: de acordo com o texto do projeto os riscos decorrentes são basicamente o desconforto durante a coleta, onde algumas vezes, durante ou após colher o sangue do braço, ele pode doer um pouco na região da picada da agulha e pode ficar com uma mancha roxa no local (hematoma), ou pode ocorrer punção acidental de uma artéria ou infecção. Os riscos que envolvem dor, formação hematomas, punção em local errado poderão ser reduzidos ou evitados pela execução correta dos procedimentos de coleta, que sempre será realizada por profissional capacitado, que fará todos os procedimentos com muita cautela e seguindo corretamente todas as etapas. Os riscos relacionados a aquisição de infecção no momento da coleta serão evitados pela correta assepsia do local, que será realizado utilizando-se etanol ou isopropanol a 70%, clorexidina ou solução de iodo.

As situações constrangedoras serão minimizadas através de orientações que visem tranquilizar o paciente.

As amostras serão coletadas, preferencialmente em locais isolados, caso não seja possível serão utilizados recursos como uso de vestimentas (bata) para não expor o paciente durante a coleta.

Benefícios:

Identificação de possíveis mutações de resistências às drogas terapêuticas em pacientes HIV soropositivos em Manaus. Estes resultados auxiliarão aos médicos responsáveis na indicação de propostas terapêuticas para cada participante do estudo.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

**FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"**



Continuação do Parecer: 2.611.418

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está claro em seus objetivos e devidamente fundamentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos de apresentação obrigatória foram anexados ao protocolo de pesquisa os seguintes arquivos:

PB_Informações_Básicas_do_Projeto_1104705.pdf;
 Declaração de Pesquisadores carta_pesquisador.pdf;
 Folha de Rosto folha de Rosto.pdf;
 Brochura Pesquisa Projeto.pdf;
 Ficha_Clinica.pdf;
 Projeto Detalhado / Brochura Investigador Projeto.pdf;
 TCLE e,
 Declaração de Manuseio Material Biológico /
 Biorepositório/Biobanco

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e, visto que o protocolo atende todos os requisitos exigidos pela legislação em vigor, este relator, vota por sua Aprovação.

S.M.J. É o parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto.pdf	05/04/2018 21:10:07	Monick Lindenmeyer	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
 Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL "DOUTOR HEITOR
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.611.418

Investigador	Projeto.pdf	05/04/2018 21:10:07	Guimarães	Aceito
Outros	FICHA_CLINICA.pdf	05/04/2018 18:36:44	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	05/04/2018 18:35:29	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	repositorioLABAIDSIOC.pdf	05/04/2018 18:34:58	Monick Lindenmeyer Guimarães	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 20 de Abril de 2018

Assinado por:
Marilaine Martins
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25

Bairro: D. Pedro I

CEP: 69.040-000

UF: AM

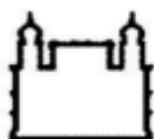
Município: MANAUS

Telefone: (92)2127-3572

Fax: (92)2127-3572

E-mail: cep@fmt.am.gov.br

Anexo 03 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde
 Fundação Oswaldo Cruz
 Instituto Oswaldo Cruz

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Pesquisa: **Diversidade genética do HIV-1 e mutações de resistência adquiridas em indivíduos em da Amazônia** Pesquisadores: Dr. Flávio Ribeiro Pereira e Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, médicos da Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado FMT-HVD . Dr. Monick Lindenmeyer Guimarães, Dr. Paulo Afonso Nogueira e Msc. Yury Oliveira Chaves, pesquisadores e estudante de Doutorado, respectivamente, do Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz IOC/FIOCRUZ e Instituto Leonidas e Maria Deane ILMD/FIOCRUZ-AM.

Nome do voluntário: _____

Como voluntário (a) você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que pretende avaliar o comportamento do HIV durante a infecção com a finalidade de estudar o vírus. Para a execução do trabalho, uma amostra do vírus contido em seu sangue será utilizada para análise genética.

- Se concordar em participar deste estudo, serão solicitadas informações a respeito de sua saúde que estão contidas em um questionário.
- 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 4 ml de seu sangue (1/2 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.

A participação neste projeto pode não lhe trazer benefícios diretos com relação ao seu problema, porém o conhecimento obtido do estudo do vírus do seu sangue poderá contribuir para o melhor conhecimento do HIV. Nada será publicado que inclua a sua identificação, portanto sua participação será mantida em sigilo. Em qualquer momento você poderá desistir de participar e inclusive pedir para destruir as suas amostras.

Eventualmente, precisaremos repetir exames no seu sangue ou de acordo com os resultados obtidos, poderemos necessitar novas análises que antes passarão pelo Comitê de Ética em pesquisa. 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

Toda pesquisa futura 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 à você.

Estaremos à disposição para quaisquer informações adicionais:

Médicos: Dr. Flávio Ribeiro Pereira e Dr. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda **Telefone:** (092)984115934 - (092)991147633 - (92)98418-6445 **Pesquisadores:** Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães, Dr. Paulo Afonso Nogueira e Msc. Yury Oliveira Chaves Paulo.nogueira@fiocruz.br - yury.chaves@fiocruz.br - monickl@ioc.fiocruz.br.

Consentimento:

Concordo em participar no estudo proposto, doando 4 ml de sangue (uma colher de sopa) para que possa ser utilizado nas pesquisas científicas que me foram explicadas.

Manaus, de de 20.....

Assinatura do voluntário:

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

Anexo 04 – Ficha Clínica e de Investigação Soro-epidemiológica



FICHA CLÍNICA E DE INVESTIGAÇÃO SORO-EPIDEMIOLÓGICA

Diversidade genética do HIV-1 e mutações de resistência adquiridas em indivíduos em da Amazônia

I - AMOSTRA

A. Código da amostra: _____ B. Local e Data de coleta: _____, ____/____/____

B. Resultado: HIV () HIV-1 () HIV-2 () HIV-1+2 () IND () Outro () _____

C. Data da última Sorologia Negativa: ____/____/____ D. Data da primeira Sorologia Positiva: ____/____/____

E. Médico Resp.: _____ F. Data início do acompanhamento: ____/____/____

G. Estocagem: -8°C () -20°C () -70°C () TA () Outro () _____

H. Aparência: Límpida () Turva () Hemolisada () Lipêmica () Outro: () _____

OBS.: _____

II- IDENTIFICAÇÃO

A. Nº Prontuário: _____

B. Sexo: Feminino () Masculino () Ignorado ()

C. Local e Data de Nascimento: _____, ____/____/____ Urbano () Rural ()

D. Estado civil: NA () Solteiro () Casado () União de Facto () Separado () Viuvo ()

E. Nacionalidade: _____

F. Residência Atual: Bairro: _____ Urbano () Rural () Estado: _____

H. Residência anterior: Bairro: _____ Urbano () Rural () Estado: _____

I. Ocupação/Profissão: _____ NA ()

J. Escolaridade: NA () Ignorado () Analfabeto () Primário Incompleto ()
Primário Completo () Secundário Incompleto () Secundário Completo () Superior ()

OBS.: _____

III- CATEGORIAS DE EXPOSIÇÃO

A. Tipo: Heterossexual () Usuário de drogas EV () Transmissão Vertical () Hemofílico ()
Bissexual ♂ () Bissexual ♀ () Homossexual ♂ () Homossexual ♀ ()

Transusão de sangue () Local e Data: _____, ____/____/____ Outro () _____ Ignorado ()

