



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

NATALIA MIRELE CANTÃO

**Perfil de mutações e resistência do Vírus da
Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes coinfectados
com o Vírus da Hepatite B (VHB)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu
2016

NATALIA MIRELE CANTÃO

Perfil de mutações e resistência do Vírus da
Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes
coinfectedados com o Vírus da Hepatite B (VHB)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento:
Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Botucatu
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cantão, Natalia Mirele.

Perfil de mutações e resistência do Vírus da
Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes coinfectados
com o Vírus da Hepatite B (VHB) / Natalia Mirele Cantão. -
Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Rejane Maria Tommasini Grotto
Capes: 20804008

1. HIV (Vírus). 2. Coinfecção. 3. Mutação (Biologia).
4. Hepatite por vírus. 5. Hepatite C. 6. Hepatite B.

Palavras-chave: Coinfecções; HIV; Mutação; VHB; VHC.


NATÁLIA MIRELE CANTÃO

Perfil de mutações e resistência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em
pacientes coinfectedados com o Vírus da Hepatite B (VHB)

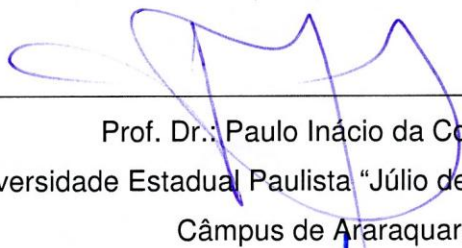
Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Comissão examinadora



Profa. Dra.: Rejane Maria Tommasini Grotto
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Câmpus de Botucatu



Prof. Dr.: Paulo Inácio da Costa
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/
Câmpus de Araraquara



Prof. Dr.: Alexandre Naime Barbosa
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/
Câmpus de Botucatu

Botucatu, 17 de Fevereiro de 2016

Dedicatória

*Dedico este trabalho a minha mãe
Telma, aos meus avós, Neusa e Augusto
(in memoriam), e ao meu irmão,
Giovani.*

Agradecimientos

À Deus, por sempre me conduzir no caminho certo, me dando força e discernimento para enfrentar os desafios de cada dia.

À minha mãe Telma, minha fortaleza. Obrigada pelo apoio em qualquer que fosse o caminho escolhido por mim.

Ao meu namorado Gustavo, pela compreensão nos momentos de estudo e pelo apoio nas minhas decisões profissionais.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto, pela educação científica, paciência e amizade por todos esses anos e, principalmente, por ter acreditado no meu potencial desde o princípio, obrigada por tudo.

À Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela oportunidade, motivação e confiança depositada ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Patrícia Carvalho Garcia, um exemplo profissional. Obrigada por dar abertura ao meu caminho acadêmico e pelas inúmeras oportunidades e ensinamentos durante a graduação.

À equipe do Laboratório de Rotina Diagnósticas em Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Maércio, Sarita, Regina e as aprimorandas Natália, Renata, Francine e Bianka, pela boa vontade em me ajudar e, acima de tudo pelo companheirismo e amizade.

À todas as colegas do laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, pelo apoio e ajuda durante minha passagem por Botucatu. Agradeço em especial a Aline Tanikawa e Aline Galvani pela grande amizade e companheirismo.

As alunas de Iniciação Científica Caroline e Francielle, pela disponibilidade e ajuda com os TCLE.

As minhas colegas de kit, Aline Del' Vescovo e Viviam, pela amizade e pelos momentos compartilhados, que sempre levarei comigo.

Ao meu amigo Luiz Gustavo Munhoz, pelos grandes ensinamentos com as técnicas de Biologia Molecular e por sempre acreditar em mim.

A equipe do SAE de Infectologia “Domingos Alves Meira”, principalmente ao Dr. Alexandre Naime Barbosa e Dr. João Paulo Vasconcelos, pelas valiosas contribuições para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Targino Valente do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia, da Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu e à aluna de iniciação científica Lauana Fogaça, pelas análises filogenéticas realizadas neste estudo.

Ao Hemonúcleo e Hemovida de Bauru, pela compreensão devido a minha ausência para a finalização do mestrado.

À todos os pacientes que concordaram em participar deste trabalho, sem eles nada seria possível.

Enfim, minha profunda gratidão a todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão de mais uma etapa de minha vida. Obrigada a todos!

Epígrafe

*“Sou um pouco de todos que conheci,
um pouco dos lugares que fui,
um pouco das saudades que deixei,
sou muito das coisas que gostei.
Entre umas e outras erreí,
entre muitas e outras conquistei”.*
(Ramon Hasman)

Prefácio

Com imensa alegria e prazer utilizo este breve espaço para prefaciá a Dissertação de Mestrado de Natália Mirele Cantão.

Ainda durante sua graduação em Biomedicina, a Natália chega ao Laboratório de Biologia Molecular, Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, Unesp em busca de oportunidades que pudessem enriquecer e contribuir para sua formação. A Natália ainda não sabia, mas sua iniciativa de deixar sua cidade, família, amigos para se mudar para Botucatu naquele momento, constituiria o primeiro passo rumo ao seu crescimento acadêmico-científico.

Assim, agora no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu ela realiza seu treinamento teórico-prático e, pouco tempo depois inicia, formamente, seu primeiro contato com o desenvolvimento da pesquisa; sua iniciação científica.

Já nos primeiros meses em que esteve no Laboratório demonstra imensa dedicação, pró-atividade, espírito de equipe e comprometimento não somente com a pesquisa, mas com todo o serviço que o Laboratório de Biologia Molecular realiza para a comunidade.

O tempo passa e, em menos de um ano a Natália finaliza sua iniciação científica com sucesso e, ao mesmo tempo se forma Biomédica.

No ano seguinte, agora com maior bagagem técnico-científica, a Natália ingressa no Programa de Aprimoramento Profissional em Inovação Tecnológica e Diagnóstico Laboratorial, o qual é realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro com a finalidade de aprendizado em serviço nas rotinas de acompanhamento das infecções pelo Vírus HIV, Vírus da Hepatite C (VHC) e Vírus da Hepatite B (VHB).

Nesse momento, com as novas atribuições para aprendizado, voltando-se agora às rotinas diagnósticas a Natália se consolida como ótima profissional, demonstrando afinidade e responsabilidade com o serviço, seus colegas, pacientes e profissionais.

A medida que o primeiro ano de seu aprimoramento chega ao fim, a Natália só reforça o seu perfil já demonstrado durante sua iniciação científica, necessário ao meio acadêmico e, em meio a toda essa correria do dia-a-dia ela ingressa no Mestrado.

O tempo passa e, a Natália desenvolve seu trabalho de mestrado com grande destreza, comprometimento, maturidade científica; nunca deixar de atuar junto às rotinas diagnósticas.

Assim, devido ao perfil da Natália, associado ao ideal de formação cultivado pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu ela desenvolve seu Mestrado dentro de uma linha de pesquisa, consolidando sua formação acadêmica.

Neste cenário, em caráter formal, aqui apresenta-se a parte mensurável gerada pelo Mestrado da Natália. Digo mensurável porque não são disponíveis métricas suficientes para apresentar o aprendizado, a dedicação, o comprometimento, o trabalho em equipe e, o crescimento científico da Natália durante este período.

Desta forma, esta dissertação de Mestrado se subdivide em capítulos: (I) Introdução: descrição breve dos conceitos e conhecimentos básicos necessários para o leitor compreender os artigos aqui apresentados; (II) Artigo: Mutações de resistência na protease e transcriptase reversa do HIV-1 em pacientes coinfectados com os Vírus da Hepatite C (VHC) e Hepatite B (VHB); (III) Artigo: Human Platelets Antigens (HPA) influences the viral load platelets after HCV and HIV-platelet interaction in vitro, artigo submetido à

Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; (IV) Artigo: Polimorfismos dos sistemas HPA -1, -3 e -5 e a evolução da infecção pelo HIV.

Embora tenha consciência de que este modelo para apresentação de uma dissertação de Mestrado ainda seja, por mais estranho que me pareça, pouco convencional, tenho certeza que ele é capaz de demonstrar a dinâmica, a interface pesquisa-assistência e, a competência necessária para fornecer ao aluno o título de Mestre.

Tenho certeza que a Natália parte hoje do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, com uma imensa bagagem científica e profissional.

Encerro este prefácio com a certeza do dever cumprido e, a tranquilidade de que você, Natália, contará com uma carreira de sucesso, repleta de conquistas.

Rejane

Resumo

CANTÃO, N. M. Perfil de mutações e resistência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes coinfectados com o Vírus da Hepatite B (VHB). 2016.

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) representa um grave problema de saúde pública no mundo. A evolução clínica desta infecção é composta por amplo espectro de modificações clínicas e virais. A presença de coinfeções virais e de polimorfismos genéticos do hospedeiro são alguns dos fatores que podem interferir na dinâmica viral em cada indivíduo infectado. Neste sentido, o objetivo dessa dissertação foi estudar o perfil genético do HIV em coinfeções com o Vírus da Hepatite B (VHB) ou Vírus da Hepatite C (VHC) e o comportamento do HIV frente a polimorfismos dos Antígenos Plaquetários Humanos (HPAs). Desta forma, a dissertação foi dividida em capítulos: capítulo I, introdução - descrição breve dos conceitos e conhecimentos básicos necessários para a compreensão dos artigos aqui apresentados; capítulo II, artigo 1 - Mutações de resistência na protease e transcriptase reversa do HIV-1 em pacientes coinfectados com os Vírus da Hepatite C (VHC) e Hepatite B (VHB); capítulo III, artigo 2 - Human Platelets Antigens (HPA) influences the viral load platelets after HCV and HIV-platelet interaction in vitro, artigo submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; capítulo IV, artigo 3 - Polimorfismos dos sistemas HPA -1, -3 e -5 e a evolução da infecção pelo HIV.

