

VICTOR FIGUEIREDO PIMENTEL

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV INTER E INTRA-HOSPEDEIRO
EM PACIENTES SOROCONVERTORES RECENTES**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Charlotte Marianna Hársi Domotor

Co-orientador: Dr. Luís Fernando de Macedo Brígido

Versão original

São Paulo
2016

RESUMO

Pimentel, VF. Estudo da diversidade genética do HIV inter e intra-hospedeiro em pacientes sorosconvertidos recentes. [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A epidemia de HIV-1 está mudando em São Paulo, com uma crescente preocupação no número de jovens de homens que fazem sexo com homens (HSH). A epidemia é dominada pelos subtipos B, F1, porém tem aumentado a prevalência do subtipo C. O objetivo do estudo foi identificar e caracterizar as redes de transmissão em São Paulo, comparando entre os subtipos epidêmicos, fatores de risco e exposição à terapia antirretroviral.

Nós compilamos dados clínicos, epidemiológicos e as sequências virais dos indivíduos acompanhados no Instituto Adolfo Lutz de Jan 2004 a fev de 2015. Após o controle de qualidade, 2.260 sequências parciais do gene *pol* foram subtipadas previamente como B, C e F1 e então incluídas no estudo. 2.107 sequências únicas controle foram selecionadas pelo blast contra as nossas sequências no banco de dados de Los Alamos e banco de dados de Portugal. Todas as sequências foram investigadas para a identificação de mutação de resistência (TDRM). Árvores filogenéticas foram construídas em RaxML para cada subtipo. Nós usamos Cluster Picker para análise da dinâmica de transmissão de acordo com os parâmetros de distância genética e *bootstrap*. Análises estatísticas foram utilizadas para identificar possíveis correlações dos clusters.

414 (18,3%) da nossa população foi incluída em cluster (2-12 indivíduos). A taxa de cluster não diferiu entre B e F1, no entanto as sequências do subtipo C se agruparam duas vezes mais ($p < 0.001$). Mais clusters foram identificados entre a população HSH quando comparada a de heterossexuais independente do subtipo ($p < 0.001$). A taxa de TDRM foi maior em cluster que fora de cluster nos subtipos B e F1 ($p < 0.001$ e $p = 0.009$), respectivamente. Apesar do alto número de clusters no subtipo C verificamos baixa prevalência de TDRM. Os indivíduos que estavam em clusters eram 5 anos mais jovens que os de fora de cluster nos subtipos B e C ($p < 0.001$ e 0.02 , respectivamente).

Nossos resultados indicam que, independente do subtipo, a epidemia de HIV-1 em São Paulo é auto-sustentada pelos pacientes HSH virgens de tratamento. O subtipo C apresentou maior proporção de clusters. No entanto, mais análises são necessárias para clarificar se isto implica em alta taxa de transmissão do subtipo em São Paulo.

Palavras-chave: HIV-1. Redes de transmissão. Diversidade genética.

ABSTRACT

Pimentel, VF. Study of genetic diversity of HIV inter and intra-host in recent infected patients. [Ph.D thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The HIV-1 epidemic in Sao Paulo is changing, with a worrying increase in the number of new infections in young men and in the Men who have Sex with Men (MSM). The epidemic is dominated by subtypes B and F1, but there's been a recent increase in the prevalence of subtype C. The aim of this study was to identify and characterize HIV-1 transmission networks in Sao Paulo, comparing across subtype epidemics, risk factors, and HAART exposure therapy.

We gathered epidemiological, clinical and viral sequence data from HIV-1 infected individuals followed in Adolfo Lutz Institute/SP-BR from Jan 2004 through Feb 2015. After quality control, 2,260 sequences of the partial *pol* gene were subtyped as previously reported as B, C and F1 were included on this study. 2,107 unique background control sequences were selected by blasting our sequences against Los Alamos database and the Portuguese HIV-1 database. The dataset was screened for Drug Resistance Mutations to identify transmitted drug resistance mutations (TDRM). Maximum-Likelihood phylogenetic trees were built in RaxML for each subtype separately. We used Cluster Picker to analyze transmission dynamics according the thresholds: genetic distance (0.06) and bootstrap over 90%. Statistical analyzes were performed to identify possible correlates of clustering. Categorical variables were compared using Chi-square or Fisher's exact test and quantitative variables were analyzed using Mann-Whitney test (SPSS).

414 (18,3%) of our population were included in clusters (range: 2-12 individuals). The rate of clustering did not differ between subtypes B and F, however more subtype C sequences (40%) significantly clustered together ($p < 0.001$). Furthermore, more clusters were significantly found in the MSM group when compared to heterosexuals for all subtypes, ($p < 0.001$). Also, drug naïve patients were more likely to be in clusters when compared to treated patients in all subtypes ($p < 0.001$). TDRM were more prevalent in clustering than in non-clustering in subtypes B ($p < 0.001$) and F1 ($p = 0.009$), and more related to MSM group. Despite the higher number of clusters, subtype C presented a lower prevalence of TDRM, although without significant difference between cluster and non-cluster. Clustering individuals were also 5 years younger than non-clustering individuals for subtypes B and C ($p < 0.001$ and 0.02, respectively).

Our results indicate that, regardless of subtype, the HIV-1 epidemic in Sao Paulo is self-sustained by treatment-naïve MSM patients, who transmit the infection before starting treatment. Subtype C presents a higher proportion of patients that cluster together. However, further analyses are necessary to clarify whether this implies a higher transmission rate of this subtype in Sao Paulo.

Keywords: HIV-1. Transmission network. Genetic Diversity.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

O vírus da Imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids) [1]. Passadas três décadas da identificação da Aids, a pandemia causada por este vírus tornou-se uma das mais devastadoras da história da humanidade e está mais estreitamente relacionada a populações economicamente ativas, o que leva a grandes problemas socioeconômicos em países emergentes [2].

Com base nos dados da UNAIDS estima-se que vivam no mundo cerca de 36,7 milhões de adultos e crianças infectados pelo HIV (Figura 1), deste conjunto, 2,1 milhões de novos casos foram descritos em 2015. O número de pessoas que morreram em consequência da Aids neste ano foi de 1.1 milhões de pessoas no mundo, o que aponta um decréscimo quando comparados aos dados de 2009, onde se estimou 1,8 milhões de mortes relacionadas à Aids. Este fato associa-se à maior disponibilidade de terapia antirretroviral e ao melhor suporte às pessoas infectadas com o HIV em países de média e baixa renda [3]. Com a intensificação dos programas de prevenção da Aids e o comportamento mais consciente por parte da população, a prevalência e incidência dos casos de HIV/AIDS nos últimos anos tenderam a se estabilizar, não obstante, um aumento do número de casos reflexo da alta densidade demográfica mundial e da melhora da expectativa de vida por em função da terapia antirretroviral também tem sido observado [3].

Ao longo de mais de três décadas de convívio com a infecção pelo HIV, constataram-se mudanças importantes no perfil epidemiológico da Aids. Nos primeiros anos da epidemia a maioria dos casos estava relacionada com determinados comportamentos/situações de risco tais como: homo/bissexuais masculinos, hemofílicos/receptores de sangue e usuários de drogas injetáveis.

Com o passar do tempo a disseminação da infecção pelo HIV alcançou outros segmentos da população através da transmissão heterossexual, a qual tem sido responsável pelo aumento no número de casos de Aids em mulheres e consequentemente em crianças [3]. Com base nos dados publicados pelo último boletim epidemiológico da UNAIDS, salienta-se que a África Subsaariana, epicentro da epidemia de Aids, concentra o maior número de casos de adultos e crianças infectados pelo HIV: cerca de 19,0 milhões, dos quais 960.000 são casos de pessoas recentemente infectadas, dentre eles, adultos e crianças [3].

Do total de pessoas infectadas, mais de 50% são mulheres, o que acarreta no número acentuado de crianças que contraíram o vírus por transmissão vertical nesta região.

Do total estimado de 36,7 milhões de pessoas vivendo com HIV no mundo, cerca de 2 milhões encontram-se nas Américas do Sul e Central (Figura 1), dos quais 100.000 adultos e crianças que foram recentemente infectados. Aproximadamente 50.000 pessoas morreram devido a AIDS em 2015 na América Latina [3].

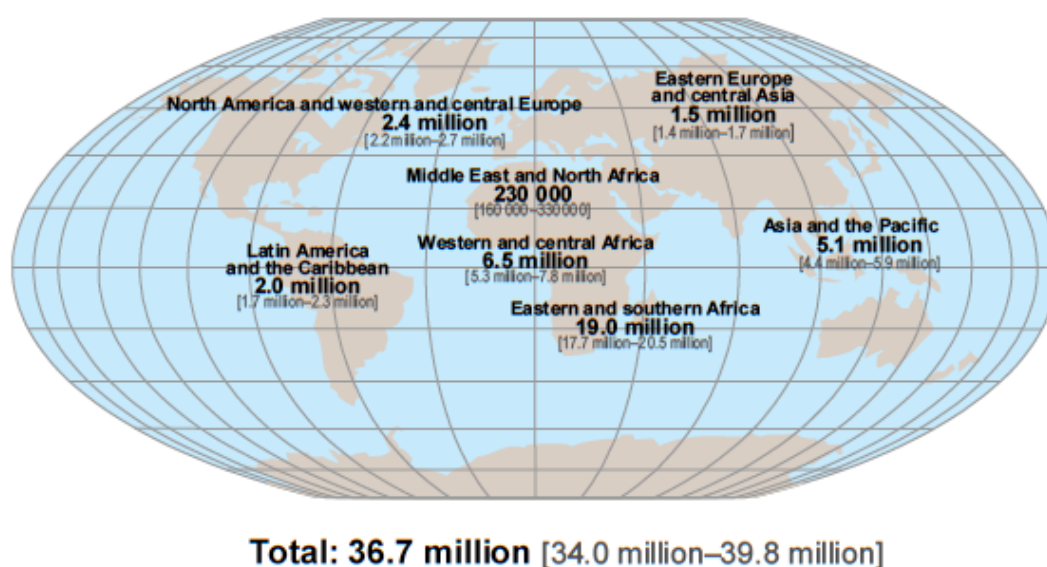


Figura 1 - Estimativa do número de adultos e crianças portadoras do HIV/AIDS, 2016. Fonte: [1]

Do total de casos notificados de pessoas portadoras do HIV na América do Sul, grande parte concentra-se no Brasil, devido a sua dimensão territorial e ao contingente populacional.