Se Heterossexual: Múltiplos parceiros () Parceiro bissexual () Parceiro com múltiplos parceiros ()

Parceiro soropositivo para HIV () Parceiro usuário de drogas () Parceiro transfundido ()
 Parceiro com Sida () Parceiro hemofílico () Outro () _____ Ignorado ()
 Se Homossexual: Múltiplos parceiros () Parceiro bissexual () Parceiro com múltiplos parceiros ()
 Parceiro soropositivo para HIV () Parceiro usuário de drogas () Parceiro transfundido ()
 Parceiro com Sida () Parceiro hemofílico () Outro () _____ Ignorado ()
 B. Parceiros (últimos 2 anos): NA () Nenhum () 1-3 () + de 3 () Quantos: _____ Não quer comentar ()
 Parceiro(s) de(ou em) outros países? Sim () Quais? _____ Não () 3. Ignorado ()
 C. Usou drogas endovenosas alguma vez? NA () Sim () Não () Não quer comentar ()
 F. Compartilhou seringas com outras pessoas: NA () Sim () Não () Não quer comentar ()
 Com pessoas de outros estados: Sim () Quais? _____ Não () Ignorado ()
 Com pessoas de outros países: Sim () Quais? _____ Não () Ignorado ()
 OBS.: _____

IV- DADOS CLÍNICOS

A. Tipo: Infecção aguda () Assintomática () Sintomática () Sida ()
 B. Manifestações clínicas relacionadas ao HIV: Não () Sim () Quais? _____
 C. Infecções não relacionadas ao HIV: Hepatite B Hepatite C () Outras: () Quais? _____
 D. Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST): NA () Ignorado () Não () Sim () Quais? _____
 E. Medicamentos anti-retrovirais em uso: Não () Sim () Quais? AZT () DDI ()
 DDC () D4T () 3TC () ABC () SQV () IDV () RTV () NFV ()
 LPV () NVP () DVL () EFVZ () Outros () Quais? _____
 OBS.: _____

V. EXAMES ADICIONAIS DA PESQUISA:

Teste realizado:	Resultado:	Local e Data:
1.		
2.		
3.		
Conclusão:		

VI. OUTRAS INFORMAÇÕES EXISTENTES RELEVANTES:

LOCAL E DATA _____ / _____ / _____

NOME: _____









Anexo 05 – Artigo Científico Publicado na Revista Biomed Research
Internacional

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2021, Article ID 5567332, 9 pages
<https://doi.org/10.1155/2021/5567332>



Research Article

High Detection Rate of HIV Drug Resistance Mutations among Patients Who Fail Combined Antiretroviral Therapy in Manaus, Brazil

Yury Oliveira Chaves ¹, Flávio Ribeiro Pereira ², Rebeca de Souza Pinheiro ¹,
Diego Rafael Lima Batista ¹, Antônio Alcirley da Silva Balieiro ¹,
Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda ^{1,2}, Paulo Afonso Nogueira ^{1,2}
and Monick Lindenmeyer Guimarães ³

¹Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA), Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD)-Fiocruz Amazônia, Manaus CEP 69.057-070, Brazil

²Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Manaus, Amazonas CEP 69040-000, Brazil

³Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil

Correspondence should be addressed to Yury Oliveira Chaves; yurychaves@gmail.com

Received 9 February 2021; Revised 10 May 2021; Accepted 27 May 2021; Published 9 June 2021

Academic Editor: Yanjin Zhang

Copyright © 2021 Yury Oliveira Chaves et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Virologic failure may occur because of poor treatment adherence and/or viral drug resistance mutations (DRM). In Brazil, the northern region exhibits the worst epidemiological scenarios for the human immunodeficiency virus (HIV). Thus, this study is aimed at investigating the genetic diversity of HIV-1 and DRM in Manaus. The cross-sectional study included people living with HIV on combined antiretroviral therapy and who had experienced virological failure during 2018-2019. Sequencing of the protease/reverse transcriptase (PR/RT) and C2V3 of the viral envelope gp120 (*Env*) regions was analyzed to determine subtypes/variants of HIV-1, DRMs, and tropism. Ninety-two individuals were analyzed in the study. Approximately 72% of them were male and 74% self-declared as heterosexual. Phylogenetic inference (PR/RT-*Env*) showed that most sequences were *B* subtype, followed by BF1 or *BC* mosaic genomes and few F1 and *C* sequences. Among the variants of subtype *B* at PR/RT, 84.3% were pandemic (*B*_{PAN}), and 15.7% were Caribbean (*B*_{CAR}). The DRMs most frequent were M184I/V (82.9%) for nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI), K103N/S (63.4%) for nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), and V82A/L/M (7.3%) for protease inhibitors (PI). DRM analysis depicted high levels of resistance for lamivudine and efavirenz in over 82.9% of individuals; although, low (7.7%) cross-resistance to etravirine was observed. A low level of resistance to protease inhibitors was found and included patients that take atazanavir/ritonavir (16.6%) and lopinavir (11.1%), which confirms that these antiretrovirals can be used—for most individuals. The thymidine analog mutations-2 (TAM-2) resistance pathway was higher in *B*_{CAR} than in *B*_{PAN}. Similar results from other Brazilian studies regarding HIV drug resistance were observed; however, we underscore a need for additional studies regarding subtype *B*_{CAR} variants. Molecular epidemiology studies are an important tool for monitoring the prevalence of HIV drug resistance and can influence the public health policies.

1. Introduction

Since 1996, Brazil has offered free combined antiretroviral therapy (cART) to all people living with HIV/AIDS (PLWHA) regardless of the TCD4+ cell count—and has

adopted innovative actions over the years, mainly in primary care [1, 2]. In cART, the drugs used act on different viral targets, and this therapy has brought significant advances in the treatment of PLWHA, such as a fast reduction of the viral load and their more extended maintenance, followed by a

significant increase in the TCD4 lymphocyte counts [3, 4]. This has led to better quality of life, with individuals achieving immunological stability and a consequent reduction in the incidence of opportunistic infections and HIV/AIDS-related deaths. Another benefit that stems from the suppression of HIV replication is the reduced possibility of HIV transmission [5, 6].

Treatment failure in HIV therapy can be related to the presence of drug resistance mutations, drug intolerance, and low adherence to therapeutic regimens causing suboptimal ARV dosage, as well as anthropogenic aspects [7, 8] such as physical, psychological, social, or cultural aspects [9]. In addition, the use of ARVs with a low genetic barrier for resistance in the first therapeutic regimen may favor the rapid selection of DRMs [10]. Virological failure is actually defined by the presence of detectable viral load (VL) \geq 500 copies/ml after at least six months of cART; hence, HIV-1 genotyping is recommended in order to verify the presence of acquired DRMs [11–13]. Depending on the type of DRM, crossresistance to another ARV of the same class could be verified, as reported for thymidine analog mutations (TAMs). TAMs confers crossresistance to nucleoside analogues, potentially affecting first cART regimens, as may prevent the use of another NRTI in subsequent regimens, and could result in the replacement of the ARV class. [14–17].

Despite advances in HIV treatment in Brazil, the North and northeastern regions registered an increase in the AIDS detection rate between 2009 and 2019. In the Amazonas state, detection arose from 31.7 to 34.8 per 100,000 habitants in this period, despite of a 4.5% decrease in the AIDS mortality rate (6.7 to 6.4 per 100,000 habitants). In 2019, Manaus occupied third place in the mortality coefficient rankings (10.5 per 100,000 habitants) and fifth place in AIDS detection rate rankings (54.7 per 100,000 habitants) [18].