Palavras-chave: coinfeções, HIV, mutação, VHB, VHC

Abstract

CANTÃO, N. M. Profile mutation and resistance of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in patients coinfecting with Hepatitis B Virus (HBV). 2016.

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection is a serious public health problem worldwide. The clinical course of this infection consists of wide range of clinical and viral modifications. The presence of viral coinfections and host genetic polymorphisms are some of the factors that can interfere with viral dynamics in each infected individual. In this sense, the aim of this thesis was to study the genetic profile of HIV coinfection with hepatitis B virus (HBV) or hepatitis C virus (HCV) and HIV opposite behavior with polymorphisms of Human Platelet Antigens (HPAs). Thus, the thesis was divided into chapters: Chapter I, Introduction - brief description of the concepts and skills necessary for the understanding of the articles presented here; Chapter II, Article 1 - resistance mutations in the protease and reverse transcriptase of HIV-1 in patients coinfecting with hepatitis C virus (HCV) and Hepatitis B (HBV); Chapter III, Article 2 - Human Platelets Antigens (HPA) influences the viral load platelets after HCV and HIV-platelet interaction in vitro, article submitted to the Journal Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; Chapter IV, Article 3 - Polymorphisms of the HPA system -1, -3 and -5 and the evolution of HIV infection.

Keywords: co-infections, HIV, mutation, HBV, HCV

Lista de abreviaturas, siglas

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

CDC= Centers Disease Control and Prevention (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)

ICTV= International Committee on Taxonomy Viruses (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)

SIV= Simian Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Símia)

T CD4+ = Linfócitos T CD4+

ICAM-1= Intercellular Adhesion Molecule 1 (Molécula de Adesão Intercelular 1)

DC-SIGN= Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin (Molécula de Adesão Intercelular Específica de Célula Dendrítica)

CLEC-2= C-Type Lectin-like Receptor 2 (Receptor de Lectina Tipo 2)

HPA= Human Platelet Antigens (Antígeno Plaquetário Humano)

gp = glicoproteína

gag = group-specific antigen (antígeno de grupo específico)

pol = polymerase (polimerase)

env = envelope

PR = Protease

TR = Transcriptase Reversa

IN = Integrase

CRF = Circulating Recombinant Forms (Formas Recombinantes Circulantes)

SISCEL = Sistema de Controle de Exames Laboratoriais

SISGENO = Sistema de Informação para Rede de Genotipagem

FDA= Food and Drug Administration

ITRNs= Inibidores de Transcriptase Reversa Análogos de Nucleosídeos

ITRNNs= Inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeos

IPs= Inibidores de Protease

LTR = Long Terminal Repeat (Repetição Terminal Longa)

ARV = Antirretrovirais

ABC= Abacavir

ddl= didanosina

FTC= Emtramicina

3TC= Lamivudina

ddC= zalcitabina

AZT= Zidovudina
TDF= Tenofovir
ETV= Etravirina
DLV= Delavirdina
EFV= Efavirenz
NVP= Nevirapina
RPV= Rilpirina
APV= Amprenavir
AZT= Atazanavir
TMC114= Darunavir
FPV= Fosamprenavir
IDV= Indinavir
LPV= Lopinavir
NFV= Nelfinavir
RTV= Ritonavir
SQV = Saquinavir
TPV= Tipranavir
IF= Inibidor de Fusão
ICR= Inibidor de Correceptor
T-20 = Enfuvirtida
RENAGENO = Rede Nacional de Genotipagem
TARV = Terapia Antirretroviral
II= Inibidores de Integrase
FDA = Food and Drug Administration
HAART= Highly Active Antiretroviral Therapy (Terapia Antirretroviral Altamente Ativa)
VHB= Vírus da Hepatite B
VHC= Vírus da Hepatite C
ORF= Open Reading Frame (Região Aberta de Leitura)
IgM= Imunoglobulina M
IgG= Imunoglobulina G
ALT= Alanina Transaminase
AST= Aspartato Transaminase

Sumário

Capítulo I: Introdução	23
1.1 Descoberta do HIV/AIDS	24
1.2 Origem evolutiva do HIV	24
1.3 Epidemiologia do HIV/AIDS	25
1.4 Infecção pelo HIV.....	26
1.4.1 Células alvo	26
1.4.2 Evolução Clínica	27
1.5 Estrutura e Genoma do HIV-1.....	28
1.6 Ciclo Replicativo do HIV-1	30
1.7 Variabilidade genética.....	31
1.8 Monitoramento e Tratamento	32
1.9 Antirretrovirais.....	33
1.9.1 Classes de drogas	33
1.9.2 Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART).....	35
1.9.3 Falha terapêutica	36
1.9.4 Resistência aos antirretrovirais	36
1.9.5 Teste de genotipagem para resistência aos antirretrovirais	37
1.9.6 Mutações de resistência	38
1.10 Vírus da Hepatite B (VHB)	40
1.10.1 Epidemiologia do VHB	41
1.10.2 Evolução clínica da infecção pelo VHB	42
1.10.3 Tratamento da Infecção pelo VHB	43
1.11 Evolução da coinfeção HIV/VHB	44
REFERÊNCIAS	45
Capítulo II: Artigo 1	58
Capítulo III: Artigo 2	81
Capítulo IV: Artigo 3	94
ANEXOS.....	100

Capítulo I: Introdução

Nos últimos anos o campo da biotecnologia tem gerado enormes avanços em resposta a epidemia da Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), agente etiológico da aids. Embora a produção de novas metodologias de diagnóstico e tratamento proporciona melhor qualidade de vida aos pacientes, a aids continua sendo um dos grandes desafios mundiais à saúde (WHO, 2015a).

1.1 Descoberta do HIV/AIDS

Em 1981 foi observado em diferentes grupos da população novos casos de doenças raras como candidíase das mucosas (*Candida albicans*), pneumonia (*Pneumocystis jirovecii*) e linfadenopatias persistentes generalizadas, que antes acometiam apenas pacientes imunodebilitados. O aumento de relatos de casos dessas doenças ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças, do inglês, *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), nos Estados Unidos, contribuiu para a definição da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em inglês *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (AIDS) (CDC, 1981; GOTTLIEB, 2006).

No período entre 1983 e 1984 o retrovírus causador da aids foi isolado e identificado em diferentes grupos de pesquisa. Em 1986, o retrovírus recebeu a denominação de Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1), pelo *International Committee on Taxonomy Viruses* (ICTV) (BARRE-SINOUSSE et al., 1983; GALLO et al., 1984). No mesmo ano, foi identificado o segundo retrovírus relacionado à doença, no Oeste da África, denominado HIV-2 (CLAVEL et al., 1986).

1.2 Origem evolutiva do HIV

A descrição da evolução do HIV tem sido baseada em evidências obtidas por estudos filogenéticos realizados com Vírus da Imunodeficiência Símia, do inglês, *Simian Immunodeficiency Viruses* (SIV). Os SIVs são encontrados em mais de 40 espécies de primatas não humanos na África Subsaariana e possuem homologia considerável com o HIV (SHARP; HAHN 2011; LOCATELLI; PEETERS 2012; HAHN et al., 2000).

Os chimpanzés da espécie *Pan troglodytes troglodytes* adquiriram duas linhagens de vírus a partir de duas espécies de macacos diferentes, devido a essa coinfeção, surgiu um vírus recombinante, denominado SIVcpz. As estirpes de

SIVcpz foram posteriormente transmitidas para os gorilas da espécie *Gorilla gorilla* (SIVgor) e para os seres humanos, dando origem ao HIV-1 (GAO et al., 1999; BAILES et al., 2003; KEELE et al., 2006; VAN HEUVERSWYN et al., 2006).

Em relação ao HIV-2, estudos filogenéticos indicam que o mesmo teve origem do SIV de mangabeis fuliginosos da espécie *Cercocebus atys* (SIVsmm). Conseqüentemente, pode ser observada em árvores filogenéticas a distância entre o HIV-1 e HIV-2 e, a proximidade dos mesmos com seus respectivos SIVs de origem (FIGURA 1) (CHEN et al., 1996; CORBET et al., 2000; GAO et al., 1999).