As políticas de prevenção à Aids, tais como, as campanhas de conscientização da população quanto aos riscos de contaminação, a distribuição gratuita de preservativos, seringas e agulhas, assim como as políticas de tratamento, que torna universal o acesso aos antirretrovirais, reduzindo assim diretamente as taxas de transmissão vertical e indiretamente as taxas de transmissão em consequência de um maior controle da carga viral, desde o início dos anos noventa contribuem para a contenção da epidemia no Brasil.

De acordo com o último Boletim epidemiológico, com dados da epidemia brasileira de 1980 a junho de 2015, foram notificados 798.366 casos acumulados de Aids em todo o país.

A taxa de incidência vem apresentando tendência à estabilização, em patamares elevados nos últimos anos e, em 2014, atingiu 20,5 por 100.000 habitantes. Contudo, os dados

indicam expressivas diferenças regionais, com declínio da taxa de incidência nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e aumento nas regiões Norte, Nordeste e Sul no período de 2005 a 2014. Na série histórica de 1980 até junho de 2015, foram identificados no Brasil 519.183 casos de Aids. A razão entre o número de casos segundo o sexo, masculino : feminino (M:F) sofreu significativa redução do início da epidemia até os dias atuais. Em 1986, a razão M:F era de 15,1:1 e, a partir de 2002, estabilizou-se em 1,5:1 [4]. No entanto, a partir de 2009, observou-se uma redução no número de casos em mulheres e um aumento entre os homens, refletindo na razão de sexos que passou a ser de 19:10 [5].

No Estado de São Paulo, onde se concentra a maior parte da epidemia nacional, (33% dos casos do país), foram registrados 228.698 casos de Aids até junho de 2013, e 103.267 óbitos por Aids. Estima-se, aproximadamente, 132.000 o número de portadores do HIV com idade entre 15-49 anos no estado [6]. Nestes 30 anos, a epidemia de HIV/Aids manteve-se concentrada nas grandes áreas metropolitanas, em adultos jovens, em especial nos grupos mais vulneráveis à infecção, tais como: Homens que fazem sexo com homens (HSH), profissionais do sexo e usuários de drogas ilícitas [6].

1.2 AGENTE ETIOLOGICO DA AIDS

O HIV é um retrovírus, que pertence à família *Retroviridae*, vírus com genoma RNA que possui seu genoma proviral reversamente transcrito pela transcriptase reversa, e ao gênero *Lentivirus*, que tem como importante característica o longo período de incubação entre a infecção e o início das manifestações clínicas, além de danos progressivos no sistema imune de seu hospedeiro.

Tanto o HIV-1 quanto o HIV-2 estão relacionados filogeneticamente a certos vírus de macacos africanos, isto é, aos Vírus da Imunodeficiência Símia (SIVs), com os quais apresentam uma similaridade na organização do genoma viral, coincidências geográficas e rotas de transmissão plausíveis reforçam a transmissão zoonótica destes lentivírus de primatas não humanos para os humanos [7].

Na tentativa de compreender melhor a origem do HIV-1, Gao e colaboradores em 1999 [7] analisaram a filogenia dos isolados de SIV conhecidos e identificaram duas linhagens principais e divergentes que infectam duas subespécies de chimpanzés, uma da África Central: *Pan troglodytes troglodytes*, e outra da África Oriental: *Pan troglodytes schweinfurthii*. Apenas a linhagem que infecta *Pan troglodytes troglodytes* mostrou-se estar

relacionada com o HIV-1 e parece ter originado as linhagens do grupo M e N. Outra forte evidência é que esta variante foi encontrada na mesma área geográfica da África onde podem ser encontrados todos os grupos do HIV-1 e seus subtipos. Assim, o chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* é considerado o reservatório primário do HIV-1[8].

1.3 PARTICULA VIRAL

A partícula viral madura e infecciosa do HIV (Figura 2) tem simetria icosaédrica e diâmetro de aproximadamente 125 nm. Externamente o HIV apresenta um envoltório de natureza bioquímica fosfolipídica derivada da célula hospedeira [9], onde são ancoradas as glicoproteínas de superfície e transmembranar (*gp120* e *gp41*) [9]. Internamente, uma matriz protéica (p17) envolve o capsídeo viral (p24). É nesta estrutura que encontramos o genoma diplóide do HIV que consiste de duas fitas simples de RNA similares, ambos de polaridade positiva, que interagem com as três enzimas virais (protease, transcriptase reversa e integrase) [10,11].

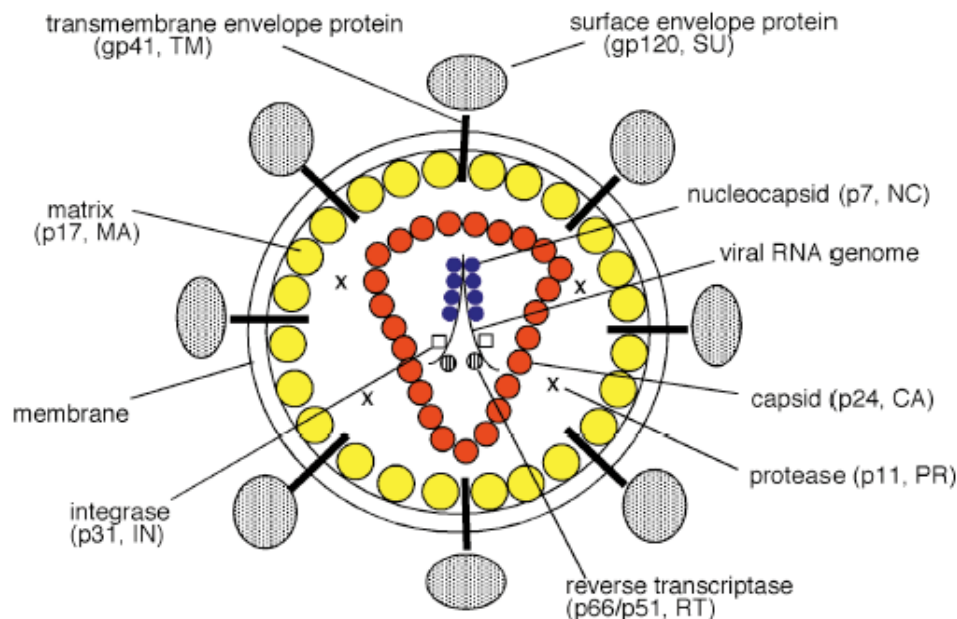


Figura 2 - Representação esquemática da partícula viral do HIV. Em destaque as proteínas estruturais, enzimas virais e genoma de RNA fita simples. Fonte [12].

1.4 ESTRUTURA GENÔMICA

Em adição aos genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), o HIV contém 4 genes acessórios (*vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*) e dois genes regulatórios (*tat* e *rev*), cujos produtos são responsáveis por estabelecer sofisticadas interações entre o vírus e o hospedeiro. [13] (figura 3).

Como característica do DNA retroviral encontram-se nas porções terminais as LTRs (*Long Terminal Repeats*), que nada mais são que várias centenas de nucleotídeos (300-1800pb) composta de U3-R-U5 (5'- 3') Todos os sinais para expressão dos genes são encontrados nas LTR (promotor, iniciação de transcrição, terminador de transcrição e sinal de poliadenilação). Alguns sinais regulatórios da transcrição estão contidos na região U3 da 5' LTR e a região TATAA *Box* localiza-se a cerca de 25pb a partir do início da região R. A LTR 3' normalmente não é funcional como promotor, embora tenha a mesma sequência que a 5' LTR. Em vez disso, age na terminação da transcrição e poliadenilação, entretanto, quando a integridade da 5' LTR é comprometida, a 3' LTR funcione como promotor [14].

O primeiro gene localizado no terminal 5' do genoma do HIV é o gene *gag*. As proteínas formadas a partir de *gag*, são sintetizadas na forma de um precursor poliprotéico, que foi nomeado com base na massa molecular deste polipeptídeo, Pr55^{gag}. Logo após o brotamento da partícula viral, a protease do HIV-1 cliva Pr55^{Gag} em quatro proteínas de Gag maduras p17 (proteína de matriz, MA), p24 (proteína de capsídeo CA), p7 (proteína de nucleocapsídeo, NC) e p6, além de dois pepitídeos espaçadores p1 e p2 [12]. Durante a tradução de *gag* pode ocorrer um deslizamento do ribossomo na região p1, graças à presença de uma região rica em "U", levando à mudança na fase de leitura [15], gerando um precursor maior P160^{gag-pol}, este quando clivado proteoliticamente, gera as proteínas de *gag* e *pol*.

O *pol* é o segundo gene na organização genômica do HIV sendo o responsável por codificar as três enzimas do HIV: protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN), tendo os seus produtos derivados do precursor P160^{gag-pol} [14].

Das enzimas oriundas do gene da polimerase, a protease do HIV-1, é a responsável pelo processamento pós traducional das poliproteínas viral Gag (p24, p17 e p7) e Gag-pol (funcionalidade das enzimas RT e IN), transformando o vírus maduro [14–16]. A transcriptase reversa (RT) do HIV é capaz de converter o seu genoma de fita simples de RNA em uma dupla fita de DNA viral. A RT do HIV apresenta três atividades fundamentais: a DNA polimerase dependente de RNA, sintetizando a fita de DNA negativo, a atividade RNase H, utilizada para degradação do RNA viral, e a atividade de DNA polimerase

dependente de DNA, gerando a fita positiva de DNA [17]. A integrase é enzima necessária para que o DNA viral seja inserido no genoma da célula hospedeira humana, processo indispensável para que o vírus possa utilizar o maquinário celular para produzir novos vírions. [14].