The genetic diversity of HIV-1 found in the northern region is little distinct from other regions in Brazil [19], characterized mainly by the prevalence of subtype B (63–92%), subtype F1 (0–14%), subtype C (0–6%), BF1 (4–18%), and B C (0–8%) [20–24]. Contrasting to other Brazilian regions, high prevalence of B_{CAR} variant (14.4%) was verified in this region [25]. The studies about subtype B variants have been focusing in epidemiological aspects; however, the possible impact in the pathogenesis or acquisition of DRM was not investigated.

This problematic epidemiological scenario, along with little data concerning HIV-1 diversity and DRMs in Manaus, led us to investigate these topics in individuals with virological failure ongoing cART schemes.

2. Material and Methods

2.1. Study Subject Characteristics and Ethical Aspects. This cross-sectional study included 100 individuals with positive HIV-1 serology, who were older than 18 years of age, undergoing antiretroviral therapy for at least six months and presenting virologic failure (viral load \geq 1000 copies/ml of plasma), receiving a medical request for HIV-1 genotyping following the guidelines of the Brazilian Ministry of Health at the time of the study. All individuals were included in

the study and had their samples collected between 2018 and 2019. All subjects were treated at the Tropical Medicine Foundation-Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Amazonas state, Brazil. Demographic and clinical data were collected using a structured questionnaire. A sample of 4 ml of whole blood was collected by venous pulse, and the samples were processed for plasma separation and stored at -80°C until RNA extraction. The study was approved by the Ethical Review Board, IOC/FIOCRUZ under CAAE 87171018.4.0000.5248 protocol, the FMT-HVD under approval CAAE 87171018.4.3001.0005, and all subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

2.2. RNA and RT-PCR Extraction. Extraction of genetic materials was performed using the QIAamp RNA mini kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. This was followed by reverse transcription of RNA to obtain cDNA using MMLV enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA) protocol with specific external reverse PCR primers for each gene target.

2.3. Amplification, Purification, and Sequencing of PR/RT and C2-V3. The *pol* region was amplified by nested PCR with initial primer G17S (AAAAAGGGCTGTTGTTGGTGGAAATGTGGA)/MMRTR6 (TTTTACATTAGTGTGGG) and MMRTR5 (TAAATTTGATATGTCCATTG)/MMRT10 (CAGGCTAATTTTTAGGGAA) generating a final fragment of 1478 bp (positions 2077–3574 relative to HXB2). For the *env* region, we used the external primers ED5 (ATGGGATCAAAGCCTAAAAGCCATGTG)/ED12 (AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG) and ED31 (CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAA G)/ED33 (TTACAGTAGAAAAATCCCCTC) generating a final fragment of 563 bp (positions 6816–7380 relative to HXB2), as described by Delwart et al. and Delatorre et al. [26, 27]. The cycling protocol for both study regions was 94°C for 2 minutes for initial denaturation, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 2 minutes, with a final extension of 10 minutes at 72°C .

The amplified PCR products were purified using the Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, United Kingdom) following the manufacturer's instructions. The products were subsequently subjected to sequencing using ABI BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready (Applied Biosystems, United States). The samples were sequenced in the ABI Prism 3130 automatic sequencer (Applied Biosystems).

2.4. Sequence Analysis. The sequences were edited using SeqMan software of the DNASTAR 4.0 program and aligned by Clustal W in the MEGA 6.0 program together with corresponding reference sequences of the different HIV-1 subtypes obtained from the Los Alamos database (<http://hiv.lanl.gov>). The final *pol* (partial PR/RT) and *env* (partial gp120) alignments contained a 1260 nucleotide (nt) (positions 2254–3514 relative to the HXB2) and a 397 nt fragment (positions 6858–7225 relative to the HXB2), respectively.

The phylogenetic analysis was performed based on the neighbor-joining method and the Tamura-Nei substitution model. The bootstrap test with 1,000 replicates was used to estimate the confidence level of the branching on the phylogenetic tree. Possible recombinant sequences were detected via bootscan analysis, which was performed using the Simplot 3.5.1 program. These analyses were performed on a sliding window of 200 nt moving in 10 nt steps. For the characterization of the B_{BR} variant in the C2V3 region, an amino acid sequence was obtained by the translation of the *env* alignment using MEGA, and all sequences showing the GWG motif at the top of loop V3 were considered. The Brazilian HIV-1 B *pol* sequences were aligned using the Clustal W in the MEGA program, with reference B (Pandemic or Caribbean) sequences, and the positions associated with DRMs were removed. The analysis was performed using the maximum likelihood (ML) method in the PhyML program, and the FigTree v1.4.0 program was used for confection and visualization of the phylogenetic trees.

Analysis of PR/RT resistance mutations was performed for each sequence on the Stanford HIV Drug Resistance Database website (<http://hivdb.stanford.edu/>). All major resistance mutations from the updated list on this site were considered (https://hivdb.stanford.edu/pages/download/resistanceMutations_handout.pdf and <https://www.iasusa.org/resources/hiv-drug-resistance-mutations/>). The susceptibility of each sequence to the ARV was also determined using the HIVdb Program from the Stanford HIV Drug Resistance Database. However, concerning the resistance level to the ARV only the high-level resistance was applied.

The genotypic prediction was used to infer the use of CCR5 and/or CXCR4 coreceptors. The prediction was performed based on the amino acid sequence of the V3 region of the gp120 of the envelope of each sequence using the program Geno2pheno (available at <https://coreceptor.geno2pheno.org/>), with a false positive cut-off rate of 10% according to the European Tropism Test guidelines.

2.5. Statistical Analyses. The data were analyzed using the GraphPad Prism software version 5 and the R software, with a significance level set at $P < 0.05$. Statistical comparisons between and within groups were made using Fisher's exact test, the Mann-Whitney test, and the Kruskal-Wallis test when appropriate.

3. Results

3.1. Epidemiological and Clinical Data. Of the 100 individuals enrolled in the study, we were able to amplify 95% at the PR/RT region and to sequence 92% of them. From those 92 individuals, approximately, 72% were male, with an average age of 40 (31-46) years, and approximately, 95% were residents of Manaus, the capital of the Amazonas state. Regarding sexual orientation, 74% declared themselves heterosexual, 19% as homosexual, and 6% as bisexual. The median viral load (log) was 4.4 (IQR 4-5), and the median CD4+ count was 168 cell/mm³ (IQR 50.5-342.5) at the time of sample collection. The patients from this cohort presented a mean of six years (IQR 4-7) receiving cATR, 57.6% of them

were receiving their first treatment, and 42.4% had already undergone treatment changes (TARV). From the 92 (PR/RT) analyzed individuals, only 78 (84.8%) sequences were determined in the envelope region. Thus, according to the phylogenetic inference of the combined *pol* (RT/PR) and *env* regions together, it was possible to classify these 78 HIV-1 (*pol/env*) sequences as 68.5% subtype B/B, F1/F1 (1.1%), and C/C (1.1%), and 14.1% were mosaic genomes, for which 13% BF1 and 1.1% BC. However, for the remaining 14 sequences (15.2%) obtained only in the *pol* region, 14.2% were subtype B, and 1% was subtype C. Regarding the HIV-1 subtype B variants, 84.3% were classified as pandemic and 15.7% as Caribbean in the *pol* region, and 5.1% were Brazilian variants (B_{BR}) in *env*. The bioinformatic analyses were able to predict that the viral tropism found in the sequences of the *env* region demonstrated that about the majority (66.7%) of the 78 studied individuals sequenced at *env* region had the R5 virus at the time of the sample collection.