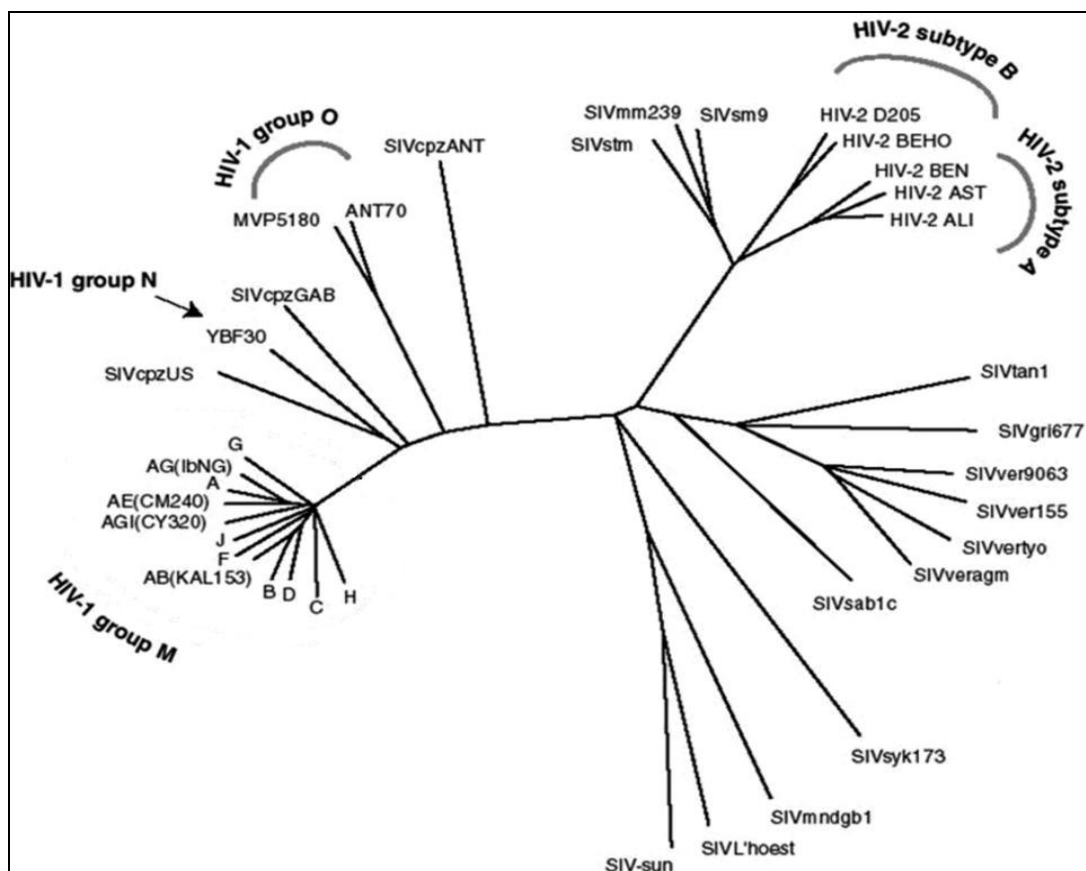


Figura 1: Representação da árvore filogenética do HIV-1, SIVcpz, HIV-2 e SIVsmm, evidenciando associações filogenéticas entre HIV-1/SIVcpz e HIV-2/SIVsmm (Fonte: Adaptado de ROTTA; ALMEIDA, 2011).

1.3 Epidemiologia do HIV/AIDS

Atualmente estima-se que 36,9 milhões de pessoas vivem com o HIV em todo o mundo, sendo a África subsaariana a região mais atingida com cerca de 70% dos casos (WHO, 2015a). Desde os primeiros relatos da infecção pelo HIV, no início da

década de 80, até o ano de 2013, já foram registradas mais de 39 milhões de mortes relacionadas à aids, em todo o mundo (UNAIDS, 2015).

No Brasil, as estimativas são de 734 mil indivíduos infectados pelo HIV. No ano de 2014, ocorreram aproximadamente 44.000 novas infecções, representando aumento no número de novos casos quando comparado aos 39.185 notificados em 2012 (BRASIL, 2013a; UNAIDS, 2015). A maior concentração dos casos encontra-se na região Sul e menor na região Nordeste do Brasil, com 31,1 e 16,0 casos para cada 100 mil habitantes, respectivamente (BRASIL, 2014).

1.4 Infecção pelo HIV

1.4.1 Células alvo

A infecção pelo HIV ocorre em células que expressam na membrana o receptor CD4 como os linfócitos T CD4+, macrófagos e células dendríticas (ABBAS et al., 2008). No entanto, já foi demonstrado que o HIV é capaz de infectar células CD4-, incluindo linhagens de fibroblastos, células dendríticas foliculares, células gliais derivadas de cérebro e linhagens celulares de carcinoma de fígado (LEVY, 2007), além de células vermelhas sanguíneas e plaquetas (OLINGER et al., 2002; LEVY, 2007). Estudos vêm sendo realizados na tentativa de elucidar o mecanismo de interação do HIV com células e plaquetas, uma vez que estes fragmentos celulares não expressam o principal receptor de entrada, o CD4 (MORIS et al., 2004; BOUKOUR et al., 2006; FLAUJAC; BOUKOUR; CRAMER-BORDÉ, 2010).

Muitos vírus utilizam moléculas envolvidas na adesão celular como receptores ou correceptores de entrada, por exemplo, a molécula de adesão celular do tipo 1 (ICAM-1) para rinovírus (GREVE et al., 1989; STAUNTON, 1989), integrinas para echovírus (BERGELSON et al., 1992) e adenovírus (WICKHAM et al., 1993). Além disso, as moléculas de adesão DC-SIGN e CLEC-2 foram associadas à captura e internalização do HIV em células dendríticas (MORIS et al., 2004) e em plaquetas (FLAUJAC; BOUKOUR; CRAMER-BORDÉ, 2010).

As plaquetas também expressam outras moléculas de adesão celular da família das integrinas na forma dos complexos glicoprotéicos GPIa-IIa e GPIIb-IIIa (METCALFE, 2004), nos quais residem determinantes antigênicos polimórficos denominados antígenos plaquetários humanos, HPA (*Human Platelet Antigens*)

(SCHROEDER; RAYNER, 1993). Os polimorfismos dos HPA também já foram associados com infecções virais, como dengue e infecção pelo Vírus da Hepatite C (VHC) (SOUNDRAVALLY; HOTI, 2007; VERDICHIO-MORAES et al., 2009). Dessa forma, as moléculas de adesão constituem fortes candidatas na interação do HIV com células e plaquetas, na ausência da molécula CD4.

1.4.2 Evolução Clínica

A evolução da infecção pelo HIV é caracterizada inicialmente pela fase aguda, geralmente assintomática ou com sintomatologia não específica, representando o período de alta viremia, com queda transitória da contagem de células T CD4+. Em seguida, inicia a fase crônica da infecção, assintomática, conhecida como período de latência do HIV, na qual ocorre replicação viral e declínio progressivo da contagem de CD4. Com a queda do CD4 a níveis inferiores a 200 células/mm³ podem surgir algumas infecções oportunistas, dando início à infecção sintomática pelo HIV (BARTLETT, 2000).

O CDC (Centers Disease Control and Prevention) utiliza um sistema de classificação para os pacientes infectados que categoriza condições clínicas em A, B ou C, associadas a contagem de linfócitos T CD4 em 1, 2 e 3. Dessa forma, os pacientes infectados são classificados na categoria A quando assintomáticos e/ou linfadenopatia generalizada e/ou infecção aguda; categoria B, consiste de condições sintomáticas que não estão listados em C e a categoria C inclui pacientes com condições clínicas indicativas de aids. Quanto a classificação segundo o número de linfócitos T CD4, os pacientes são incluídos em 1 quando apresentam contagens de linfócitos T CD4 superior a 500 células/mm³, em 2 quando o nível de linfócitos T CD4 se encontra entre 200 e 499 células/mm³ e em 3 quando a contagem de linfócitos T CD4 é inferior a 200 células/mm³ (CDC, 1992). Embora novas diretrizes para classificação de aids tenham sido publicadas recentemente, a nova classificação deve ser vista com cautela para aplicação em pesquisas (BRASIL, 2007; SELIK et al., 2014).

O paciente é diagnosticado com aids quando a contagem de células TCD4+ alcança níveis inferiores a 200 células/mm³, e/ou quando é classificado na categoria C do sistema de classificação CDC (CDC, 1992). O período desde a infecção inicial

pelo HIV até o diagnóstico da aids é, em média, de 10 anos em indivíduos sem tratamento (FIGURA 2) (KARON et al., 1992).

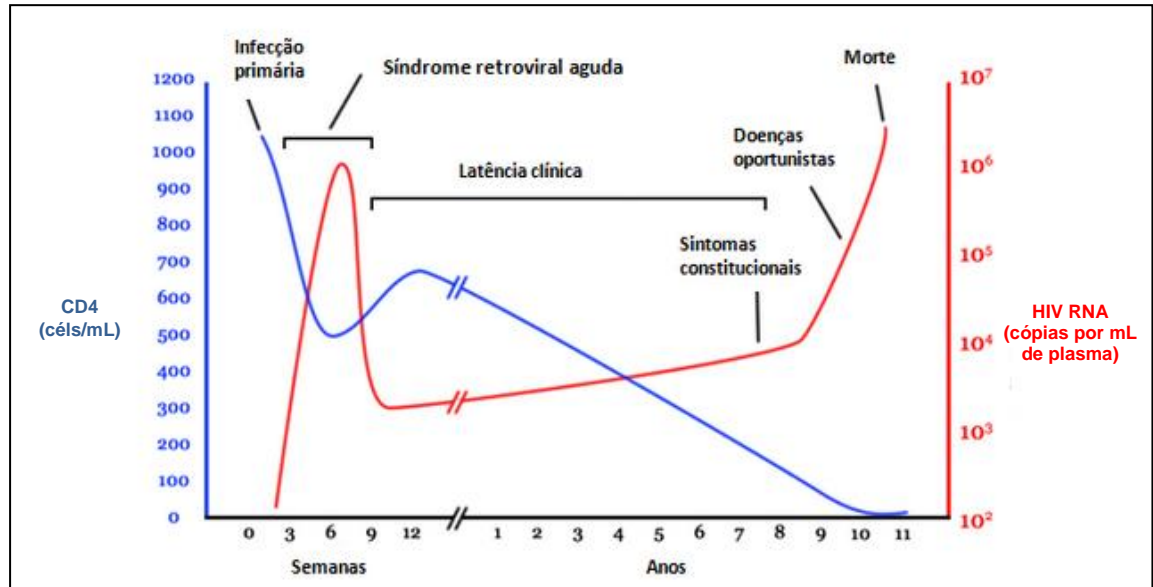


Figura 2: Evolução clínica da infecção pelo HIV, demonstrando, em azul, os níveis de linfócitos T CD4 (células/mL) e, em vermelho a quantificação do RNA do HIV no plasma (cópias de RNA/mL) ao longo da infecção (Fonte: Adaptado de <http://www.infectologia.net.br/infeccao-pelo-hiv-3>).