O gene *env* é o responsável por codificar as proteínas do envelope viral, o qual tem o seu precursor gp160, clivado por enzimas celulares e em *gp120* e *gp41*, proteínas de superfície e transmembranar, respectivamente. É na *gp120* que são encontrados os sítios de ligação para os receptores celulares e, portanto, importantes domínios a serem neutralizados com a finalidade de se interromper o ciclo viral [16]. Estas duas proteínas são fundamentais nas etapas de adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira [18]. A partir do sequenciamento genético do gene *env* foi possível analisar e prever as estruturas secundárias, as quais definem importantes epítomos com papel de interação na resposta imune humoral e celular [19]

O gene *tat* (transativador da transcrição) é uma proteína multifuncional que contribui de maneira crítica na replicação do HIV-1. Tat é uma proteína transativadora robusta que induz uma variedade de efeitos, alterando os níveis de expressão de genes celulares e viral. Entre as funções de Tat destacam-se: super-expressão de citocinas, co-receptor CCR5 e receptor (CD25) de inter-leucina-2 [20–22], bem como a supressão do gene de MHC de classe I [23]

O gene que se sobrepõem a *tat* com fase +1 de leitura e codificando uma proteína de 116 aminoácidos é chamada de Rev e tem a função de regulação da expressão de proteínas do HIV pelo controle na exportação e de mRNA do núcleo para o citoplasma [14,24].

O gene *vif* (fator de infectividade do vírus) codifica uma proteína citoplasmática de 23 kD cuja função é aumentar significativamente a infecciosidade do vírion. A proteína é encontrada no interior das células infectadas pelo HIV, e a mesma atua interferindo no papel de uma proteína de restrição celular chamada APOBEC3G. Vif induz a célula a degradar a proteína APOBEC3G. Estudos *in vitro* mostraram que a construção de partículas virais sem o gene *vif* (delta *vif*) comprometiam o potencial desses vírus em infectar novas células [25–27].

O gene *vpr* codifica a proteína viral R com tamanho aproximado de 15 kD. Dentre as inúmeras funções conhecidas, esta acelera a expressão de proteínas do HIV, carrega "os sinais de localização nuclear" (seqüências de aminoácidos nas proteínas que são reconhecidas pela maquinaria celular, indicando que ela deve ser transportado para o núcleo)

e, em certo sentido, imita o comportamento de uma proteína chamada *beta* importina [28], Interrompe o ciclo celular na fase G2/M, que parece ser o cenário confortável para a replicação viral [29].

O gene *vpu* que codifica a proteína integral de membrana (proteína viral U) que tem como principais funções, auxiliar na montagem de novas partículas virais, no brotamento da partícula viral da célula hospedeira e na degradação das moléculas CD4 que ficam na superfície das células infectadas diminuindo o risco de superinfecção [30].

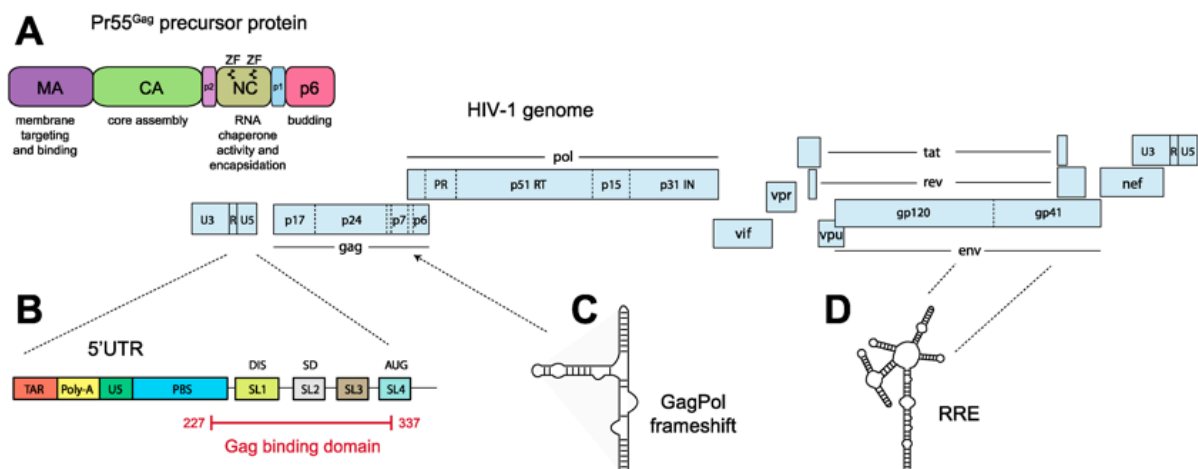


Figura 3 - Representação esquemática da estrutura linear proviral de HIV-1. Fonte: [31]

1.5 CICLO REPLICATIVO DO HIV

A infecção viral inicia-se quando a proteína gp120 do envelope viral, liga-se ao receptor CD4 da superfície celular na célula susceptível possibilitando a interação da gp120 ao correceptor celular CCR5/CXCR4. Após a interação com o co-receptor, e modificação conformacional de gp120, peptídeos hidrofóbicos da gp41 (peptídeo de fusão) são expostos e imediatamente inseridos na membrana da célula alvo. As regiões C- e N-terminal (HR1 e HR2) promovem a aproximação e contato entre a membrana celular e envoltório viral, formação de poros de fusão e liberação do capsídeo no citoplasma da célula hospedeira [16,32].

A transcrição reversa do RNA viral inicia-se a partir da ligação de um iniciador de tRNA complementar a um sítio próximo à extremidade 5' do RNA viral. A partir deste iniciador, a enzima transcriptase reversa sintetiza um segmento de DNA, complementar ao RNA, na direção 5'. Este segmento de DNA sintetizado é translocado para o término 3' da

molécula, para completar a síntese da fita de DNA. Concomitantemente a enzima RNase H é necessária para degradar o RNA do híbrido DNA-RNA. A síntese da fita de DNA complementar é realizada pela atividade DNA-polimerase RNA dependente da transcriptase reversa (RT).

O DNA viral dupla fita recém sintetizado é translocado para o núcleo celular a partir do complexo pré-integração. Uma vez no núcleo o DNA viral é integrado ao genoma celular através da ação da integrase (IN) [33]. Após a integração, o DNA viral agora denominado provírus, funciona como molde para a síntese das proteínas virais pela RNA polimerase II do hospedeiro quando a célula infectada for ativada.

Os mRNAs retrovirais são sintetizados, processados e então transportados para o citoplasma, onde são traduzidos para produzir as proteínas virais. As proteínas que formam o core viral, isto é produtos dos genes *gag* e *pol*, inicialmente montadas dentro de um nucleocapsídeo imaturo juntos com duas cópias do genoma completo de RNA viral. Como essas estruturas brotam da membrana plasmática da célula, eles se tornam envolvidos pela membrana plasmática da célula hospedeira albergando as glicoproteínas do envelope. Coincidente com o brotamento, a terceira enzima viral protease (PT) cliva as proteínas do core em suas formas finais. Tornando o vírus maduro e infeccioso [14,34–36].

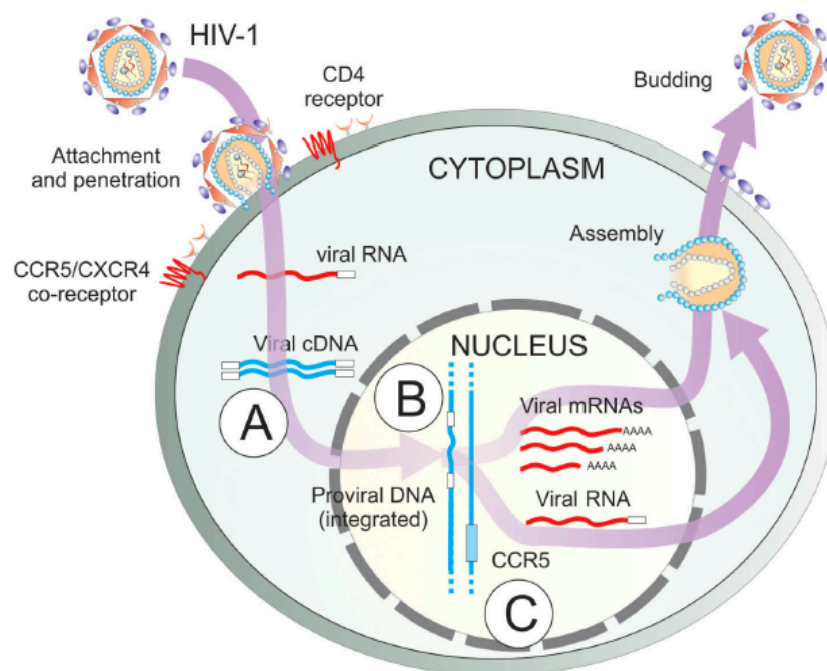


Figura 4 - Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV-1. A= retrotranscrição do RNA viral, B = integração do genoma viral e C = síntese dos transcritos virais. Fonte: [36].

1.6 TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

É sabido que a terapia antirretroviral de alta potência, denominada TARV, é um dos grandes ganhos no combate à Aids. Um dos principais objetivos é reduzir os níveis de carga viral ao indetectável, tornando o sistema imune menos vulnerável às doenças oportunistas, reduzir a mortalidade associada à Aids, além de reduzir drasticamente a disseminação viral para outros indivíduos susceptíveis [37].

Até os dias de hoje um arsenal de 27 drogas foram aprovadas e disponíveis pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) para tratamento da infecção pelo HIV. Essas drogas são distribuídas em 6 classes, segundo os seus mecanismos moleculares e perfil de resistência [38,39]:

- (a) inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (INRTs);
- (b) inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (INNRTs);
- (c) inibidores da integrase (INs);
- (d) inibidores de protease (IPs);
- (e) Inibidores de fusão;
- (f) Antagonistas de co-receptor/inibidores de entrada.

Os análogos de nucleosídeos, INRTs, formam a primeira classe de drogas a ser aprovada pelo FDA [40]. São administrados como pró-drogas, os quais requerem fosforilação ao entrarem na célula por quinases celulares [41]. A ausência do grupo hidroxil na porção 3' do açúcar (2'-desoxiribosil) meio pelo qual os INTRs impede a formação de uma ligação fosfodiéster 3'-5' entre os INTRs e o próximo 5' trifosfato nucleotídeo, resultando na terminação da cadeia crescente de DNA [42]. Atualmente, existem 8 INTRs disponíveis e aprovadas pelo FDA.

Os inibidores da transcriptase, não nucleosídeos, INNRTs, inibem a RT do HIV-1 pela ligação e indução de uma bolsa hidrofóbica proximal, mas não sobreposta ao sítio catalítico da enzima. A ligação do INNRTs muda a conformação espacial do sítio de ligação ao substrato e reduz a atividade da polimerase [43,44].