Among the 92 studied individuals, DRMs were observed in 82 sequences (89%), from those 91.5% presented DRMs associated with NRTI ($n = 75$) and 84.1% with NNRTI ($n = 69$) (Figure 1). All patients were taking NRTIs at the time the genotyping test was done, with 3TC being used by 92.6% of the individuals ($n = 76/82$) and TDF by 84.1% ($n = 69/82$). Concerning NNRTIs, all individuals had already used EFV; however, only 63.4% ($n = 52/82$) were currently using this ARV at the collection time (Table 1). The most frequently detected DRMs were M184I/V (68/82; 82.9%), K70E/R (16/82; 19.5%), and T215F/Y (17/82; 20.7%) to NRTI and K103N/S (51/82; 62.1%), P225H (15/82; 18.2%), and V106A/I/M (11/82; 13.4%) to NNRTI (Figure 1). Thymidine analog mutations (TAM) were detected in 35.4% of the individuals [17.1% (14/82) TAM-1 (including M41L, L210W, and T215Y) and 20.7% (17/82) TAM-2 (including D67N, K70R, T215F, and K219Q/E)].

Only half of the individuals had used PI ($n = 46/82$), only 17% of individuals presented DRMs associated with protease inhibitors ($n = 14$), and the most frequent mutations were V82A/L/M (6/82; 7.3%) and I54L/M/V (5/82; 6%), L90M (4/82; 4.8%), and M46L/I (4/82; 4.8%) (Figure 1). ATZ/r was the most ARV used at the time of the genotyping test (23.1%, $n = 19/82$) (Table 1). Concerning the resistance mutations, the most prevalent inter-ARV class combinations were M184/K103 and M184/K103/P225 (12.1% each) and M184/K70/K103 (8.5%). Multidrug resistance mutations were verified in 72% to NNRTI/NRTI, 5% NRTI/PI, and 3% NNRTI/NRTI/PI.

High resistance level to NRTI class was verified in 85.3% ($n = 70/82$), being most of them 82.9% ($n = 68/82$) among those under 3TC use, and the M184I/V mutation was presented in all of them. However, only 6 from those 70 individuals that were taking TDF (8.5%) had high resistance level against TDF, despite its high use (Table 1), in the same way as high resistance level was detected just in 6 from those 46 individuals that were taking PI (13.0%). TDF remained acceptable as for being used for most of the individuals studied (91.5%), as well as the DRV to all individuals (Table 1). In regard to NNRTI, high ARV resistance level was detected in approximately 90.0% of them, representing 64 of those 71

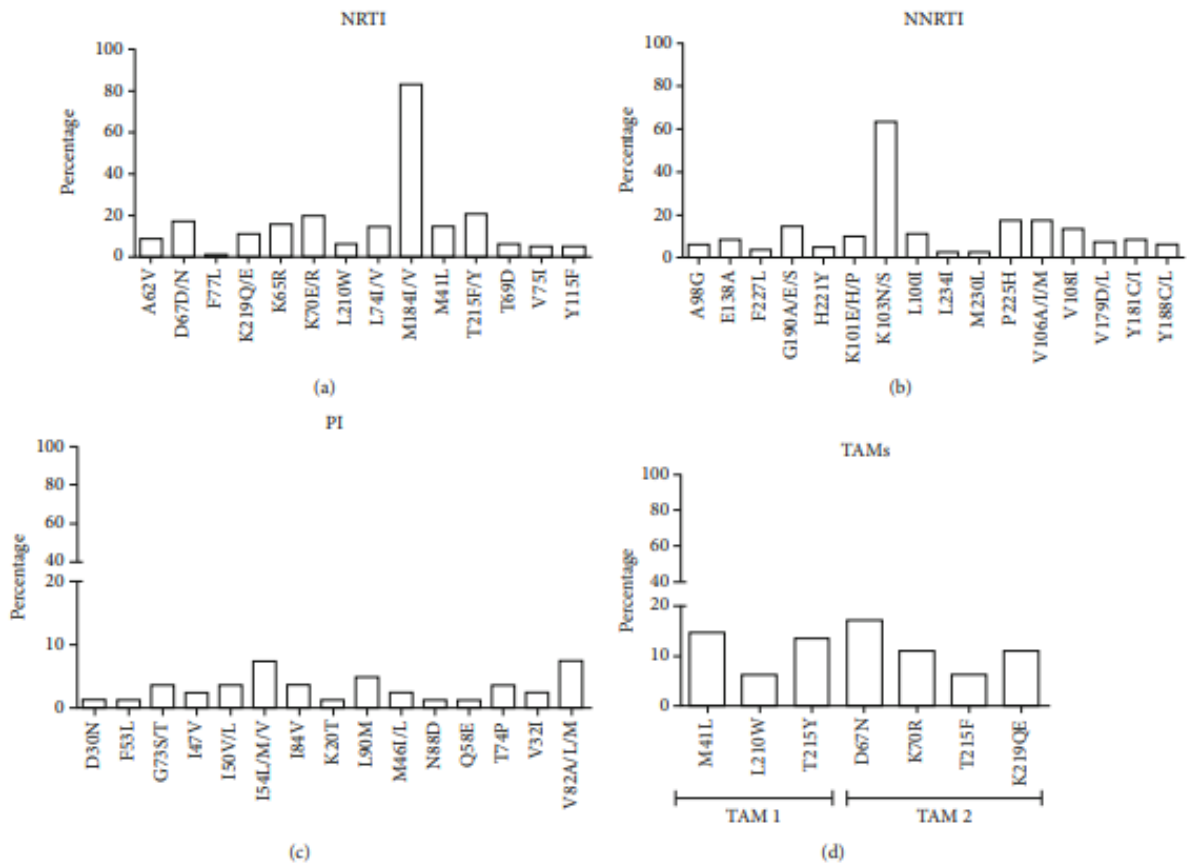


FIGURE 1: Frequency of HIV-1 drug resistance mutations according to inhibitor class and TAMs detected in 82 individuals. (a) DRM to NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitors (91.5%, $n = 75/82$). (b) DRM to NNRTI: nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (84.1%, $n = 69/82$). (c) DRM to PI: protease inhibitors (17%, $n = 14/82$). (d) Thymidine analog mutations TAM [TAM-1 ($n = 14$), TAM-2 ($n = 17$)].

TABLE 1: Prevalence of ARV used at any time during treatment and current in use, prevalence of the most prevalent DRMs to each ARV class in relation to the ARV current in use, and percentage of individuals with high ARV resistance related to the ARV used.