1.5 Estrutura e Genoma do HIV-1

O HIV-1 é um retrovírus da família *Lentiviridae*, com genoma constituído por duas fitas idênticas de RNA fita simples, as quais são revestidas por proteínas e enzimas virais, envoltos pelo capsídeo, matriz proteica e externamente por uma dupla camada de fosfolipídios, derivada da membrana da célula hospedeira, com glicoproteínas virais (gp41 e gp120) ancoradas (Figura 3) (BARRE-SINOUSI, 1996; CONNOR; HO, 1992).

As proteínas do HIV-1 são codificadas pelo genoma viral (Figura 4), por meio dos genes estruturais *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) e *env* (*envelope*), além dos genes acessórios e regulatórios (CULLEN, 1991). Nas extremidades do genoma se encontram regiões repetidas denominadas LTR (*Long Terminal Repeat*), que não são traduzidas, porém, com papel fundamental no ciclo replicativo viral (COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997).

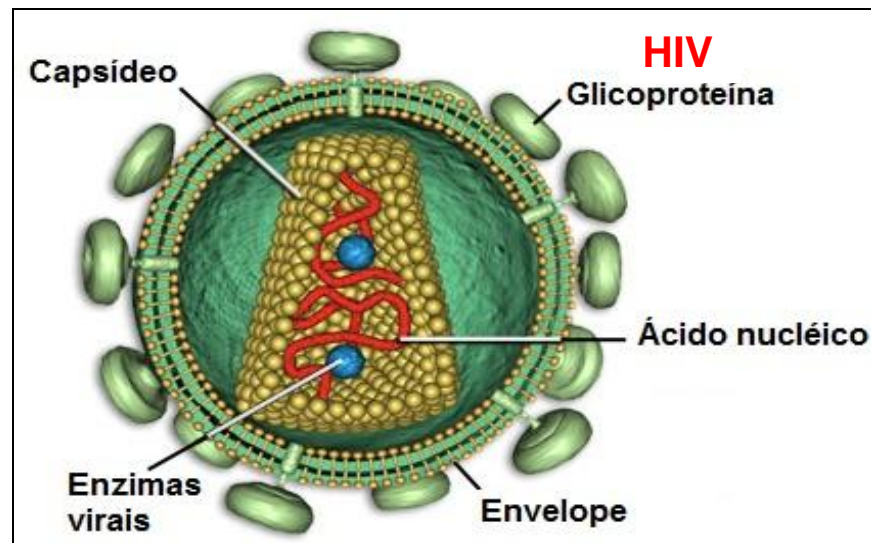


Figura 3: Representação esquemática da estrutura do HIV, evidenciando o envelope, o capsídeo, o ácido nucleico e as enzimas do vírus (Fonte: <http://1.bp.blogspot.com/-M9EuWSpZQRQ/TdruoHzvTFI/AAAAAAAAAA e8/gtdBzYGwhNs/s1600/virus+fig1.jpg>).

O gene *gag* é responsável por codificar as proteínas virais da matriz (p17), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p7/p9). O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral gp 120 e gp 41, responsáveis pela primeira interação do HIV-1 a molécula CD4 da célula alvo e, por fim, o gene *pol* codifica uma poliproteína precursora, que após clivagem proteolítica origina as enzimas virais transcriptase reversa (TR), protease (PR) e integrase (IN) (CONNOR; HO, 1992).

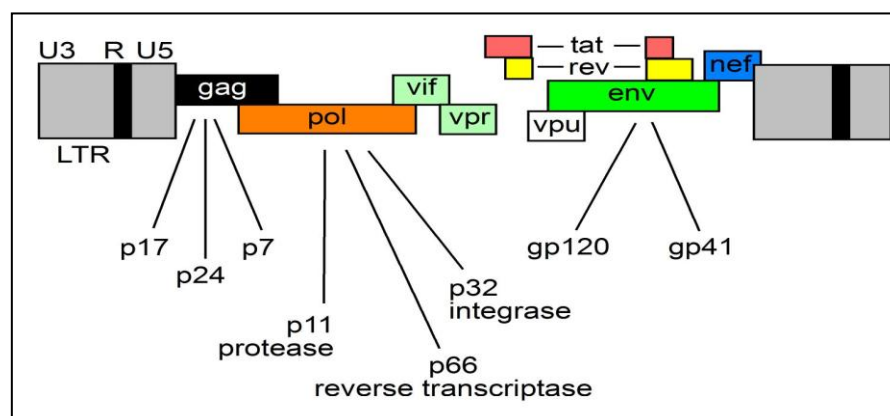


Figura 4: Representação esquemática do genoma do HIV, evidenciando os genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) e seus respectivos produtos proteicos (Fonte: Adaptado de <http://hivbook.com/tag/viral-gen>).

1.6 Ciclo Replicativo do HIV-1

As enzimas virais TR, PR e IN são fundamentais no ciclo replicativo do HIV-1 (Figura 5). Após a infecção do HIV-1 na célula, a transcriptase reversa atua na síntese de DNA, a partir do RNA viral. No entanto, devido à ausência de capacidade de reparo de DNA, a TR é incapaz de corrigir erros que ocorrem durante a retrotranscrição, o que leva a uma alta taxa de mutações no genoma viral (CONNOR; HO, 1992).

A integrase é importante para incorporação do DNA viral ao DNA da célula do hospedeiro. Dessa forma, o DNA viral integrado passa a ser denominado provírus. O DNA proviral funciona como molde para a formação de novas partículas virais, as quais são transcritas juntamente com o DNA da célula hospedeira, quando esta for ativada para a transcrição dos seus próprios genes (CONNOR; HO, 1992; MULDER; CHAKRABARTI; MUESING, 2002). Estudos já demonstraram que existe correlação direta entre o DNA proviral e os vírus encontrados no plasma, os quais podem ser quantificados pelos testes de carga viral (CHUN et al., 2011).

A protease está envolvida no processo de clivagem das poliproteínas precursoras do HIV-1, possibilitando a formação de proteínas essenciais para a montagem de novos vírus, durante o brotamento viral (GAVIN; YOGEN, 2002).

Na fase do brotamento ocorre a curvatura da membrana celular, conduzida pelo complexo de proteína *gag*, levando a formação de um broto. Em seguida, as glicoproteínas virais codificadas pelo *env* são incorporadas e, um novo vírus é liberado para o plasma (FREED, 1998).

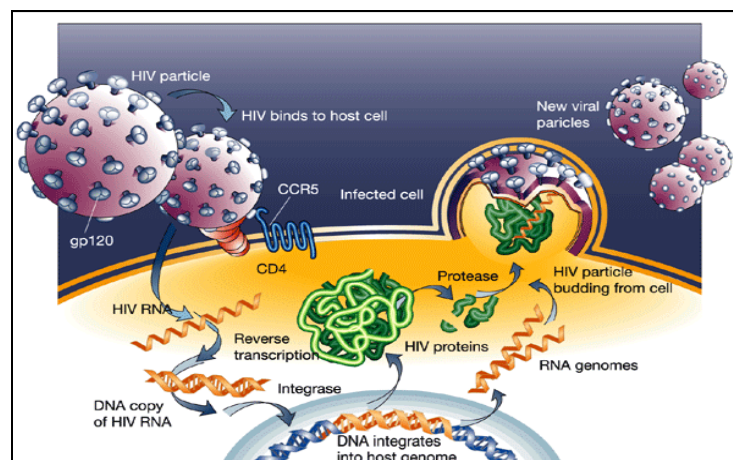


Figura 5: Representação esquemática do ciclo replicativo do HIV evidenciando as etapas de entrada, replicação e saída do HIV durante o ciclo replicativo (Fonte: Adaptado de WEISS, 2001).

1.7 Variabilidade genética

O HIV-1 apresenta alta variabilidade genética resultante de vários fatores, como, por exemplo, elevada taxa de replicação, com produção de cerca de 10^{10} partículas virais por dia e alto índice de mutação viral por ciclo replicativo (ROBERTS et al., 1989). Estas mutações ocorrem devido a substituições, deleções e inserções durante a transcrição do RNA em cDNA, com ausência de mecanismos de reparo da TR (NOWAK, 1992). Consequentemente, podem ser gerados vírus com proteínas não funcionais, ou ainda, vírus com capacidade de responder às alterações da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico ou pelo tratamento antirretroviral (CLAVEL et al., 1989; PULSINELLI; TEMIN, 1991; COFFIN, 1992).

O elevado número de mutações no genoma do HIV-1 contribui para a formação de populações virais com características genéticas semelhantes em um mesmo indivíduo, denominadas de *quasispecies* (EIGEN, 1996, COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997). Outro fator importante na variabilidade viral é a formação de recombinações genéticas entre dois vírus, podendo ser do mesmo subtipo ou de subtipos diferentes, que infectam a mesma célula simultaneamente, durante a replicação viral, produzindo as formas recombinantes circulantes, do inglês, *Circulating Recombinant Forms* (CRF) (ZHUANG et al., 2002; NAJERA et al., 2002).

Baseado no genoma completo do HIV-1, as variantes podem ser divididas em três grupos: M (“major”/maior), O (“outlier”/divergente), e N (“non-M non-O”/nem M nem O). O grupo M é o responsável pela maioria das infecções em todo o mundo, sendo subdividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e por subsubtipos (A1, A2, A3, F1 e F2) (ROBERTSON et al., 2000; HEMELAAR, 2012). No entanto, como prova que variantes virais estão em constante surgimento, foi descoberta no Centro-Oeste da África, o quarto grupo do HIV-1, denominado grupo P (PLANTIER et al., 2009).