A integrase foi a mais recente enzima do HIV-1 com sucesso a ser alvo terapêutico [45,46]. Raltegravir (RAL) foi a primeira droga inibidora da integrase a ser licenciada em 2007 [47]. Sua ação inibitória dar-se de duas formas: ligando-se apenas ao específico

complexo entre a integrase e o DNA viral e interagindo com o cofator íon magnésio no sítio ativo da integrase. Atualmente, existem 3 drogas disponíveis e aprovadas [48].

Em 1995, o primeiro IP foi aprovado. A protease é responsável pela clivagem das proteínas precursoras de gag e gag-pol durante a maturação viral. Os IPS atuam ligando-se ao sítio ativo da protease, impedindo a clivagem dos precursores e como consequência a maturação da partícula viral [49].

Os inibidores de fusão foram desenhados baseados na descoberta de dois domínios homólogos da proteína viral gp41 que devem interagir um com o outro para promover a fusão, e essa imitação de um desses domínios pela proteína heteróloga pode se ligar e interromper as interações da proteína viral [49].

O antagonista de CCR5 opera pela ligação à proteína de superfície de células da imunidade. Uma vez estabelecida essa ligação, certas variantes do HIV-1, chamadas R5 trópicas não podem se ligar ao correceptor, e portanto, não conseguem entrar na célula susceptível [41,49].

Tal como acontece com todas as terapias antirretrovirais, o tratamento com qualquer um destes agentes muitas vezes resulta no aparecimento de variantes de HIV-1 com reduzida sensibilidade às drogas. Os mecanismos de resistência associados à classe INRTs são mediados pelos (1) mecanismo ATP-dependente da pirofosforilase, que é a remoção do INRT da extremidade 3' da cadeia nascente e o aumento da discriminação entre o substrato nativo de desoxiribonucleotídeo e o inibidor [50].

A resistência aos INNRTs geralmente resulta da substituição de aminoácidos tais como L100, K101, K103, E138, V179 e Y188 na bolsa de ligação dos inibidores a RT [51,52].

A resistência aos inibidores de integrase quase sempre estão associados aos resíduos de aminoácidos que coordenam os co-fatores de magnésio essenciais. Em estudos clínicos, a resistência ao raltegravir está associada a um conjunto de quatro mutações independentes no gene da integrase (Y143, N155, 121 ou Q148) [53–55].

Todos os IPs compartilham relativamente uma estrutura química semelhante, assim, resistência cruzada é comumente observada. Para a maioria dos IPs, mutação de resistência primária agrupadas próximas ao sítio ativo da enzima, na posição localizada no sítio de ligação do substrato/inibidor (D30N, G48V, I50V, V82A ou I84V, entre outros) [56,57].

1.7 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1

A infecção primária ou fase aguda é geralmente assintomática e é caracterizada pelo sequencial aparecimento de marcadores viral e anticorpos no sangue. Atualmente, testes de quarta-geração mais sensíveis são capazes de detectar precocemente tanto antígenos virais quanto os anticorpos e reduzem o período de janela imunológica por volta de 5 dias [58,59].

Clinicamente as manifestações são vagas e inespecíficas tais como: febre, linfadenopatia, cefaleia, mialgia, náuseas, diarreia e exantema. A fase aguda é limitada, rápida e a sua severidade está associada à progressão rápida da doença. Reagentes de fase aguda incluem elevados níveis de proteína amiloide A sérica (3 a 5 dias após infecção). Os níveis de carga viral aumentam coincidem com a explosão de citocinas inflamatórias. A resposta de células T CD8⁺ leva ao aparecimento de mutantes de escape. Complexos imunes de anticorpos, precedem os primeiros anticorpos livres da gp41. Anticorpos espécie-específicos que neutralizam o vírus não aparecem até o octogésimo dia de infecção [60–62].

Com o fim da fase aguda, o paciente entra na fase crônica da infecção assintomática, conhecida como fase de latência clínica. Esta fase pode durar de meses a anos, com progressiva destruição de células da imunidade (linfócitos T CD4⁺, macrófagos e células dendríticas). Uma vez que o estado imunológico do indivíduo infectado se torna crítico, com contagem de T CD4⁺ inferior a 200 cel/mm³ emergem as doenças definidoras de Aids [63]. A Figura 5 resume a infecção natural pelo HIV-1.

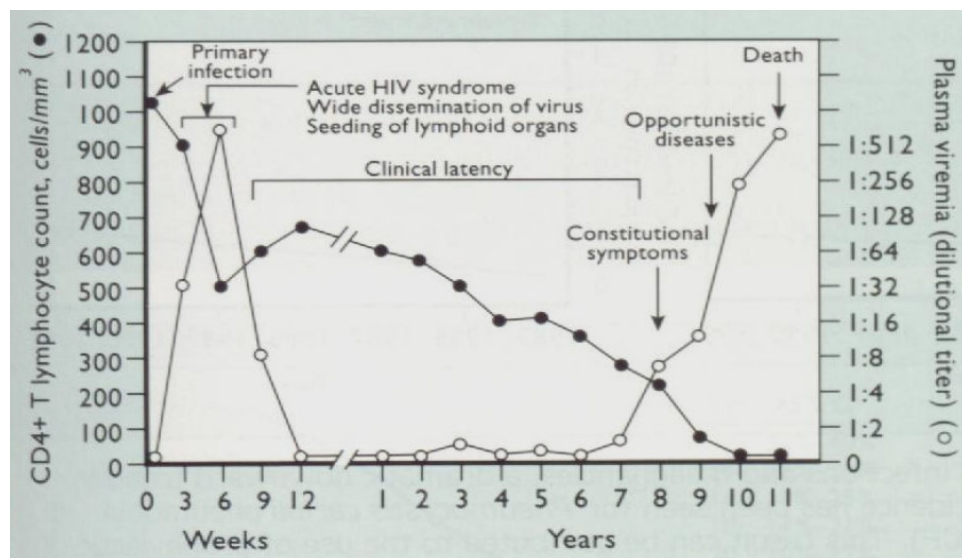


Figura 5 - História natural da infecção pelo HIV-1. Fonte: [64].

1.8 DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

O HIV se caracteriza por um enorme polimorfismo genético. Inicialmente as variantes do vírus eram identificadas como americanas ou africanas de acordo com o seu local de origem. Mais recentemente fez-se necessária a classificação baseada nas relações filogenéticas de genomas completo, em grupos, subtipos, sub-subtipos, formas recombinantes circulantes (CRFs) e de formas recombinantes únicas (URFs) [65]. O HIV-1 é classificado filogeneticamente em quatro grupos M, N, O e P, refletindo separadas introduções do vírus da imunodeficiência símia (SIVs) de primatas não humanos para os seres humanos [8]. Destes, apenas o grupo M sofreu uma disseminação pandêmica. Fatores virais e dos hospedeiros, poderiam ter influenciados na relativa transmissibilidade dos diferentes grupos de HIV-1 [8]. Modelagem matemática de vírus sugerem que o grupo M tenham sofrido diversificação entre 1910-1930 [66,67], seguido pela disseminação endêmica do vírus na população humana na África centro-ocidental.

O grupo M é o mais representativo sendo dividido em nove subtipos A, B, C, D, F, G, H, J, K [65]. As variantes dos subtipos A e F podem ainda ser classificadas em sub-subtipos [A1-A5] e [F1-F2] [7,68,69]. A Figura 6 apresenta de forma esquemática a classificação do HIV.

Eventos de recombinação são comuns em áreas onde existe uma co-circulação de subtipos gerando linhagens mosaicas as quais são responsáveis por 10-20% de novas sequências geradas. Dois tipos de genomas mosaicos podem ser gerados. As formas recombinantes circulantes (CRFs), quando identificadas em pelo menos três indivíduos HIV infectados sem vínculo epidemiológico direto e que apresentam os mesmos pontos de recombinação ao longo do genoma, estas geralmente apresentam importância epidemiológica e as formas recombinantes únicas (URFs).

Atualmente 79 formas recombinantes circulantes foram descritas [70]. Além deste conjunto, existem as formas recombinantes únicas (URFs) que são formas recombinantes entre os subtipos, mas que são encontradas em apenas um indivíduo infectado. Centenas de URFs foram encontradas com base na análise parcial das sequências do genoma e algumas possuem análise completa do genoma, porém o seu potencial de propagação epidêmico é pouco conhecido [71,72]

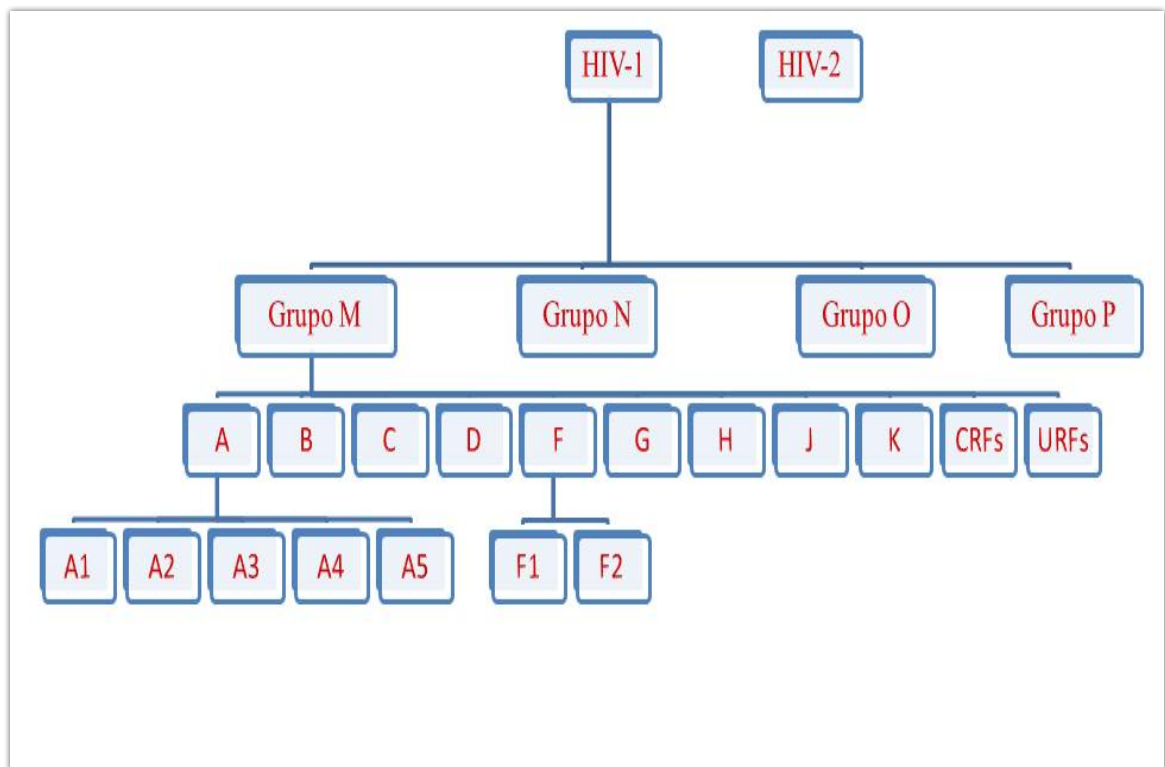


Figura 6 - Classificação atual do HIV. Fonte: adaptado de [65].