ARV	ARV used, n (%)	ARV current in use, n (%)	Drug resistance mutation, n (%)			ARV high resistance level, n (%)
			M184I/V	K70E/R	T215F/Y	
Total NRTI	82/82 (100)	82/82 (100)	68/82 (82.9)	16/82 (19.5)	17/82 (20.7)	70/82 (85.3)
3TC	82/82 (100)	76/82 (92.6)				68/82 (82.9)
TDF	70/82 (85.3)	69/82 (84.1)				6/70 (8.5)
AZT	41/82 (50.0)	5/82 (6.0)				9/41 (21.9)
Total NNRTI	71/82 (86.5)	48/82 (58.5)	K103N/S	V106A/I/M	P225H	64/71 (90.1)
EFV	71/82 (86.5)	52/82 (63.4)	51/71 (71.8)	11/71 (15.4)	15/71 (21.1)	64/71 (90.1)
Total PI	46/82 (50.0)	26/82 (31.7)	V82A/L/M	I54L/M/V	M46L/I	6/46 (13.0)
LPV	18/82 (21.9)	1/82 (1.2)	5/46 (10.8)	5/46 (10.8)	4/46 (8.6)	2/18 (11.1)
ATZ/r	24/82 (29.2)	19/82 (23.1)				4/24 (16.6)
DRV	6/82 (7.3)	4/82 (4.8)				0 (0)

ARVs: 3TC: lamivudine; EFV: efavirenz; TDF: tenofovir; AZT: zidovudine; AZT/r: atazanavir/ritonavir; DRV: darunavir; LPV: lopinavir; PI: protease inhibitors. ARV resistance inputted according to high resistance level in the Stanford HIV Drug Resistance database (<https://hivdb.stanford.edu/>).

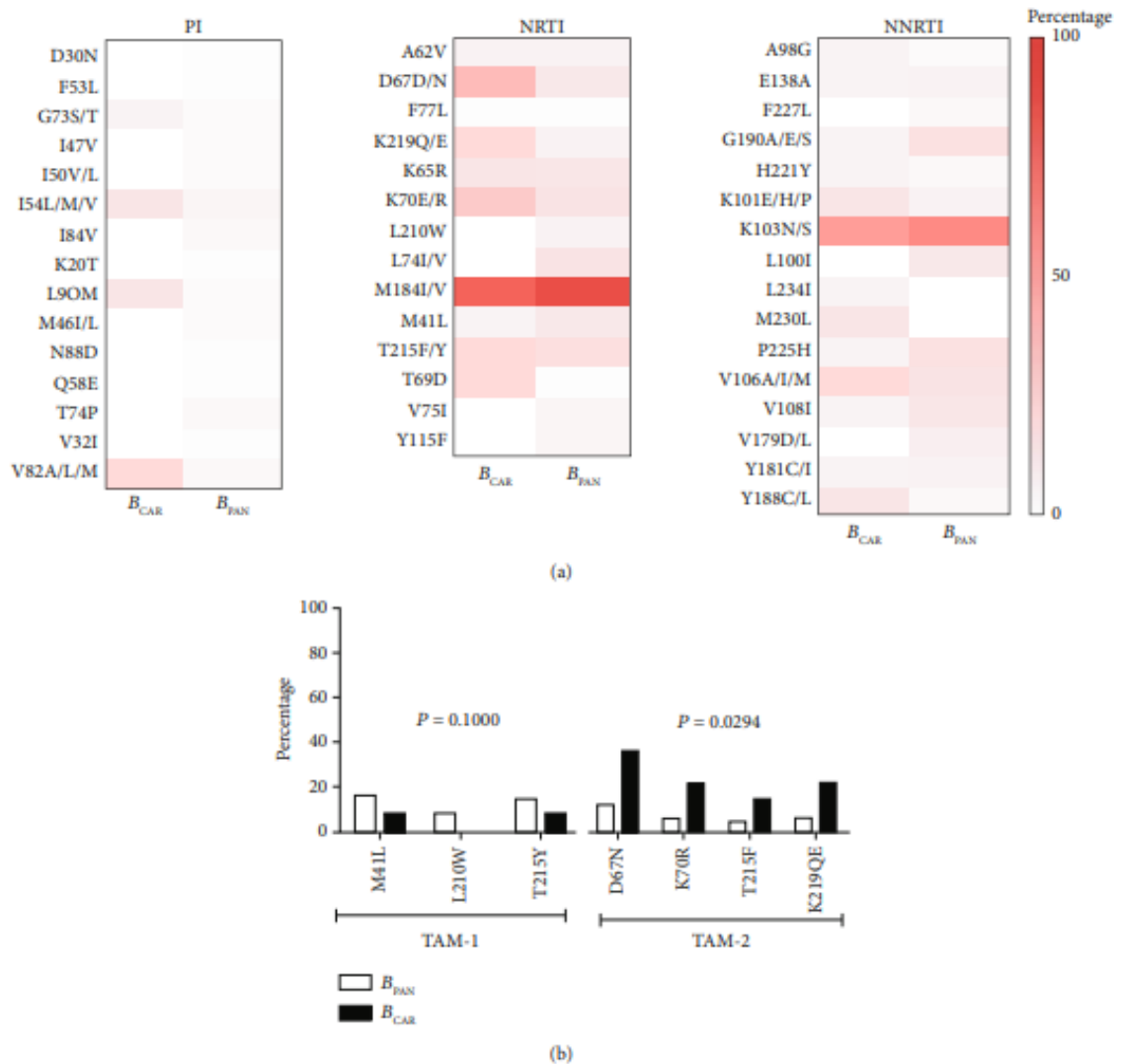


FIGURE 2: Comparison of DRMs among subtype B variants: B_{CAR} ($n = 13$) and B_{PAN} ($n = 61$). (a) Heat map of the different classes of antiretroviral drugs: protease inhibitors (PI), nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTI) and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTI), and the frequency of drug-resistant mutations. (b) Profile of mutation pathways associated with thymidine—TAMs (TAM-1 B_{CAR} ($n = 1$) and B_{PAN} ($n = 10$) and TAM-2 B_{CAR} ($n = 5$) and B_{PAN} ($n = 9$) between subtype B variants). Statistical analysis using the Mann-Whitney test: TAM-1 ($P = 0.1000$) TAM-2 ($P = 0.0294$).

individuals who were taking EFV, and mutations K103N/S (71.8) and P225H (21.1%) were the most prevalent among them. Among those individuals under use of NRTIs, crossover DRM confers high resistance level to abacavir in 47.5% of them, as well as for the 71 individuals under use of NNRTIs, and high resistance of 66.4% was verified to nevirapine, followed to 39.4% to rilpavirine, 19.7% to doravirine, and only 7.7% to etravirine (data not shown).

While analyzing the resistance profile of individuals with B_{CAR} and B_{PAN} variants, the heat map showed that the most frequent mutations in subtype B variants were M184I/V (NRTI) and K103N/S (NNRTI), and these also presented similar prevalence in both groups (Figure 2(a)). Despite the low frequencies of TAMs in the general group below 20%

(Figure 1), when we compared them among B_{CAR} and B_{PAN} , it was possible to observe that the TAM-2 mutational pattern was more present ($P = 0.0294$) in the B_{CAR} variants (Figure 2(b)) and TAM-1 in the B_{PAN} variants ($P = 0.1000$).

4. Discussion

Even though the northern region has presented one of the worst HIV epidemiological scenarios in Brazil in the last few years, there has been scarce surveillance of epidemiological and molecular resistance. In the present study regarding HIV-1 individuals failing cART individuals, the epidemiological data, genetic HIV-1 diversity, and frequency of DRMs and their ARV used were analyzed. We

observed both high prevalence of individuals with virologic failure without DRMs and also elevated frequency of DRMs, which can lead to an increase of TDRM (transmitted DRMs) and in HIV transmission in the region, as has been recently observed [28].