O subtipo C do grupo M predomina na pandemia mundial, uma vez que este é o mais prevalente na África subsaariana e no Sudeste asiático, locais onde se concentram a maioria dos casos de HIV-1 do mundo (BUONAGURO; TORNESELLO; BUONAGURO, 2007). O grupo O e o grupo N está presente na minoria das infecções na África Centro-Occidental (HEMELAAR, 2012).

No Brasil, ocorre o predomínio do subtipo B do HIV-1, o qual também representa a principal forma genética na Europa ocidental e central, nas Américas e na Austrália (BUONAGURO; TORNESELLO; BUONAGURO, 2007). No entanto, dentro do território brasileiro, diferentes distribuições de subtipos foram relatadas, sendo o subtipo B mais frequente nas regiões Sudeste, Centro Oeste e Nordeste, seguido pelo subtipo F, considerado o principal subtipo não-B circulante no país. Na região Sul do Brasil a prevalência do subtipo C é maior que no restante do país, podendo ultrapassar 50% dos casos (BRASIL, 2014).

1.8 Monitoramento e Tratamento

O arsenal biotecnológico utilizado no combate ao HIV tem proporcionado, por meio do diagnóstico, monitoramento e tratamento, melhor expectativa e qualidade de vida aos pacientes infectados pelo vírus. No entanto, muitas pessoas ainda não possuem conhecimento da importância de procurar um serviço especializado ou, não tem acesso à assistência e tratamento, ou ainda, não possuem conhecimento da existência da própria infecção.

O monitoramento da infecção pelo HIV após o diagnóstico é crucial para o aumento da sobrevivência do paciente, pois com o auxílio dos exames periódicos laboratoriais e clínicos, são obtidas informações para o correto manejo do tratamento. A contagem de CD4+, que avalia o estado imunológico dos indivíduos infectados e o exame de Carga Viral, que quantifica o RNA plasmático do HIV, são exames utilizados para monitorar a evolução da doença, estimar o prognóstico, avaliar a indicação de início do tratamento e estabelecer o risco de progressão para aids (MURRI et al., 2006; ZACCARELLI et al., 2009).

O Departamento de DST/Aids e Hepatites Virais do Ministério da Saúde fornece insumos aos laboratórios da rede pública que realizam os exames de Contagem de Linfócitos T CD4+/CD8, Carga Viral e Genotipagem no Brasil. O exame de Genotipagem pesquisa mutações em códons específicos associados a resistência aos antirretrovirais, possibilitando o monitoramento da resposta a terapia antirretroviral (TARV) (BRASIL, 2015a).

O SISCEL (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais de CD4/CD8 e Carga Viral) e o SISGENO (Sistema de Informação para Rede de Genotipagem) são

sistemas informatizados, criados pelo Ministério da Saúde, a fim de controlar e armazenar todas as informações referentes ao cadastro e histórico dos pacientes infectados pelo HIV, facilitando o acesso aos profissionais da saúde, para melhor avaliação do paciente (BRASIL, 2015b; BRASIL, 2015c).

O Brasil fornece tratamento gratuito para pessoas que vivem com HIV/aids desde 1996, pelo Serviço Único de Saúde (SUS). O índice de mortalidade no país como um todo, tem apresentado queda significativa nos últimos anos, o qual passou de 6,1 óbitos para cada 100 mil habitantes em 2004 para 5,7 em 2013, representando uma queda de 6,6% (BRASIL, 2014). Atualmente o Brasil apresenta ampla cobertura de tratamento antirretroviral, com aproximadamente 50% das pessoas vivendo com HIV recebendo TARV, enquanto que a média global é de 40% (UNAIDS, 2015; WHO, 2015a). Conseqüentemente, esse impacto da melhoria do acesso ao tratamento tem aumentado os casos de pacientes crônicos e o aparecimento de variantes virais resistentes ao tratamento (BRASIL, 2013b).

1.9 Antirretrovirais

1.9.1 Classes de drogas

Na ausência de uma vacina contra o HIV, o tratamento antirretroviral (TARV) tem como objetivo controlar a infecção pelo HIV e promover o aumento da expectativa e qualidade de vida do paciente. Atualmente, os antirretrovirais aprovados pela U.S. *Food and Drug Administration* (FDA), atuam em diferentes momentos do ciclo replicativo, bloqueando a ligação, entrada, replicação ou maturação do HIV na célula hospedeira (FAUCI, 1988; HUTCHINSON, 2001).

As drogas antirretrovirais com ação na transcrição reversa do ciclo replicativo do HIV, são divididas em dois grupos: os inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos ou nucleotídeos (ITRNs) e os não-análogos de nucleosídeos (ITRNNs). Os ITRNs são medicamentos estruturalmente semelhantes aos nucleotídeos verdadeiros (adenosina, citocina, timina e guanosina), que competem pela ligação no sítio ativo da TR. No entanto, devido a ausência de 3'OH quando incorporados ao DNA atuam como terminadores de cadeia (ROBBINS et al., 1998). Os ITRNs aprovados são: abacavir (ABC), didanosina (ddl), emtricitabina

(FTC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), zalcitabina (ddC), zidovudina (AZT), tenofovir (TDF) (HIV TREATMENT, 2015).

Os ITRNNs agem pela ligação a um sítio alostérico da TR, que induz uma mudança conformacional enzimática, bloqueando sua ação e, inibindo a síntese de DNA (SPENCE, 1995). Os tipos de ITNNs são: etravirina (ETV), delavirdina (DLV), efavirenz (EFV), nevirapina (NVP), rilpirina (RPV) (HIV TREATMENT, 2015).

Os antirretrovirais inibidores de protease (IPs) agem diretamente na protease inibindo a fragmentação proteolítica das poliproteínas e, conseqüentemente, a formação de novas partículas virais (CLAVEL; HANCE, 2004). Os IPs aprovados são: amprenavir (APV), atazanavir (AZT), darunavir (TMC114), fosamprenavir (FPV), indinavir (IDV), lopinavir (LPV), nelfinavir (NFV), ritonavir (RTV), saquinavir (SQV) e tipranavir (TPV) (HIV TREATMENT, 2015). Baixas dosagens de ritonavir com IPs proporcionam maior biodisponibilidade dos mesmos, além de diminuir o risco de mutações e resistência viral (MOYLE; BACK, 2001; SCOTT, 2005).

Os antirretrovirais que inibem a entrada do HIV na célula alvo são conhecidos como inibidores de fusão (IF) e inibidores de correceptores (ICR). Os IFs agem inibindo a gp41, impossibilitando a fusão do envelope viral à célula hospedeira. A enfuvirtida (T20 ou ENF) é o único IF aprovado, sendo utilizado no tratamento anti-HIV-1 em terapias de resgate (MOORE; DOMS, 2003; IDEMYOR, 2005). Outro medicamento alternativo para pacientes com falha terapêutica é o maraviroque, o qual é um ICR que atua antagonizando o correceptor CCR5, evitando as interações celulares e entrada do HIV na célula (PUGACH et al., 2008).

Os inibidores de integrase (IIN) são antirretrovirais que bloqueiam a integrase do HIV-1, a fim de evitar a integração do cDNA ao genoma da célula hospedeira. Em 2007 foi aprovado o primeiro inibidor de integrase, o raltegravir. Recentemente foi aprovado outro IIN, o dolutegravir, aumentando o número de medicamentos disponíveis no tratamento do HIV (NAIR; CHI, 2007; BAILLY; COTELLE, 2015).

1.9.2 Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (HAART)

O início do tratamento antirretroviral (TARV) do HIV deve seguir o padrão da Terapia Antirretroviral Altamente Ativa, do inglês, *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), o qual deve incluir combinações de pelo menos três drogas diferentes e duas classes distintas de antirretrovirais, sendo geralmente dois ITRN/ITRN associados a um ITRNN ou a um IP com RTV (IP/r) (BRASIL, 2013b).

A terapia tripla de antirretrovirais representa o tratamento mais eficaz atualmente na infecção pelo HIV, pois promove melhor supressão da replicação viral dentro do organismo, com rápido declínio da carga viral, fortalecendo o sistema imunológico no combate a infecções, além de, diminuir a morbidade e mortalidade das pessoas vivendo com HIV/aids (PENNING, 2012; BRASIL, 2013b; WHO, 2015a).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda o início da terapia de ARV para pacientes sintomáticos; pacientes assintomáticos com contagem de células TCD4+ inferior ou igual a 500 células/mm³; gestantes e para pacientes com contagem de TCD4+ superior a 500 células/mm³ nos seguintes casos: coinfeção pelo vírus da hepatite B (VHB) com indicação de tratamento para a hepatite B, neoplasias não definidoras de aids com indicação de quimioterapia ou radioterapia, doença cardiovascular estabelecida ou risco cardiovascular, coinfeção com o Vírus da Hepatite C e carga viral do HIV acima de 100.000 cópias/mL. No entanto, esses critérios do Ministério da Saúde, vem acompanhados do estímulo de tratamento imediato a todos os indivíduos vivendo com HIV/aids, independente da contagem de linfócitos T CD4, a fim de diminuir a transmissão do HIV (BRASIL, 2013b).

Contudo, a adesão ao tratamento e os riscos de efeitos adversos em longo prazo devem ser considerados. A supressão viral deve ser completa para a efetividade do tratamento, caso a supressão seja parcial, podem surgir vírus resistentes aos antirretrovirais, levando a falha virológica e insucesso do HAART (HOGG et al., 2006; RICHMAN, 2006; BRASIL, 2013b).

1.9.3 Falha terapêutica

Os parâmetros utilizados para a detecção da falha terapêutica são: carga viral do HIV, contagem de linfócitos T CD4+ e a ocorrência de eventos clínicos. A falha virológica é definida por carga viral plasmática detectável após seis meses do início do medicamento ou modificação da terapia antirretroviral, ou por detecção do RNA do HIV nos indivíduos que mantinham carga viral indetectável durante o tratamento (BRASIL, 2013b).