A notável variabilidade genética dentro e entre os subtipos do grupo M de HIV-1, pode alcançar 25%-35% no gene *env*, sendo possível um controle preciso da transmissão dos HIV-1 entre populações numa escala global [73], e entre indivíduos numa micro escala [74].

A vigilância global da distribuição dos subtipos e formas recombinantes circulantes (CRFs), revelou em 2011 que o subtipo C representa por volta de 50% do total dos infectados no mundo inteiro e os subtipos A, B, D e G correspondem a 12%, 10%, 3% e 6%, respectivamente, e os subtipos F, H, J e K juntos correspondem a 1% dos casos [75].

Na América do Sul, responsável por 4% das infecções neste continente, o subtipo prevalente é o B, que representa mais de 70% dos casos. Os subtipos F1, C e recombinantes BF1 são também encontrados nessa região [76]. O subtipo F1 está presente em grande parte dos países do cone sul, tendo como maior destaque o Brasil [77,78], Argentina [79], Bolívia [80] e Uruguai [81]. No entanto, com exceção do Brasil, amostras F1 puras são raramente encontradas, na maioria dos casos, o subtipo F1 é encontrado na sua forma recombinante BF1 e destas, dentre os CRFs destacamos o CRF12_BF e em menor extensão o CRF17_BF encontrados na Argentina, Uruguai e Paraguai e mais recentemente o CRF38_BF foi identificado no Uruguai [82,83].

Uma plêiade de subtipos e formas recombinantes de HIV-1 descritos, em diferentes perímetros geográficos (Figura 7) pode ter como consequência uma poderosa barreira antigênica que afeta o sucesso da terapia antirretroviral bem como o desenvolvimentos de protótipos vacinais eficazes.

Apesar deste ambiente fértil para mutação, existe pouca evidência de diferenças entre os subtipos de HIV-1 nos seus padrões ou eficiência de transmissão. Por outro lado, existe uma observação epidemiológica que o vírus do subtipo D de Uganda e regiões vizinhas possam mostrar mais comumente vírus R5/X4 dual trópico mais que outros subtipos de HIV-1, mas isso deve ter um maior efeito na patogênese viral que na transmissão em si [84].

A transmissão do HIV pode, também, ser modulado por outros fatores, incluindo doenças sexualmente transmissíveis, particularmente, estas resultam em inflamações e úlceras que podem elevar a suscetibilidade de contrair o HIV em 2 a 11 vezes [85].

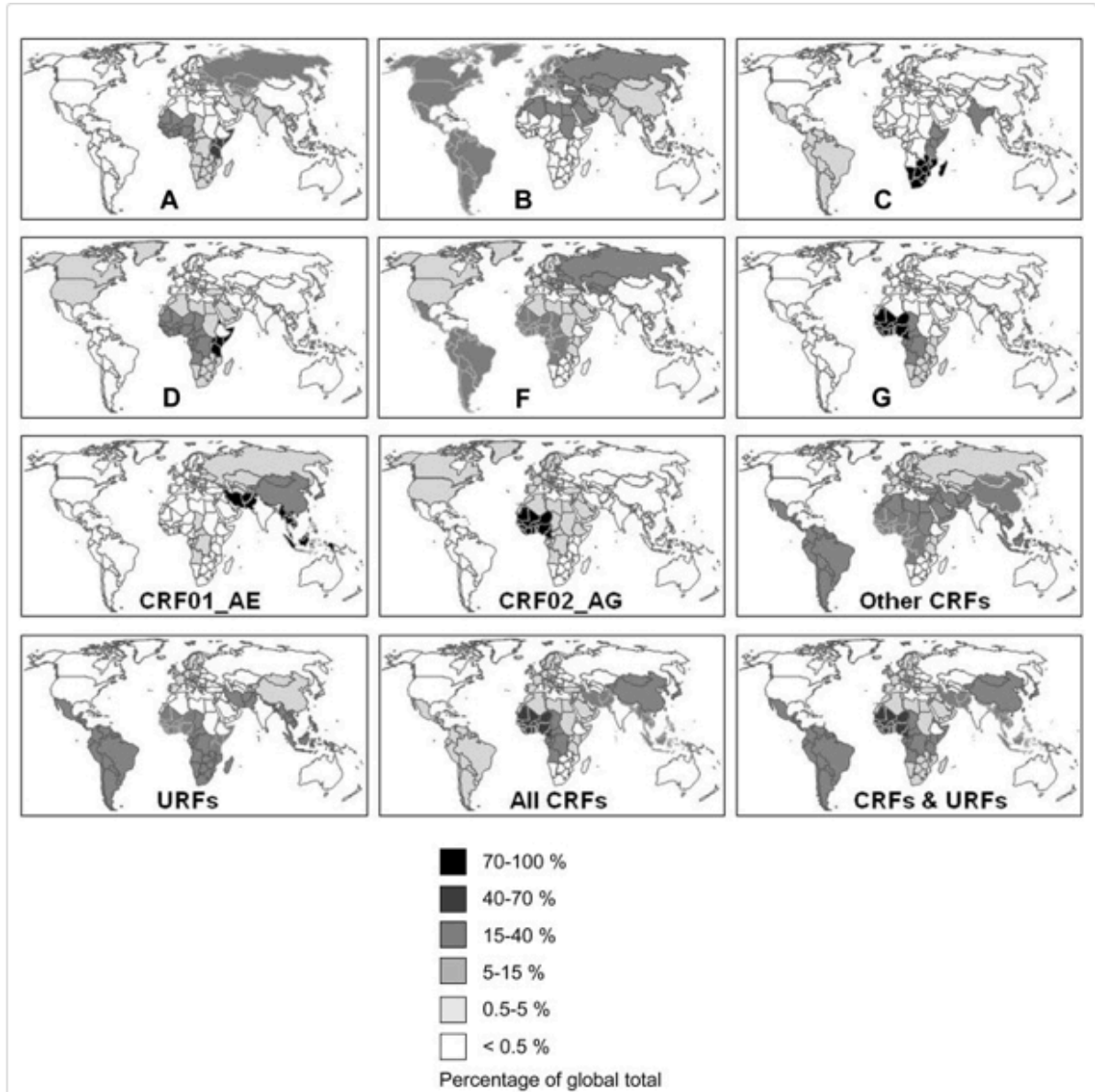


Figura 7 - Distribuição global dos subtipos e recombinantes de HIV-1 do grupo M. Para cada subtipo/recombinante um painel único. Fonte: [72].

1.9 EPIDEMIOLOGIA MOLECULA DO HIV-1 NO BRASIL

O monitoramento da diversidade genética do HIV-1 se faz útil no Brasil, a fim de compreender a disseminação da epidemia, bem como perceber as características que compõem os vírus circulantes.

Inúmeros trabalhos envolvendo coorte de pacientes de diversas regiões geográficas do país acusam uma predominância do clado B (~70%), porém, diferentes dos países que compõem a América do Norte e alguns países da Europa ocidental, o Brasil apresenta um

expressivo número de infecções causadas pelos clados não B (F1, C, formas recombinantes BF1, BC, além do recombinantes complexos) [77,86,87].

Um cenário diferente do observado na maior parte do território nacional, a região do Sul do país apresenta uma elevada prevalência de mais de 50% das infecções estão relacionadas ao subtipo C [88,89]. Cabe ressaltar que a depender da cidade do sul do país esse número pode ser entorno de 80% das infecções [90].

A co-circulação dos diferentes subtipos em uma localidade aliada ao crescimento da epidemia em muitas regiões do país, além do crescente número de estudos de epidemiologia molecular do HIV-1 em importantes centros urbanos no Brasil, têm gerado um volume importante de informações no que tange as formas recombinantes virais. A maioria dos recombinantes descritos são URFs, não obstante alguns recombinantes foram capazes de se espalhar na epidemia e deram origem aos diferentes CRFs descritos no Brasil tais como: CRF28_BF1, CRF29_BF1, CRF31_BC, CRF39_BF1, CRF40_BF1, CRF46_BF1, CRF_72BF [91–94].

Estudos sobre a evolução do HIV no Brasil sugerem que o primeiro subtipo a ser introduzido na população brasileira foi o subtipo B (por volta de 1965-1970), seguido pelo subtipo F1 (~1975-1980) [95]. As primeiras descrições do subtipo F1 em amostras brasileiras são de dois trabalhos de 1994 com amostras do início dos anos 90 [77,96] sendo também da mesma época a identificação do primeiro genoma recombinante B/F [97].

O subtipo C de HIV-1 tem se disseminado eficientemente em estados do sul do Brasil. Estudos de filogeografia indicam que a epidemia do subtipo C no sul No Brasil foi iniciada pela introdução de um único vírus fundador em algum momento entre 1960 e 1980, mas pouco se sabe sobre a dinâmica espacial da disseminação viral [90,98].