The general male-to-female ratio (M/F) detected was 2.5, in agreement with a 2.3 rate observed in 2018 in Brazil on a national level [18], and in 2011 in the state of Amazonas during the 2001-2012 HIV/AIDS epidemic [29]. Our results show a higher prevalence of heterosexual individuals. This category represents 71% of the study males, in contrast with the 31.4% observed nationally from 2007 to June 2019 in males over 13 years [18].

Our results show a high prevalence of HIV-1 subtype B and a very low presence of subtypes F1 and C, as previously reported in other studies in the state of Amazonas [21, 22, 30, 31]. An increased number of HIV BF1 recombinant forms (13%) were verified when compared to other studies based on the *pol* region (4.3%-10%), mainly because of the inclusion of the *env* region in the analysis. Caribbean variants of subtype B *pol* viruses were detected in the high rate of 15.7% when compared to other Brazilian regions, which goes in agreement with the 22% previously report at the same Amazon region [32]. A low prevalence (5.1%) of the B_{BR} variant of HIV-1 subtype B (*env*) was observed [33], in contrast with 20-60% found in studies from other regions in the country [34-37].

The majority of the patients in our study had T CD4 counts below 200 cells/mm³ even when under a longer period of cART. This could be the result of a long virologic failure period until HIV genotyping and ARV replacement and also due to a late arrival of the individuals to care and consequently late HIV diagnosis. This may be demonstrated by the low CD4 count when analyzing the immune status of patients presenting for the first time, where half of patients showed CD4+ T cell counts below 350/mm³ and one-third below 200/mm³ at the initial HIV diagnosis [38]. These results also indicate a significant advance in the progression of the infection to AIDS in these individuals.

Concerning the viral tropism based in the sequences of the *env* region, we found that about 33% of the viruses presented X4 tropism; when considering only HIV-1 subtype B *env* ($n = 66$), the X4 virus was verified in 38% of the individuals, which is very similar to previous reports of 40% of subtype B virus switching during disease progression [39, 40]. On the other hand, 66.7% of the analyzed samples in our study still had R5 viral tropism and could be eligible for rescue therapies involving the use of maraviroc, as described by Bon et al. [41].

The studied individuals show high prevalence of DRMs associated with to NRTI (91%) and to NNRTI (84%). Other Brazilian studies have documented an increase in NNRTI DRMs over time, as well as the decrease in the rate of DRMs for NRTI [38, 42]. The increase of NNRTI resistance is mainly correlated to the presence of the K103N mutation, which was detected in 71.8% of individuals that use NNRTI, as also previously described [24]. The prevalence of K103N/S in our study (63.4%) was higher than the mean of 40% detected for the five largest Brazilian cities (São Paulo, Rio

de Janeiro, Espírito Santo-Southeast region and Bahia and Ceará-Northeast region) and also in Belém, another city in the northern region [24, 38]. An elevated frequency of M184V (75%) was also detected herein, as well as in the study conducted in Belém [24]; this has ranged from 54.4% in São Paulo to 81.2% in Bahia [38]. Despite the low impact of the M184V alone to NRTI resistance, when taken together to other NRTI DRM, an increased level of resistance could be verified as shown in this study and in others [43-45].

A higher prevalence of TAM 1 was verified herein, as well as a lower prevalence of TAM-2, similar to those reported by Lopes et al. in the northern region [24]. It is important to point out that some resistance mutations observed in our and in other cross-sectional studies conducted with individuals failing cART could result from the transmitted virus since, up until now, genotyping prior to the HIV treatment is required only in a few cases, such as for pregnant women in Brazil, for example.

We observed high resistance to 3TC and EFV, and we have also demonstrated that the NRTIs (TDF and AZT) still presented high viability of use for most individuals. Due to the presence of mutations, such as L100I, K101P, Y181C, M230L, observed in of individuals failing in the use of EFV, the viability of using ETR in a rescue scheme is reduced for few individuals (data not shown) [46].

The high resistance levels found for these ARVs (3TC > EFV > TDF) reflect their high use and the genetic barrier to resistance of these ARVs [47]. Although some studies suggest that the viability of using first-line ARV drugs may be related to the combination of drugs with a low and/or high genetic barrier, consequently, the choice of drugs with a low barrier may favor the rapid selection of DRMs causing therapeutic failure [10]. The studied group has little experience with PIs, taken together to the fact that boosted PIs have a high genetic barrier, which could explain the low prevalence of major PI mutations observed. Our results demonstrated a high prevalence of NRTI/NNRTI dual class ARV NNRTI over the years in several studies, and resistance to NNRTI and NRTI is the most common forms of TDR [48-50]. Due to the increased prevalence of resistance to NRTI and NNRTI-based regimens, ARVs focusing new targets on the HIV replication cycle were developed and implemented at the therapy. On a clinical trial comparing once-daily dolutegravir versus twice-daily raltegravir in antiretroviral-experienced individuals, the superior virological effect was verified in the dolutegravir group [51]. Dolutegravir has a high genetic barrier to resistance, which can be effective for HIV, both for first-line and rescue schemes. The study by Cahn et al. subsidized the World Health Organization to recommend the use of dolutegravir in the first therapeutic regimen since 2016, and it was implemented in Brazil in 2017. After the genotyping performed at the present study, various of the individuals started to use this ARV.

These factors can contribute to the DRM potentiating therapeutic failure and increase HIV transmission and TDRM prevalence in the region. Thus, the clinical and constant viral load monitoring of PLWHA is essential in order to reduce the risk of DRM accumulation and thus rapidly detect therapeutic failure, in order to preserve susceptibility

to subsequent therapeutic schemes [15, 52]. However, protease inhibitors remain a good rescue therapy with less than 13% of the associated resistance verified, despite their use in 50% of individuals.

No significant epidemiological differences were seen among individuals infected by subtype B variants, as previously verified among specific viral subtypes [53, 54]. Our results showed that the TAM-2 pathway was more prevalent in the B_{CAR} variants, while TAM-1 was greater in B_{PAN} , as shown previously in the northern region in blood donors [28]. It is important to point out that the TAM pathway verified could result from the specific use of thymidine analogs used during the treatment of these individuals. However, specific TAMs pathways were verified in some viral subtypes [55, 56], and these pathways are potentially related to the difficulty in achieving viral suppression [57]. However, further studies are needed to corroborate the specific characteristics concerning HIV-1 subtype B variants (B_{CAR} and B_{PAN}) detected herein.

5. Conclusion

This is the most comprehensive analysis of the molecular epidemiology of HIV-1 and acquired DRMs in Manaus. Herein, we verified a high prevalence of the HIV-1 subtype B, a significant difference in the TAM pathway in relation to B variants (B_{CAR} and B_{PAN}), as well as an increase in recombinant BF1. We also verified that, despite the high resistance to 3TC and EFV, the low crossresistance of ARV of the same classes may favor rapid replication control after the change of viable ARV. Therefore, HIV-1 surveillance at local sites is essential for understanding the different obstacles for treatment adherence and rapid detection of therapeutic failure. This information will help the National Health Service redirect its strategies to achieve greater HIV/AIDS control.

Data Availability

All nucleotide sequences are available from the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) under accession numbers POL (MW545333-MW545424) and ENV (MW582429-MW582506).