A detecção precoce da falha virológica previne o acúmulo de mutações de resistência que podem comprometer a eficácia do uso de novos esquemas terapêuticos (HAMMER et al., 2006). Além disso, a identificação da falha virológica o quanto antes, também evita prejuízos imunológicos e risco de progressão de doenças (BRASIL, 2013b).

Os fatores relacionados à falha aos antirretrovirais são: baixa adesão ao tratamento (devido à complexidade posológica e à ocorrência de efeitos adversos); potência virológica insuficiente; fatores farmacológicos que resultem em má absorção ou eliminação acelerada dos medicamentos e resistência viral, sendo o último um dos principais fatores que contribuem para a perda da supressão plasmática do RNA do HIV (falha virológica) em pacientes durante o tratamento (DIAZ, 2011; BRASIL, 2013b).

1.9.4 Resistência aos antirretrovirais

A resistência do HIV aos ARVs se desenvolve como um mecanismo de seleção natural. A pressão seletiva do meio ambiente em que o vírus vive seleciona cepas virais mais adaptadas ao meio, que predominarão na presença de ARVs. Essas modificações virais resultam de mutações que ocorrem diariamente no genoma viral devido à alta taxa de replicação viral e ausência de mecanismo de reparo da enzima TR (HO et al., 1995; DIAZ, 2011).

As mutações relacionadas à resistência atingem genes fundamentais envolvidos no ciclo replicativo do HIV, comprometendo o *fitness* viral (capacidade de adaptação replicativa do vírus a um determinado ambiente) (QUINONES-MATEU et al., 2000). No entanto, as mutações compensatórias e o acúmulo de mutações, podem conduzir a recuperação do *fitness*, além de comprometer o uso de outras

drogas, pelo desenvolvimento de resistência cruzada (LIU; SHAFER, 2006; VAN MAARSEVEEN et al., 2006).

As mutações de resistência são identificadas comparando o genoma viral com um vírus selvagem. Entretanto, a alta variabilidade do HIV não permite a existência de uma cepa selvagem padrão. Dessa forma, para estudos de mutação e resistência aos ARVs, são utilizadas sequências de referência, como por exemplo, a sequência HXB2 do subtipo B do HIV-1, por conter os aminoácidos mais comuns em cada posição desse subtipo (KORBER et al., 2015).

A resistência associada aos ARVs pode ser classificada em resistência primária ou resistência secundária. A resistência primária consiste na presença de cepas resistentes em indivíduos que não fizeram uso de medicamento prévio, as quais podem ter sido obtidas por transmissão ou por mutações espontâneas (GRANT et al., 2002). A resistência secundária é definida pela emergência de mutações de resistência selecionadas durante a pressão seletiva exercida frente ao uso dos antirretrovirais. Os dois tipos de resistências reduzem a susceptibilidade aos ARV e comprometem o uso futuro de esquemas terapêuticos (SHAFER, 2002).

1.9.5 Teste de genotipagem para resistência aos antirretrovirais

A falha terapêutica indica a necessidade da realização do teste de genotipagem, o qual permite determinar a eficácia do tratamento e auxiliar no manejo clínico de pacientes infectados pelo HIV, otimizando a escolha do esquema de resgate (BAXTER et al., 2000; TURAL et al., 2002; BRASIL, 2013b).

O teste de genotipagem baseia-se na identificação de mutações associadas à resistência, pelo sequenciamento de genes específicos do HIV que codificam os principais alvos da terapia (SHAFER, 2002). A genotipagem é uma técnica difundida mundialmente, mas não fornece o nível diretamente da susceptibilidade viral aos ARVs, sendo a interpretação realizada por consultas a listas de mutações de resistência ou por algoritmos de interpretação informatizados, que estabelecem o perfil de resistência ou suscetibilidade as drogas, de acordo com as mutações encontradas no gene viral (LIU; SHAFER, 2006).

O algoritmo do Programa da Universidade de Stanford (Stanford HIV Drug Resistance Database) e o algoritmo do Programa de Interpretação Brasileira de

Genotipagem são exemplos de ferramentas de bioinformática, utilizadas na avaliação das mutações de resistência, a partir de diferenças com a sequência consenso do subtipo B do HIV-1. A construção dos algoritmos de interpretação genotípica é um processo complexo, que requer permanente atualização, podendo ser encontradas variações consideráveis entre os diferentes algoritmos disponíveis (RAVELA et al., 2003).

No Brasil, o teste de genotipagem disponível na RENAGENO do Ministério da Saúde, determina as mutações no genoma viral pelo sequenciamento de uma porção da região *pol* do HIV-1, que inclui o gene completo da protease e cerca de dois terços do gene que codifica a transcriptase reversa, principais alvos da TARV. Atualmente, a RENAGENO é composta de 22 laboratórios executores e um de resgate, distribuídos pelo território brasileiro (BRASIL, 2015a).

1.9.6 Mutações de resistência

O conhecimento do perfil de mutações associadas a resistências aos antirretrovirais contribui para a escolha de uma terapêutica mais eficiente e segura. As mutações de resistência do HIV podem ser classificadas em principais ou primárias e acessórias ou secundárias, encontradas nas diferentes classes de medicamentos.

As mutações principais são capazes de reduzir a suscetibilidade à determinada droga. As acessórias são capazes de reduzir a suscetibilidade viral à droga quando em combinação com a mutação principal ou podem melhorar o *fitness_viral*, prejudicado em ocasião da mutação primária. As mutações podem variar, sendo mutação principal para uma droga e acessória para outra (SHAFER, 2002).

As mutações de resistência são identificadas pela letra do aminoácido da sequência de referência, seguida pelo número da posição do códon em que ocorreu a mutação e da letra referente ao aminoácido da mutação. O M184V é um exemplo de mutação, no qual M é o aminoácido metionina que foi trocado pelo aminoácido V (valina), na posição 184 do códon.

O número de mutações necessárias para comprometer a atividade de um antirretroviral, a facilidade de seleção de uma determinada mutação de resistência ou o impacto de cada mutação na eficácia do ARV, estão relacionados à barreira

genética de resistência aos antirretrovirais. Um medicamento que necessita de várias mutações de resistência para perder seu efeito apresenta alta barreira genética (BEERENWINKEL et al., 2005; DEFORCHE et al., 2008; DIAZ, 2011).

Os IPs potenciados com ritonavir, geralmente apresentam alta barreira genética. As mutações de resistência desta classe levam a uma alteração na conformação tridimensional da PR reduzindo o tempo de ligação entre os IPs e a PR, favorecendo a ligação do substrato natural do vírus. No entanto, as mutações aos IPs podem diminuir o tempo de clivagem da PR, reduzindo o *fitness* viral, que pode ser revertida com o surgimento de mutações acessórias (CHEN et al., 1995; NIJHUIS et al., 1998; DIAZ, 2011).

As mutações principais mais frequentes aos IPs são: D30N, M46I/L, I50L/V, V82A/F/S/T, I84V, L90M e acessórias L10F/I/R/V; K20M/R; L24I/V; L33F; M36I; L47V; G48V; F53L; I54L/M/V; L63P; A71T/V; G73S; N88D/S (JOHNSON et al., 2006; SHAFER; SCHAPIRO, 2008; MUNHOZ, 2011). As mutações da protease nos códons 46, 54, 82 e 90 também estão entre as mais frequentes (SHAFER; SCHAPIRO, 2008).

As mutações de resistência aos ITRNs causam aumento da capacidade da TR em discriminar entre o ITRN e o substrato natural, levando a incorporação de uma citosina ao invés do 3TC, por exemplo. As mutações aos ITRNs também podem aumentar a habilidade da enzima em eliminar o ITRN ligado ao final da cadeia que impede seu alongamento. Mutações análogas de tímida (TAM) elevam a retirada do AZT enquanto outras mutações como 65R, 74V e 184V diminuem a retirada de AZT, revertendo a resistência adquirida (DIAZ, 2011).

Entre as mutações de resistência aos ITRNs a M184V é a mais comum, causando resistência a 3TC e FTC, além das mutações da via TAM: M41L, I210W e T215Y, D67N, K70R, T215F e K219Q/E, conferindo susceptibilidade reduzida a todos ITRNs e resistência cruzada (WHTCOMB et al., 2003; SHAFER; SCHAPIRO, 2008).

As mutações responsáveis pela resistência aos ITRNNs promovem alteração conformacional estrutural da enzima, impedindo a ligação dos ITRNNs (SARAFIANOS et al., 2004; DIAZ, 2011). Esta classe de ARV confere altos níveis de resistência e apenas uma única mutação (K103N), leva a resistência de toda classe,

demonstrando uma barreira genética baixa. As mutações da transcriptase reversa K103N e Y181C são as mutações de resistência aos ITRNNs mais encontradas (SHAFER; SCHAPIRO, 2008).

Mutações também podem levar a resistência aos medicamentos novos alvos, IF, ICR e II, empregados em terapia de resgate. As mutações no códon 36 e 45 da GP 41 são as responsáveis pela resistência a classe IF, enquanto mutações da alça V3 da GP 120 associam a resistência ao ICR maraviroque e a resistência aos II são causadas por mutações no sítio de ligação da enzima integrase (SHAFER; SCHAPIRO, 2008).

O perfil de mutação de resistência apresenta ampla heterogeneidade e o conhecimento e estudo dessas mutações pode ser de extrema importância no estabelecimento de esquemas terapêuticos. No entanto, outros fatores também devem ser relevantes nesta avaliação, como por exemplo, a presença de coinfeções.