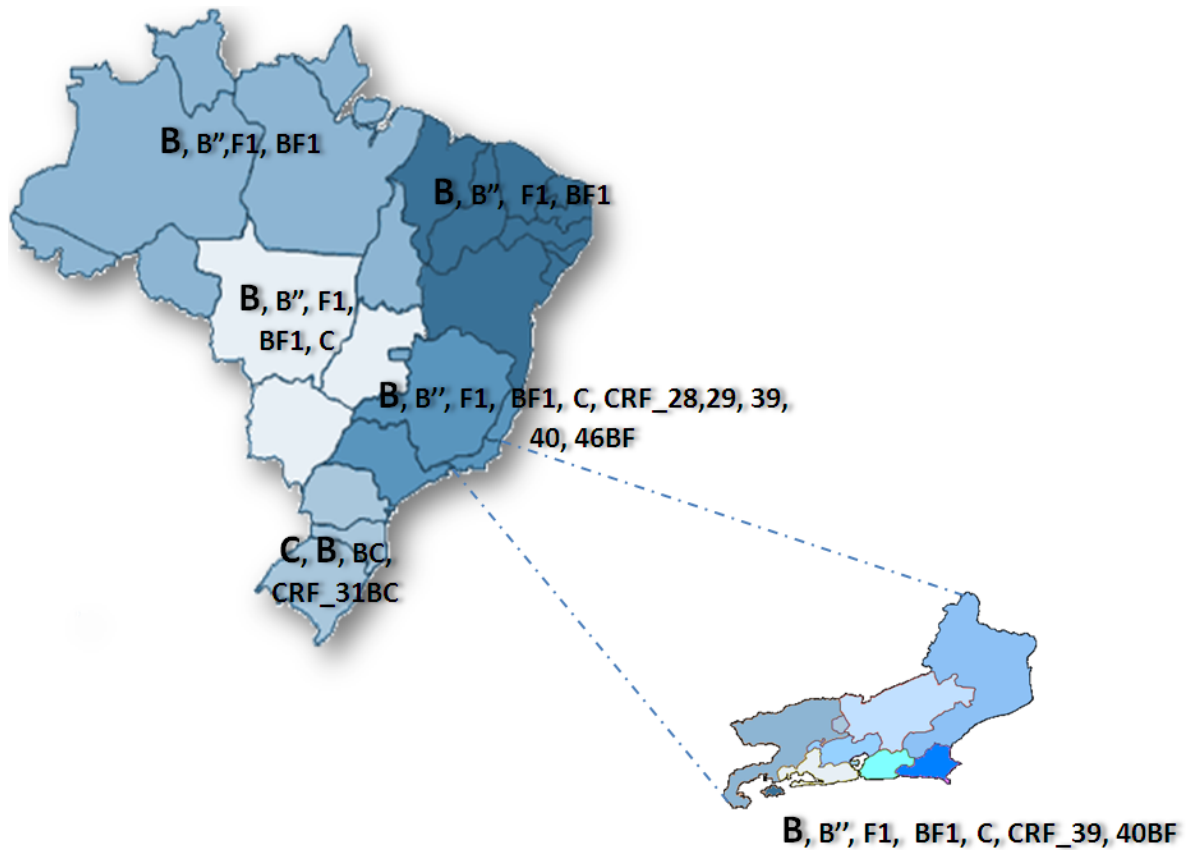


Figura 8 - Distribuição dos subtipos e formas recombinantes circulantes do HIV-1 no Brasil. Fonte: Adaptado de [78].

1.10 TEORIA DAS QUASIESPÉCIES DO HIV

A dinâmica evolutiva dos vírus de RNA são complexas o tamanho populacional quase infinito, as altas taxas de mutação, e a rápida cinética de replicação dos vírus de RNA impossibilitam sua descrição pela genética de populações clássica, no qual o *fitness* (adaptabilidade ou cinética de replicação) de um fenótipo característico é principalmente o produto da habilidade do sucesso reprodutivo [99,100]. Em vírus de RNA tal qual o HIV, a taxa de erro extremamente elevada durante o curso da replicação viral cria um grande *swarms* de variantes geneticamente diversas.

Coletivamente, este *swarm* de variantes ainda similar, do qual emergem de um tronco único fruto da infecção de uma variante (vírus fundador), forma as quasiespécies (Figura 9). Dentro das quasiespécies, o *fitness* de um fenótipo depende da habilidade reprodutiva de uma variante individual e da sua capacidade de mutação.

Para ser considerado quasispécies, o vírus deve conter os seguintes critérios: uma variante individual dentro de uma população deve ter divergido da sequência master de um vírus fundador por mutação, uma variante individual dentro de uma população deve responder à pressão de seleção dentro do hospedeiro e por fim, cada variante deve contribuir para melhorar os atributos da população total [101].

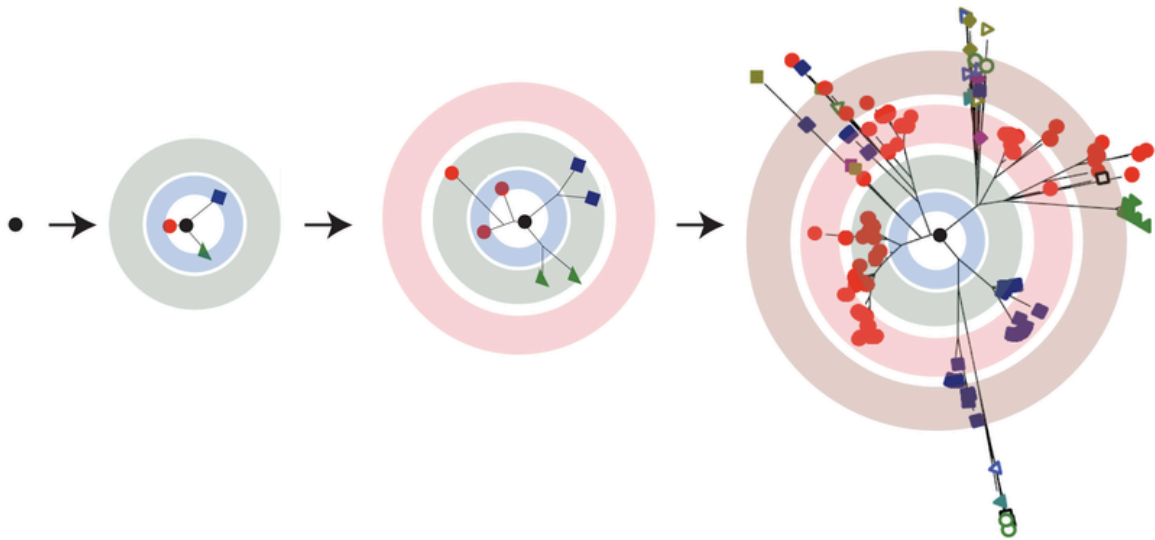


Figura 9 - Esquema de geração das quasi-espécies. As variantes individuais que compõem as quasispécies são geneticamente ligadas a sequência master (assinaladas como círculo preto). Fonte: [102].

O entendimento da ligação entre a teoria da quasispécie e o efeito do comportamento do HIV dentro do hospedeiro pode ajudar a elucidar estratégias terapêuticas de atenuação ou eliminação do patógeno dentro do indivíduo infectado [103].

Apesar dos inúmeros estudos sobre epidemiologia molecular do HIV-1, ainda há uma lacuna do conhecimento no tocante à diversidade genética intra-hospedeiro na população de indivíduos recentemente infectados em especial no Brasil, onde há co-circulação de diferentes subtipos, além de um número importante de formas recombinantes.

Muitos estudos de diversidade genética do HIV-1 no Brasil estão atrelados apenas à vigilância das mutações de resistência aos antivirais. Todavia, o presente estudo se propõem a estudar questões de variabilidade intra-hospedeiro, pressão de seleção agindo nas populações virais, e descrição de mutações associadas à resistência aos antirretrovirais que mantêm-se escondidas entre as sub-populações minoritárias dentro do paciente infectado.

Um outro olhar não menos importante, que reverbera da diversidade genética intra-hospedeiro é o efeito do *bottleneck* (gargalo) da diversidade viral durante a transmissão inter-hospedeiro, e as consequência de vírus de baixo *fitness* $R_0 < 1$, sendo portanto a infecção não produtiva e quando o vírus apresenta maior *fitness* $R_0 > 1$, a infecção clínica é estabelecida com altos títulos viral na ordem de 10^6 partículas/mL (Figura 10). No contexto do Brasil, não há qualquer trabalho que descreva as malhas de transmissão inter-hospedeiro associadas aos subtipos virais, terapia e grupos de risco.

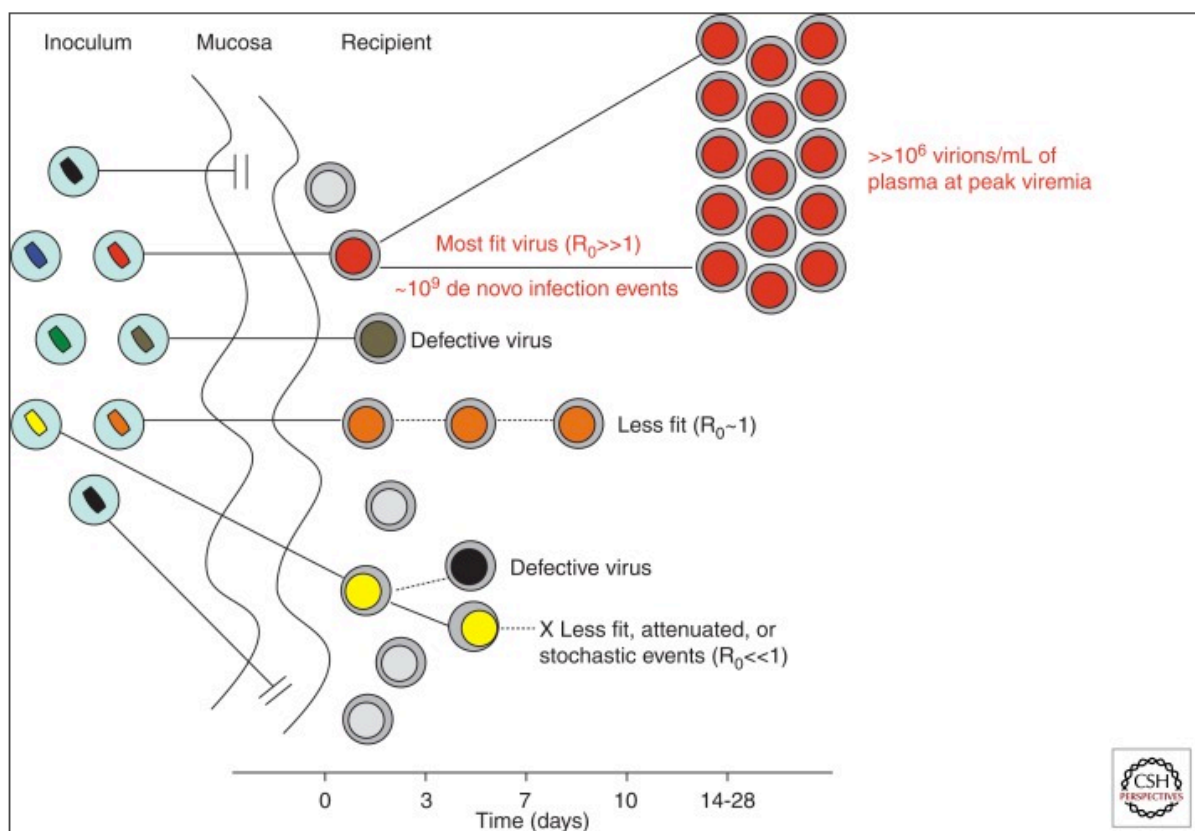


Figura 10 - Modelo de Transmissão do HIV-1 Fonte: [102].