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Authors' Contributions

MLG conceived and designed the experiments. YOC, RSP, DRLB, and MLG carried out the experiments. YOC, RSP, MLG, and FPR analyzed the data. MLG and PAN contributed reagents/materials/analysis tools. FPR and MVGL conducted patient recruitment and follow-up. YOC and MLG wrote the first draft.

All authors revised and approved the final manuscript.

Acknowledgments

The study is supported in collaboration with the Tropical Medicine Foundation Heitor Vieira Dourado and the Carlos Borborema Research Institute in Manaus, Amazonas, Brazil and the financial support from the Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, the authors are grateful to the Genomic Platform DNA Sequencing-RPT01A and RPT01H (Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz). "This study was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES)-Finance Code 001." MLG has a CNPq fellowship number 305919/2018-0.

References

- [1] A. E. H. V. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de DST, *Cuidado integral às pessoas que vivem com HIV pela Atenção Básica Manual para a equipe multiprofissional*, 2015.
- [2] A. E. H. V. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de DST, *Agenda Estratégica para ampliação do acesso e cuidado integral das populações-chave em HIV, hepatites virais e outras infecções sexualmente transmissíveis*, 2018.
- [3] C. J. Hoffmann, M. Schomaker, M. P. Fox et al., "CD4 count slope and mortality in HIV-infected patients on antiretroviral therapy," *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, vol. 63, no. 1, pp. 34–41, 2013.
- [4] M. S. Saag, C. A. Benson, R. T. Gandhi et al., "Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults," *JAMA*, vol. 320, no. 4, pp. 379–396, 2018.
- [5] J. Fokam, S. M. Sosso, B. Yagai et al., "Viral suppression in adults, adolescents and children receiving antiretroviral therapy in Cameroon: adolescents at high risk of virological failure in the era of 'test and treat,'" *AIDS Research and Therapy*, vol. 16, no. 1, pp. 10–17, 2019.
- [6] M. S. Cohen, Y. Q. Chen, M. McCauley et al., "Antiretroviral therapy for the prevention of HIV-1 transmission," *New England Journal of Medicine*, vol. 375, no. 9, pp. 830–839, 2016.
- [7] J. B. Nachega, V. C. Marconi, G. U. van Zyl et al., "HIV treatment adherence, drug resistance, virologic failure: evolving concepts," *Infectious Disorders-Drug Targets*, vol. 11, no. 2, pp. 167–174, 2011.
- [8] Y. Yu, D. Luo, X. Chen, Z. Huang, M. Wang, and S. Xiao, "Medication adherence to antiretroviral therapy among newly treated people living with HIV," *BMC Public Health*, vol. 18, no. 1, 2018.
- [9] P. Ü. Calvetti, G. R. M. Giovelli, G. J. C. Gauer, and J. F. D. de Moraes, "Psychosocial factors associated with adherence to treatment and quality of life in people living with HIV/AIDS in Brazil," *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*, vol. 63, no. 1, pp. 8–15, 2014.
- [10] C. Katusiime, P. Ocama, and A. Kambugu, "Basis of selection of first and second line highly active antiretroviral therapy for hiv/aids on genetic barrier to resistance: a literature review," *African Health Sciences*, vol. 14, no. 3, pp. 679–681, 2014.

- [11] A. D. L. G. Corado, G. Bello, R. A. C. Leão, F. Granja, and F. G. Naveca, "HIV-1 genetic diversity and antiretroviral drug resistance among individuals from Roraima state, northern Brazil," *PLoS One*, vol. 12, no. 3, p. e0173894, 2017.
- [12] S. Sanguansittianant, N. Nooroon, P. Phaengchomduan, and P. Ammaranon, "Trends in prevalence of HIV-1 drug resistance in Thailand 2009-2010," *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, vol. 27, no. 5, pp. 346-353, 2013.
- [13] R. K. Gupta, A. Hill, A. W. Sawyer et al., "Virological monitoring and resistance to first-line highly active antiretroviral therapy in adults infected with HIV-1 treated under WHO guidelines: a systematic review and meta-analysis," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 9, no. 7, pp. 409-417, 2009.
- [14] A. E. H. V. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de DST, *Recomendações para terapia anti-retroviral em adultos infectados pelo HIV*, 2008.
- [15] K. C. E. Sigaloff, T. Ramatsebe, R. Viana, T. F. R. de Wit, C. L. Wallis, and W. S. Stevens, "Accumulation of HIV drug resistance mutations in patients failing first-line antiretroviral treatment in South Africa," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 28, no. 2, pp. 171-175, 2012.
- [16] D. Thirunavukarasu, V. Udhaya, H. S. Iqbal, and T. Umaarasu, "Patterns of HIV-1 drug-resistance mutations among patients failing first-line antiretroviral treatment in South India," *Journal of the International Association of Providers of AIDS Care*, vol. 15, no. 3, pp. 261-268, 2013.
- [17] B.M da S.S de em S.D. de D de C.C e I S T (DCCI), *Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de DST, Manual Técnico para Avaliação de Exames de Genotipagem do HIV*, 2019.
- [18] A. E. H. V. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, and Departamento de DST, *Boletim Epidemiológico HIV/Aids* [2019], 2019.
- [19] T. Gräf and A. R. Pinto, "The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in southern Brazil and its dispersion through the continent," *Virology*, vol. 435, no. 1, pp. 170-178, 2013.
- [20] B. C. Carvalho, L. P. V. Cardoso, S. Damasceno, and M. M. D. A. Stefani, "Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland north state of Tocantins, Brazil," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 27, no. 10, pp. 1081-1087, 2011.
- [21] L. K. H. Cunha, S. Kashima, M. F. C. Amarante et al., "Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the state of Amazonas, Brazil, and subtype C identification," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 45, no. 2, pp. 104-112, 2012.
- [22] C. M. Da Costa, C. M. Costa De Oliveira, Y. F. Chehuan De Melo, E. Delatorre, G. Bello, and J. C. Couto-Fernandez, "High HIV-1 genetic diversity in patients from northern Brazil," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 32, no. 9, pp. 918-922, 2016.
- [23] L. Dos Anjos Silva, F. Divino, M. O. Da Silva Rêgo et al., "HIV-1 genetic diversity and transmitted drug resistance in antiretroviral treatment-naive individuals from Amapá state, northern Brazil," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 32, no. 4, pp. 373-376, 2016.
- [24] C. A. F. Lopes, M. A. Soares, D. R. Falci, and E. Sprinz, "The evolving genotypic profile of HIV-1 mutations related to antiretroviral treatment in the north region of Brazil," *BioMed Research International*, vol. 2015, 11 pages, 2015.
- [25] F. Divino, A. L. G. De Corado, F. G. Naveca, M. M. A. Stefani, and G. Bello, "High prevalence and onward transmission of non-pandemic HIV-1 subtype B clades in northern and north-eastern Brazilian regions," *PLoS One*, vol. 11, no. 9, p. e0162112, 2016.
- [26] E. Delwart, E. Shpaer, J. Louwagie et al., "Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes," *Science*, vol. 262, no. 5137, pp. 1257-1261, 1993.
- [27] E. Delatorre, C. Silva-De-Jesus, J. C. Couto-Fernandez, J. H. Pilotto, and M. G. Morgado, "High HIV-1 diversity and prevalence of transmitted drug resistance among antiretroviral-naive HIV-infected pregnant women from Rio de Janeiro, Brazil," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 33, no. 1, pp. 68-73, 2017.
- [28] M. A. Esashika Crispim, M. N. da Guarda Reis, N. Fraiji, G. Bello, and M. M. A. Stefani, "Detection of human immunodeficiency virus type 1 phylogenetic clusters with multidrug resistance mutations among 2011 to 2017 blood donors from the highly endemic northern Brazilian Amazon," *Transfusion*, vol. 59, no. 8, pp. 2593-2601, 2019.
- [29] R. D. S. M. De Oliveira, A. S. Benzaken, V. Saraceni, and M. Sabidó, "Hiv/aids epidemic in the state of Amazonas: Characteristics and trends from 2001 to 2012," *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol. 48, suppl 1, pp. 70-78, 2015.
- [30] M. A. E. Crispim, M. N. D. G. Reis, C. Abraham et al., "Homogenous HIV-1 subtype B from the Brazilian Amazon with infrequent diverse BF1 recombinants, subtypes F1 and C among blood donors," *PLOS ONE*, vol. 14, no. 9, p. e0221151, 2019.
- [31] S. D. De Andrade, M. Sabidó, W. M. Monteiro, A. S. Benzaken, and A. Tanuri, "Drug resistance in antiretroviral-naive children newly diagnosed with HIV-1 in Manaus, Amazonas," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, no. 6, pp. 1774-1783, 2017.
- [32] A. C. P. Vicente, K. Otsuki, N. B. Silva et al., "The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F," *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, vol. 23, no. 4, pp. 327-331, 2000.
- [33] M. G. Morgado, M. L. Guimarães, C. B. G. Gripp 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," *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, vol. 18, no. 5, pp. 488-494, 1998.
- [34] V. F. Pimentel, M. G. Morgado, G. Bello et al., "Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de Janeiro, Brazil," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 29, no. 12, pp. 1553-1561, 2013.
- [35] K. E. Potts, M. L. Kalish, T. Lott et al., "Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil," *AIDS*, vol. 7, no. 9, pp. 1191-1198, 1993.
- [36] M. G. MORGADO, E. C. SABINO, E. G. SHPAER et al., "V3 region polymorphisms in HIV-1 from Brazil: prevalence of subtype B strains divergent from North American/European prototype and detection of subtype F," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 10, no. 5, pp. 569-576, 1994.
- [37] D. M. Junqueira, R. M. de Medeiros, T. C. N. Ferreira Leite et al., "Detection of the B⁶-GWGR variant in the southernmost region of Brazil: unveiling the complexity of the human immunodeficiency virus-1 subtype B epidemic," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 108, no. 6, pp. 735-740, 2013.