1.10 Vírus da Hepatite B (VHB)

O VHB pertence à família *Hepadnaviridae* e possui tropismo pelas células hepáticas. A partícula infecciosa do VHB é envelopada e tem, aproximadamente, 42nm de diâmetro, com nucleocapsídeo icosaédrico de 27 nm e genoma circular constituído de DNA de fita dupla incompleta (FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

O genoma do VHB é constituído por cerca de 3.200 nucleotídeos, sendo uma das cadeias do DNA curta, de polaridade positiva e, outra longa de polaridade negativa, apresentando quatro fases abertas de leitura, do inglês, *Open Reading Frame* (ORF): (1) Pré-S1/PréS2/S, que codificam proteínas como o antígeno de superfície (HBsAg), (2) Pré-Core/Core, responsáveis pela síntese das proteínas do capsídeo (HBcAg) e do antígeno e (HBeAg); (3) P, que codifica enzima DNA-polimerase RNA-dependente com atividade transcriptase reversa e (4) X, responsável pela síntese da proteína X que parece exercer funções regulatórias (FIGURA 6) (GROB, 1998; FIELDS; KNIPE; HOWLEY, 2007).

O mecanismo de infecção do VHB na célula hospedeira ainda não foi bem elucidado, endocitose e fusão direta do envelope viral com a membrana plasmática são propostas como potenciais vias. Durante a replicação viral, o VHB utiliza a

transcrição reversa, semelhante aos retrovírus, etapa possivelmente responsável pela diversidade de mutações encontradas no genoma do vírus (URBAN et al., 2010).

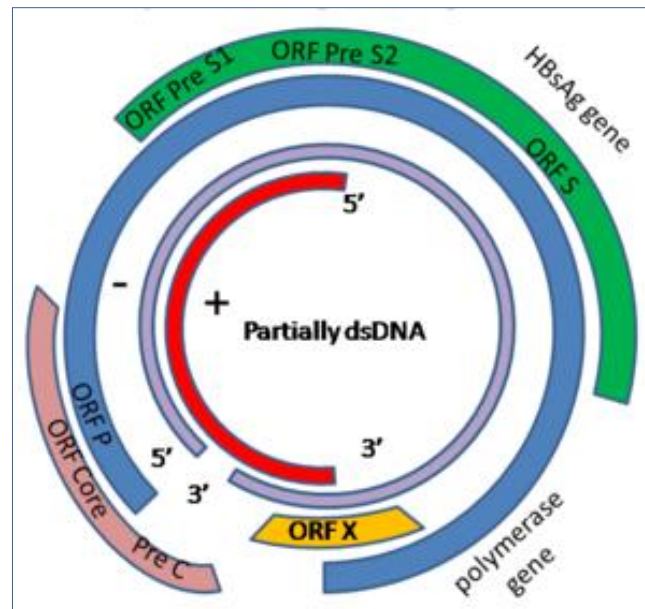


Figura 6: Representação esquemática do genoma do VHB, evidenciando as regiões codificadoras (ORFs) do vírus (Fonte: adaptado de Beards, 2007).

1.10.1 Epidemiologia do VHB

Atualmente estima-se que 240 milhões de pessoas são cronicamente infectadas com o VHB em todo o mundo (definido como o antígeno de superfície do VHB positivo, pelo menos, 6 meses), com prevalência na África Subsaariana e na Ásia Oriental, atingindo 5-10% da população adulta. As altas taxas de infecções crônicas pelo VHB também são encontrados na Amazônia e nas regiões Sul da Europa Central e Oriental (WHO, 2015b).

Devido às vias comuns de transmissão, a prevalência do VHB é relativamente alta em indivíduos com HIV, estima-se que aproximadamente 10% das pessoas infectadas pelo HIV possuem Hepatite B crônica. Em países em que ambos os vírus são altamente endêmicos, a taxa de coinfeção VHB/HIV pode atingir 20% (MODI; FELD, 2007; GERETTI et al., 2010).

1.10.2 Evolução clínica da infecção pelo VHB

Na infecção aguda pelo VHB ocorre aumento dos níveis séricos das aminotransferases, caracterizado por sintomas inespecíficos de uma infecção viral. Em seguida, pode ocorrer a forma icterícia da doença, com posterior melhora do quadro clínico. O DNA viral pode ser detectado em baixos níveis no indivíduo por um período de um mês a partir da infecção. Os marcadores sorológicos característicos da doença são variáveis, podem ser detectados ou não, dependendo da fase da doença (ASPINALL et al., 2011). O pico de detecção dos antígenos virais (HBeAg e HBsAg) acontecem após seis semanas da infecção. O primeiro anticorpo a ser detectado na infecção pelo VHB é contra o antígeno core do VHB (HBcAg), primeiramente da classe IgM e mais tarde os anticorpos IgG-AntiHBc (BRASIL, 2011).

A infecção crônica do VHB pode ser dividida em quatro fases: tolerância imunológica, imunorreação, portador inativo e reativação (BRASIL, 2011). Na primeira fase, observa-se a presença do AgHBe, altos níveis séricos de DNA-VHB, níveis normais ou minimamente elevados de alanina aminotransferases (ALT) e fígado normal ou somente atividade histológica mínima e fibrose escassa. A segunda fase é caracterizada por uma diminuição dos níveis de DNA viral, elevação da ALT e necroinflamação hepática. A terceira fase é caracterizada pela soroconversão do AgHBe para anti-HBe (negatividade do AgHBe e a positividade para anti-HBe), níveis indetectáveis ou baixo de DNA-VHB, níveis normais de ALT e fibrose mínima. Na quarta fase, como o DNA viral persiste nos hepatócitos, pode ocorrer a reativação do VHB com reaparecimento da doença hepática tanto espontaneamente como induzida por atividade imunossupressora. A reativação da replicação viral pode ocorrer devido a reativação do vírus selvagem com uma reversão do estado AgHBe positivo, ou muito mais frequentemente, com a replicação competente de variantes VHB que evitam a expressão do AgHBe. Nesta fase ocorre a negatividade do AgHBe com níveis de DNA-VHB séricos detectáveis, elevação da ALT e moderada ou severa necroinflamação com valores distintos de fibrose na biópsia hepática (FATTOVICH; BORTOLOTTI; DONATO, 2008).

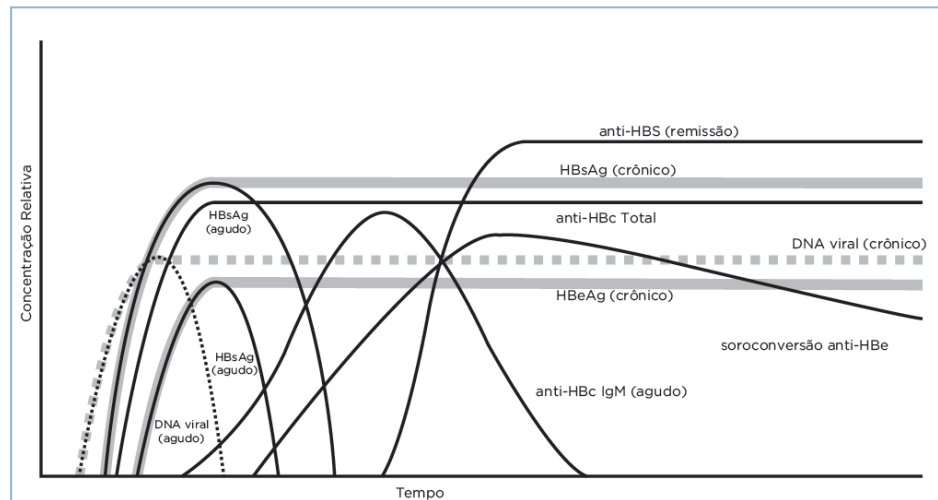


Figura 7: Representação esquemática evidenciando a evolução dos marcadores do VHB nas infecções agudas e crônicas (Fonte: Adaptado de Brasil, 2015).

1.10.3 Tratamento da Infecção pelo VHB

O tratamento da infecção pelo VHB tem como objetivo reduzir o risco de progressão da doença hepática como cirrose, hepatocarcinoma e, conseqüentemente o óbito, além de buscar a negatização sustentada dos marcadores de replicação viral ativa e carga viral. Dessa forma, o nível de HBV-DNA, enzimas hepáticas e marcadores sorológicos, são os parâmetros analisados durante o tratamento para inferir na eficácia terapêutica (BRASIL, 2011).

A indicação terapêutica do Ministério da Saúde no combate ao VHB abrange os seguintes fármacos: interferon-alfa e interferon-alfa peguilado, os quais possuem mecanismos de ação antivirais, antiproliferativos e imunomoduladores e os análogos de nucleotídeo ou nucleotídeos (lamivudina e entecavir; tenofovir e adefovir, respectivamente) que possuem como alvo a DNA polimerase do VHB e podem agir por inibição direta, através de ligação competitiva com substratos endógenos ou a partir da incorporação ao DNA viral, atuando como cadeias terminadoras (FUNG et al., 2011).

A decisão do tratamento e a escolha dos fármacos dependem de fatores virais (carga viral e marcadores da infecção pelo VHB), do hospedeiro (fibrose e enzimas hepáticas), da condição do paciente (virgem de tratamento ou experimentado com antivirais) e da presença de coinfeções (BRASIL, 2011).

No tratamento da coinfeção HIV/VHB devem ser incluídos pacientes com evidências de replicação viral (HBeAg reagentes e/ou HBVDNA $\geq 10^4$ cópias/ml ou ≥ 2.000 UI/ml) e/ou elevações de ALT e/ou AST; pacientes sem evidências de replicação viral, mas com alterações histológicas considerando fibrose F1 a F4 de acordo com o escore METAVIR (ISHAK et al., 1995), ou pacientes sem fibrose, mas com atividade necroinflamatória superior ou igual a A2 e pacientes com cirrose (BRASIL, 2011).