6 CONCLUSÕES

- A epidemia do estado de São Paulo é dirigida pelo grupo de homens que fazem sexo com homens com elevada taxa de resistência primária.
- Independente do subtipo a epidemia é auto-sustentada pelos pacientes virgens de tratamento.
- A epidemia do subtipo C está crescendo dentro do estado de São Paulo sobretudo na região metropolitana.
- Os indivíduos infectados pelo subtipo C estão duas vezes mais ligados a redes de transmissão que os indivíduos infectados pelos subtipos B e F1
- O método do sequenciamento de nova geração foi capaz de detectar 4/12 (30%) mutações de baixa frequência entre 1-20% que foram negligenciadas pelo método de sanger, chegando a 50% quando relaxamos o parâmetro para abaixo de 1%.
- Verificamos diferenças significativas de diversidade genética em nucleotídeo dentro do grupo de soroconvertores recentes (incidentes versus prevalentes).
- O gene *pol* do HIV-1 exibe uma grande gama de códons preferencialmente expressos e sobretudo terminando em A/T, no grupo de soroconvertores recentes, diferentemente do observado no hospedeiro.
- Os códons 36 da protease e o códon 130 do domínio da transcriptase reversa estão em regime de seleção positiva, muito embora a maioria dos códons estão sob efeito de seleção purificadora.

REFERENCIAS*

1. Coffin J, Haase A, Levy J, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, et al. Human immunodeficiency viruses. *Science*. 1986;232(4751):697–697.
2. AIDS EPIDEMIC UPDATE. UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World health Organization. [internet]. 2008. [capturado em 31 de maio e 2015]. disponível em: <http://www.unaids.org>.
3. AIDS EPIDEMIC UPDATE. UNAIDS. Published jointly by UNAIDS and the World health Organization. [internet]. 2016. [capturado em 15 de agosto de 2015]. disponível em: <http://www.unaids.org>.
4. Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da saúde. [internet]. Brasil; 2010. [capturado em 27 de março de 2010]. Disponível em <http://www.aids.gov.br>.
5. Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da saúde. [internet]. Brasil; 2015. [capturado em 21 de agosto de 2015]. Disponível em <http://www.aids.gov.br>.
6. Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da saúde do estado de São Paulo [internet]. Brasil; 2014. [capturado em 06 de dezembro de 2014]. Disponível em <http://www.saude.sp.gov.br>.
7. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodyte*. *Nature*. 1999;397(6718):436–41.
8. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006841.
9. Goto T, Nakai M, Ikuta K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron*. 1998; 29(2–3):123–38.
10. Marx PA, Munn RJ, Joy KI. Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Lab Invest*. 1988;58(1):112–8.
11. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:1–25.
12. Freed EO. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology*. 1998;251(1):1–15.
13. Fang X, Wang J, O’Carroll IP, Mitchell M, Zuo X, Wang Y, et al. An unusual topological structure of the HIV-1 Rev response element. *Cell*. 2013;155(3):594–605.

14. Freed EO. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*. 2001;26(1–6):13–33.
15. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature*. 1988;331(6153):280–3.
16. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999;285(1):1–32.
17. Lu K, Heng X, Garyu L, Monti S, Garcia EL, Kharytonchyk S, et al. NMR detection of structures in the HIV-1 5'-leader RNA that regulate genome packaging. *Science*. 2011;334(6053):242–5.
18. Polzer S, Dittmar MT, Schmitz H, Meyer B, Müller H, Kräusslich HG, et al. Loss of N-linked glycans in the V3-loop region of gp120 is correlated to an enhanced infectivity of HIV-1. *Glycobiology*. 2001;11(1):11–9.
19. Donahoe SM, Moretto WJ, Samuel R V., Metzner KJ, Marx PA, Hanke T, et al. Direct Measurement of CD8+ T Cell Responses in Macaques Infected with Simian Immunodeficiency Virus. *Virology*. 2000;272(2):347–56.
20. Zhang G, Liu R, Zhong Y, Plotnikov AN, Zhang W, Zeng L, et al. Down-regulation of NF- κ B transcriptional activity in HIV-associated kidney disease by BRD4 inhibition. *J Biol Chem*. 2012;287(46):38956–38956.
21. Kumar B, Arora S, Ahmed S, Banerjea AC. Hyperactivation of mammalian target of rapamycin complex 1 by HIV-1 is necessary for virion production and latent viral reactivation. *FASEB J*. 2016; pii: fj.201600813R.
22. Stettner MR, Nance JA, Wright CA, Kinoshita Y, Kim W-K, Morgello S, et al. SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol*. 2009;90(8):2005–14.
23. Matsui M, Warburton RJ, Cogswell PC, Baldwin AS, Frelinger JA. Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;11(3):233–40.
24. Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, Rusche JR, Hauber J, Cullen BR. HIV-1 structural gene expression requires binding of the rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell*. 1990;60(4):675–83.
25. Rose KM, Marin M, Kozak SL, Kabat D. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. *Trends Mol Med*. 2004;10(6):291–7.
26. Navarro F, Landau NR. Recent insights into HIV-1 Vif. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(4):477–82.
27. Argyris EG, Pomerantz RJ. HIV-1 Vif versus APOBEC3G: newly appreciated warriors in the ancient battle between virus and host. *Trends Microbiol*.

- 2004;12(4):145–8.
28. Heinzinger NK, Bukrinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, et al. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(15):7311–5.
 29. He J, Choe S, Walker R, Di Marzio P, Morgan DO, Landau NR. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol*. 1995;69(11):6705–11.
 30. Bour S, Strebel K. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect*. 2003;5(11):1029–39.
 31. Mailler E, Bernacchi S, Marquet R, Paillart J-C, Vivet-Boudou V, Smyth R. The Life-Cycle of the HIV-1 Gag–RNA Complex. *Viruses*. 2016;8(9):248.
 32. Levitt JT, Brown TA, Orsillo SM, Barlow DH. The effects of acceptance versus suppression of emotion on subjective and psychophysiological response to carbon dioxide challenge in patients with panic disorder. *Behav Ther*. 2004;35(4):747–66.
 33. Bowerman B, Brown PO, Bishop JM, Varmus HE. A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes Dev*. 1989;3(4):469–78.
 34. BARBER AM, HIZI A, MAIZEL JV, HUGHES SH. HIV-1 Reverse Transcriptase: Structure Predictions for the Polymerase Domain. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6(9):1061–72.
 35. Hottiger M, Hübscher U. Human Immunodeficiency Virus type 1 reverse transcriptase. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1996;377(2):97–120.
 36. Saayman S, Ali SA, Morris K V, Weinberg MS. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(6):819–30.
 37. Shehu-Xhilaga M, Tachedjian G, Crowe S, Kedzierska K. Antiretroviral Compounds: Mechanisms Underlying Failure of HAART to Eradicate HIV-1. *Curr Med Chem*. 2005;12(15):1705–19.
 38. Jülg B, Barouch DH. Novel immunological strategies for HIV-1 eradication. *J virus Erad*. 2015;1(4):232–6.
 39. Stein J, Storcksdieck Genannt Bonsmann M, Streeck H. Barriers to HIV Cure. *HLA*. 2016;88(4):155–63.
 40. Bangsberg DR, Charlebois ED, Grant RM, Holodniy M, Deeks SG, Perry S, et al. High levels of adherence do not prevent accumulation of HIV drug resistance mutations. *AIDS*. 2003;17(13):1925–32.
 41. Arts EJ, Hazuda DJ. HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(4):a007161.

42. Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature*. 2001 Apr 19;410(6831):995–1001.
43. Esnouf R, Ren J, Ross C, Jones Y, Stammers D, Stuart D. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by non-nucleoside inhibitors. *Nat Struct Biol*. 1995;2(4):303–8.
44. Xia Q, Radzio J, Anderson KS, Sluis-Cremer N. Probing nonnucleoside inhibitor-induced active-site distortion in HIV-1 reverse transcriptase by transient kinetic analyses. *Protein Sci*. 2007;16(8):1728–37.
45. Hazuda DJ, Young SD, Guare JP, Anthony NJ, Gomez RP, Wai JS, et al. Integrase Inhibitors and Cellular Immunity Suppress Retroviral Replication in Rhesus Macaques. *Science*. 2004; 305(5683):528-32.
46. Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, et al. A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11233–8.
47. Shimura K, Kodama E, Sakagami Y, Matsuzaki Y, Watanabe W, Yamataka K, et al. Broad antiretroviral activity and resistance profile of the novel human immunodeficiency virus integrase inhibitor elvitegravir (JTK-303/GS-9137). *J Virol*. 2008;82(2):764–74.
48. Hare S, Gupta SS, Valkov E, Engelman A, Cherepanov P. Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature*. 2010 11;464(7286):232–6.
49. Pomerantz RJ, Horn DL. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nat Med*. 2003;9(7):867–73.
50. White KL, Chen JM, Feng JY, Margot NA, Ly JK, Ray AS, et al. The K65R reverse transcriptase mutation in HIV-1 reverses the excision phenotype of zidovudine resistance mutations. *Antivir Ther*. 2006;11(2):155-63.
51. Demeter LM, Shafer RW, Meehan PM, Holden-Wiltse J, Fischl MA, Freimuth WW, et al. Delavirdine susceptibilities and associated reverse transcriptase mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients in a phase I/II trial of delavirdine monotherapy (ACTG 260). *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):794–7.
52. Azijn H, Tirry I, Vingerhoets J, de Béthune M-P, Kraus G, Boven K, et al. TMC278, a next-generation nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI), active against wild-type and NNRTI-resistant HIV-1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Feb;54(2):718–27.
53. Métifiot M, Vandegraaff N, Maddali K, Naumova A, Zhang X, Rhodes D, et al. Elvitegravir overcomes resistance to raltegravir induced by integrase mutation Y143. *AIDS*. 2011;25(9):1175–8.