- [38] R. S. Diaz, L. A. Inocência, M. C. A. Sucupira et al., "The virological and immunological characteristics of the HIV-1-infected population in Brazil: from initial diagnosis to impact of antiretroviral use," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, p. e0139677, 2015.
- [39] M. Mild, A. Kvist, J. Esbjörnsson, I. Karlsson, E. M. Fenyö, and P. Medstrand Patrik, "Differences in molecular evolution between switch (R5 to R5X4/X4-tropic) and non-switch (R5-tropic only) HIV-1 populations during infection," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 10, no. 3, pp. 356–364, 2010.
- [40] C. Tscherning, A. Alaeus, R. Fredriksson et al., "Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1," *Virology*, vol. 241, no. 2, pp. 181–188, 1998.
- [41] I. Bon, A. Clò, M. Borderi et al., "Prevalence of R5 strains in multi-treated HIV subjects and impact of new regimens including maraviroc in a selected group of patients with CCR5-tropic HIV-1 infection," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 17, no. 10, pp. e875–e882, 2013.
- [42] H. Duani, A. W. Aleixo, and U. Tupinambás, "Trends and predictors of HIV-1 acquired drug resistance in Minas Gerais, Brazil: 2002–2012," *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, vol. 21, no. 2, pp. 148–154, 2017.
- [43] P. R. Harrigan, C. Stone, P. Griffin et al., "Resistance profile of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase inhibitor abacavir (1592U89) after monotherapy and combination therapy," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 181, no. 3, pp. 912–920, 2000.
- [44] L. Bachelier, S. Jeffrey, G. Hanna et al., "Genotypic correlates of phenotypic resistance to efavirenz in virus isolates from patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor therapy," *Journal of Virology*, vol. 75, no. 11, pp. 4999–5008, 2001.
- [45] G. L. Melikian, S. Y. Rhee, V. Varghese et al., "Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 69, no. 1, pp. 12–20, 2014.
- [46] J. V. Madruga, P. Cahn, B. Grinsztejn et al., "Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *Lancet*, vol. 370, no. 9581, pp. 29–38, 2007.
- [47] M. W. Tang and R. W. Shafer, "HIV-1 Antiretroviral Resistance," *Drugs*, vol. 72, no. 9, pp. e1–e25, 2012.
- [48] S. Y. Rhee, J. L. Blanco, M. R. Jordan et al., "Geographic and temporal trends in the molecular epidemiology and genetic mechanisms of transmitted HIV-1 drug resistance: an individual-patient- and sequence-level meta-analysis," *PLoS Medicine*, vol. 12, no. 4, 2015.
- [49] R. K. Gupta, M. R. Jordan, B. J. Sultan et al., "Global trends in antiretroviral resistance in treatment-naïve individuals with HIV after rollout of antiretroviral treatment in resource-limited settings: a global collaborative study and meta-regression analysis," *The Lancet*, vol. 380, no. 9849, pp. 1250–1258, 2012.
- [50] A. M. Wensing, V. Calvez, F. Ceccherini-Silberstein et al., "2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1," *Topics in antiviral medicine*, vol. 27, no. 3, pp. 111–121, 2019.
- [51] P. Cahn, A. L. Pozniak, H. Mingrone et al., "Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study," *The Lancet*, vol. 382, no. 9893, pp. 700–708, 2013.
- [52] A. De Luca, Z. J. Sidumo, G. Zanelli et al., "Accumulation of HIV-1 drug resistance in patients on a standard thymidine analogue-based first line antiretroviral therapy after virological failure: implications for the activity of next-line regimens from a longitudinal study in Mozambique," *BMC Infectious Diseases*, vol. 17, no. 1, 2017.
- [53] C. M. Venner, I. Nankya, F. Kyeyune et al., "Infecting HIV-1 subtype predicts disease progression in women of sub-Saharan Africa," *eBioMedicine*, vol. 13, pp. 305–314, 2016.
- [54] N. Kiwanuka, O. Laeyendecker, M. Robb et al., "Effect of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 197, no. 5, pp. 707–713, 2008.
- [55] V. Novitsky, C. W. Wester, V. DeGruttola et al., "The reverse transcriptase 67N 70R 215Y genotype is the predominant TAM pathway associated with virologic failure among HIV type 1C-infected adults treated with ZDV/ddI-containing HAART in southern Africa," *AIDS Research and Human Retroviruses*, vol. 23, no. 7, pp. 868–878, 2007.
- [56] A. G. Marcelin, C. Delaugerre, M. Wirlden et al., "Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure," *Journal of Medical Virology*, vol. 72, no. 1, pp. 162–165, 2004.
- [57] G. J. Hanna, V. A. Johnson, D. R. Kuritzkes et al., "Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 181, no. 3, pp. 904–911, 2000.