54. Hatano H, Lampiris H, Fransen S, Gupta S, Huang W, Hoh R, et al. Evolution of integrase resistance during failure of integrase inhibitor-based antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010;54(4):389–93.
55. Quashie PK, Mesplède T, Wainberg MA. Evolution of HIV integrase resistance mutations. *Curr Opin Infect Dis*. 2013;26(1):43-9.
56. Clavel F, Hance AJ. HIV Drug Resistance. *N Engl J Med*. 2004;350(10):1023–35.
57. Liu F, Kovalevsky AY, Louis JM, Boross PI, Wang Y-F, Harrison RW, et al. Mechanism of Drug Resistance Revealed by the Crystal Structure of the Unliganded HIV-1 Protease with F53L Mutation. *Journal of Molecular Biology*. 2006; 358(5):1191-9.
58. Jurriaans S, Van Gemen B, Weverling GJ, Van Strup D, Nara P, Coutinho R, et al. The Natural History of HIV-1 Infection: Virus Load and Virus Phenotype Independent Determinants of Clinical Course? *Virology*. 1994;204(1):223–33.
59. Jaffar S, Grant AD, Whitworth J, Smith PG, Whittle H. The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review. *Bull World Health Organ*. 2004;82(6):462–9.
60. Cohen MS, Shaw GM, McMichael AJ, Haynes BF. Acute HIV-1 Infection. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1943–54.
61. Garber DA, Silvestri G, Barry AP, Fedanov A, Kozyr N, McClure H, et al. Blockade of T cell costimulation reveals interrelated actions of CD4+ and CD8+ T cells in control of SIV replication. *J Clin Invest*. 2004;113(6):836–45.
62. Staprans S, Feinberg MB. The roles of nonhuman primates in the preclinical evaluation of candidate AIDS vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(sup1):S5–32.
63. Karon JM, Buehler JW, Byers RH, Farizo KM, Green TA, Hanson DL, et al. Projections of the number of persons diagnosed with AIDS and the number of immunosuppressed HIV-infected persons--United States, 1992-1994. *MMWR Recomm Rep*. 1992;41(RR-18):1–29.
64. Mindel A, Tenant-Flowers M. ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection. *BMJ*. 2001;322(7297):1290–3.
65. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*. 2000;288(5463):55–6.
66. Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, et al. Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science*. 2000;288(5472).
67. Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Bunce M, et al. Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*.

- 2008;455(7213):661–4.
68. Triques K, Bourgeois A, Vidal N, Mpoudi-Ngole E, Mulanga-Kabeya C, Nzilambi N, et al. Near-Full-Length Genome Sequencing of Divergent African HIV Type 1 Subtype F Viruses Leads to the Identification of a New HIV Type 1 Subtype Designated K. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(2):139–51.
 69. Niama FR, Toure-Kane C, Vidal N, Obengui P, Bikandou B, Ndoundou Nkodia MY, et al. HIV-1 subtypes and recombinants in the Republic of Congo. *Infect Genet Evol*. 2006;6(5):337–43.
 70. Foley B, Leitner T, Apetrei C, Hahn B, Mizrahi I, Mullins J, Rambaut A, Wolinsky S and KB. HIV Sequence Compendium 2013 [Internet]. 2013. Available from: <https://www.hiv.lanl.gov>.
 71. Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, Hammer SM. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *N Engl J Med*. 2008 Apr 10;358(15):1590–602.
 72. Hemelaar J. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *J Infect*. 2013;66(5):391–400.
 73. Gilbert MTP, Rambaut A, Wlasiuk G, Spira TJ, Pitchenik AE, Worobey M. The emergence of HIV/AIDS in the Americas and beyond. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(47):18566–70.
 74. Haaland RE, Hawkins PA, Salazar-Gonzalez J, Johnson A, Tichacek A, Karita E, et al. Inflammatory Genital Infections Mitigate a Severe Genetic Bottleneck in Heterosexual Transmission of Subtype A and C HIV-1. Trkola A, editor. *PLoS Pathog*. 2009;5(1):e1000274.
 75. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S, WHO-UNAIDS Network for HIV Isolation and Characterisation. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011;25(5):679–89.
 76. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*. 2006 Oct;20(16):W13–23.
 77. Morgado MG, Sabino EC, Shpaer EG, Bongertz V, Brigido L, Guimaraes MDC, et al. V3 Region Polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of Subtype B Strains Divergent from North American/European Prototype and Detection of Subtype F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1994;10(5):569–76.
 78. Morgado M, Guimarães M, Neves Jr I, Veloso dos Santos V, Linhares-de-Carvalho M, Castello-Branco L, et al. Molecular Epidemiology of HIV in Brazil: Polymorphism of the Antigenically Distinct HIV-1 B Subtype Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1998;93(3):383–6.
 79. Thomson MM, Villahermosa ML, Vázquez-de-Parga E, Cuevas MT, Delgado E, Manjón N, et al. Widespread circulation of a B/F intersubtype recombinant form

- among HIV-1-infected individuals in Buenos Aires, Argentina. *AIDS*. 2000;14(7):897–9.
80. Velarde-Dunois KG, Guimarães ML, La Fuente C, Andrade R, Arévalo R, Pantoja S, et al. Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals from Bolivia Reveals the Presence of Two Distinct Genetic Subtypes B and F. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16(17):1921–6.
 81. Hierholzer J, Montano S, Hoelscher M, Negrete M, Hierholzer M, Avila MM, et al. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002;18(18):1339–50.
 82. Aulicino PC, Gómez-Carrillo M, Bello G, Rocco C, Mangano A, Carr J, et al. Characterization of full-length HIV-1 CRF17_BF genomes and comparison to the prototype CRF12_BF strains. *Infect Genet Evol*. 2012;12(2):443–7.
 83. Ruchansky D, Casado C, Russi JC, Arbiza JR, Lopez-Galindez C. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38_BF1) in Uruguay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(3):351–6.
 84. Ssemwanga D, Nsubuga RN, Mayanja BN, Lyagoba F, Magambo B, Yirrell D, et al. Effect of HIV-1 subtypes on disease progression in rural Uganda: a prospective clinical cohort study. *PLoS One*. 2013;8(8):e71768.
 85. Galvin SR, Cohen MS. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Jan;2(1):33–42.
 86. Guimarães ML, Marques BCL, Bertoni N, Teixeira SLM, Morgado MG, Bastos FI, et al. Assessing the HIV-1 Epidemic in Brazilian Drug Users: A Molecular Epidemiology Approach. *PLoS One*. 2015;10(11):e0141372.
 87. Machado LFA, Ishak MOG, Vallinoto ACR, Lemos JAR, Azevedo VN, Moreira MRC, et al. Molecular Epidemiology of HIV Type 1 in Northern Brazil: Identification of Subtypes C and D and the Introduction of CRF02_AG in the Amazon Region of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2009;25(10):961–6.
 88. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brigido L, et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*. 2003;17(7):1063–9.
 89. Soares EAJM, Martínez AMB, Souza TM, Santos AFA, Da Hora V, Silveira J, et al. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS*. 2005;19 Suppl 4:S81–6.
 90. Gräf T, Pinto AR. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology*. 2013;435(1):170–8.
 91. De Sá Filho DJ, Sucupira MCA, Caseiro MM, Casiero MM, Sabino EC, Diaz RS, et al. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22(1):1–13.

92. Guimarães ML, Couto-Fernandez JC, Eyer-Silva W de A, Teixeira SLM, Chequer-Fernandez SL, Morgado MG. Analysis of HIV-1 BF pr/rt recombinant strains from Rio de Janeiro/Brazil reveals multiple unrelated mosaic structures. *Infect Genet Evol.* 2010;10(7):1094–100.
93. Sanabani SS, Pastena ER de S, Neto WK, Martinez VP, Sabino EC. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virology*. 2010;7:74.
94. Pessôa R, Carneiro Proietti AB de F, Busch MP, Sanabani SS. Identification of a Novel HIV-1 Circulating Recombinant Form (CRF72_BF1) in Deep Sequencing Data from Blood Donors in Southeastern Brazil. *Genome Announc.* 2014;2(3).
95. Bello G, Guimarães ML, Morgado MG. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. *AIDS.* 2006 Mar 21;20(5):763–8.
96. Louwagie J, Delwart EL, Mullins JI, Mccutchan FE, Eddy G, Burke DS. Genetic Analysis of HIV-1 Isolates from Brazil Reveals Presence of Two Distinct Genetic Subtypes. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1994;10(5):561–7.
97. Sabino EC, Shpaer EG, Morgado MG, Korber BT, Diaz RS, Bongertz V, et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J Virol.* 1994;68(10):6340–6.
98. Bello G, Zanotto PM de A, Iamarino A, Gräf T, Pinto AR, Couto-Fernandez JC, et al. Phylogeographic Analysis of HIV-1 Subtype C Dissemination in Southern Brazil. Sandstrom P, editor. *PLoS One.* 2012;7(4):e35649.
99. Domingo E, Escarmís C, Sevilla N, Moya A, Elena SF, Quer J, et al. Basic concepts in RNA virus evolution. *FASEB J.* 1996;10(8):859–64.
100. Smith DB, Mcallister J, Casino C, Simmonds P. Printed in Great Britain Virus 'quasispecies': making a mountain out of a molehill? *J Gen Virol.* 1997;78:1511–9.
101. Dampier W, Nonnemacher MR, Mell J, Earl J, Ehrlich GD, Pirrone V, et al. HIV-1 Genetic Variation Resulting in the Development of New Quasispecies Continues to Be Encountered in the Peripheral Blood of Well-Suppressed Patients. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155382.
102. Lauring AS, Andino R. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. Manchester M, editor. *PLoS Pathog.* 2010;6(7):e1001005.
103. Zhang J, Xing H. [Application of Next-generation Sequencing Techniques in the Dynamics of HIV-1 Quasispecies]. *Bing Du Xue Bao.* 2015;31(5):573–8.