1.11 Evolução da coinfeção HIV/VHB

A história natural da infecção pelo VHB pode ser alterada pelo HIV. Em pacientes coinfectados HIV/VHB podem ser observados: aumento da replicação do VHB e baixa taxa de clareamento viral espontâneo; formas mais grave de doenças hepáticas (cirrose e carcinoma hepatocelular), elevando a mortalidade relacionada ao fígado; diminuição da soroconversão de anticorpos contra HbeAg (anti-Hbe) e HBsAg (anti-HBs); aumento da reativação do VHB, pior resposta do VHB ao tratamento com interferon-alfa e presença do “VHB oculto”, caracterizado por carga viral baixa de HBV-DNA e HBsAg não reagente (COHEN STUART, 2009; THIO, 2002; THIO, 2009; BRASIL, 2011).

Estudos de mutação de resistência sugerem que padrões de mutações do VHB também podem estar associados com a coinfeção ao HIV (AUDSLEY, et al., 2010). Um exemplo é a resistência a lamivudina do VHB, a qual é mais comum e se desenvolve mais rápido em pacientes coinfectados HIV/VHB (MIALHES et al., 2007). Dessa forma, a presença do HIV pode favorecer a resistência a medicamentos do VHB.

Contudo, a influência do VHB sobre a evolução do HIV é pouco compreendida. Embora a coinfeção HIV/VHB parece favorecer o pior prognóstico do paciente e interferir nos resultados da TARV, pouco é conhecido sobre a influência do VHB na emergência de mutações de resistência do HIV, bem como o perfil de mutações do HIV em coinfectados HIV/VHB (BRASIL, 2011).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 565 p.

ASPINALL, E. J. et al. Hepatitis B prevention, diagnosis, treatment and care: a review. **Occup. Med.**, v. 61, n. 8, p. 531-540, Dec. 2011.

AUDSLEY, J. et al. HBV mutations in untreated HIV-HBV co-infection using genomic length sequencing. **Virology**, v. 405, n. 2, p. 539-547, Sept. 2010.

BAILES, E. et al. Hybrid origin of SIV in chimpanzees. **Science**, v. 300, n. 5626, p. 1713-1713, June 2003.

BAILLY, F., COTELLE, P. The preclinical discovery and development of dolutegravir for the treatment of HIV. **Expert. Opin. Drug Discov.**, v. 10, n. 11, p. 1243-1253, Sept. 2015.

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, May 1983.

BARRE-SINOUSSE, F. HIV as the cause. **Lancet**, v. 348, n. 9019, p. 31-35, July 1996.

BARTLETT, J. G. Update in infectious diseases. **Ann. Intern. Med.**, v. 131, n. 4, p. 285-292, Aug. 2000.

BAXTER, J. D. et al. A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. **AIDS**, v.14, n.9, p.83-93, June 2000.

BEERENWINKEL, N. et al. Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance. **J. Infect. Dis.**, v. 191, n. 11, p.1953-1960, June 2005.

BERGELSON, J. M. et al. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. **Science**, v. 255, n. 5052, p. 1718-1720, Mar. 1992.

BOUKOUR, S. et al. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. **J. Thromb. Haemost.**, v. 4, n. 2, p. 426-435, Jan. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico DST/AIDS**. Brasília, 2007, 48 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para o tratamento da hepatite viral crônica B e coinfeções**. Brasília, 2011, 113 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico HIV/AIDS**. Brasília, 2013a, 68 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos**. Brasília, 2013b, 227 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Boletim epidemiológico DST/AIDS e Hepatites Virais 2014**. Brasília, 2014, 95p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Rede Nacional de Laboratórios de Genotipagem**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/2012/51642>>. Acesso em: 30 Aug. 2015a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Sistema de Controle de Exames Laboratoriais da**

Rede Nacional de Contagem de Linfócitos CD4+/CD8+ e Carga Viral (Siscel).

Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/siscel>>. Acesso em: 30 Aug. 2015b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Sistema e Informação para Rede de Genotipagem (Sisgeno)**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/2010/sistema-e-informacao-para-rede-de-genotipagem-sisgeno>>. Acesso em: 30 Aug. 2015c.

BUONAGURO, L; TORNESELLO, M.L; BUONAGURO, F.M. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenetic and therapeutic implications. **J. Virol.**, v. 81, n. 19, p. 10209-10219, Oct. 2007.

CDC. Pneumocystis pneumonia-Los Angeles. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 30, n. 21, p. 1-3, June 1981.

CDC. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. **MMVR Recomm. Rep.**, v. 18, p. 1-19, Dec. 1992.

CHEN, Z. et al. Three-dimensional structure of a mutant HIV-1 protease displaying cross-resistance to all protease inhibitors in clinical trials. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 37, p. 21433-21436, Sept. 1995.

CHEN, Z. et al. Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. **J. Virol.**, v. 70, n. 6, p. 3617-3627, June 1996.

CHUN, T. et al. Relationship Between Residual Plasma Viremia and the Size of HIV Proviral DNA Reservoirs in Infected Individuals Receiving Effective Antiretroviral Therapy. **J. Infect. Dis.**, v. 204, n. 1, p. 135-138, Feb. 2011.

CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science**, v. 233, n. 4761, p. 343-346, July 1986.

CLAVEL, F. et al. Genetic recombination of human immunodeficiency virus. **J. Virol.**, v. 63, n. 3, p. 1455-1459, Apr. 1989.

CLAVEL, F.; HANCE, A. J. HIV drug resistance. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, n. 10, p. 1023-1035, Mar. 2004.

COFFIN, J. M. Genetic diversity and evolution of retroviruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.176, p.143-164, Feb. 1992.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E. **Retroviruses**. New York: Cold Spring Harbor, 1997.

COHEN STUART, J. W. et al. Occult hepatitis B in persons infected with HIV is associated with low CD4 counts and resolves during antiretroviral therapy. **J. Med. Virol.**, v. 81, n. 3, p.441-445, Mar. 2009.

CONNOR, R. I.; HO, D. D. Etiology of AIDS: biology of human retrovirus. In: DEVITA, V.T. **AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1992. p. 13-85.

CORBET, S. et al. *Env* sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. **J. Virol.**, v. 74, n. 1, p. 529-534, Jan. 2000.

CULLEN, B. R. Regulation of HIV-1 gene expression. **FASEB J.**, v. 5, n. 10, p. 2361-2368, July 1991.

DEFORCHE, K. et al. Modelled in vivo HIV fitness under drug selective pressure and estimated genetic barrier towards resistance are predictive for virological response. **Antivir. Ther.**, v. 13, n. 3, p. 399-407, Feb. 2008.

DIAZ, R.S. **Guia para manejo de resistência antirretroviral**. Brasil: Permanyer Brasil publicações, 2011, 231 p.

EIGEN, M. On the nature of virus quasispecies. **Trends Microbiol.**, v.4, n.6, p.216-218, June 1996.

FATTOVICH, G.; BORTOLOTTI, F.; DONATO, F. G. Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors. **J Hepatol.**, v. 48, n. 2, p. 335-352, Feb. 2008.

FAUCI, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science**, v. 239, n. 4840, p. 617-22, Feb. 1988.

FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields' Virology**. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2007. 91 p.

FLAUJAC, C.; BOUKOUR, S.; CRAMER-BORDÉ, E. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. **Cell. Mol. Life. Sci.**, v. 67, n. 4, p. 545-556, Feb. 2010.

FREED, E. O. HIV-1 Gag Proteins: Diverse functions in the Virus Life Cycle. **Virology**, v. 251, n. 1, p. 1-15, Nov. 1998.

FUNG, J. et al. Entecavir monotherapy is effective in suppressing hepatitis B virus after liver transplantation. **Gastroenterology**, v. 141, n. 4, p. 1212-1219, Oct. 2011.

GALLO, R. C. 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, May 1984.

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, v. 397, n. 6718, p. 436-441, Feb. 1999.

GAVIN, P.J.; YOGEV, R. The role of protease inhibitor therapy in children with HIV infection. **Paediatr. Drugs**, v. 4, n. 9, p. 581-607, Aug. 2002.

GERETTI, A. M. et al. Detection of highly prevalent HBV co-infection among HIV-seropositive persons in Ghana. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 9, p. 3223-3230, Sept. 2010.

GOTTLIEB, S. M. Pneumocystis Pneumonia--Los Angeles. **Am. J. Public. Health.**, v. 96, n. 6, p. 980-981, June 2006.

GRANT, R. M. et al. Time trends in primary HIV-1 drug resistance among recently infected persons. **JAMA.**, v. 288, n. 2, p. 181-188, July 2002.

GREVE, J. M. et al. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 839-847, Mar. 1989.

GROB, P. J. Hepatitis B pathogenesis and treatment. **Vaccine**, v. 16, p. S11-S16, Nov. 1998.

HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, Jan. 2000.

HAMMER, S. M. et al. Treatment for adult HIV infection: 2006 recommendations of the International AIDS Society-USA panel. **JAMA.**, v. 14, n. 3, p. 827-843, Aug. 2006.

HEMELLAAR, J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. **Trends Mol. Med.**, v. 18, n. 3, p. 182-192, Mar. 2012.

HIV TREATMENT. **FDA-Approved HIV Medicines**. Disponível em: <<https://aidsinfo.nih.gov/education-materials/fact-sheets/21/58/fda-approved-hiv-medicines>>. Acesso em: 08 Aug. 2015.

HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123-126, Jan. 1995.

HOGG, R. S. et al. Emergence of drug resistance is associated with an increased risk of death among patients first starting HAART. **PLoS Med.**, v. 3, n. 9, p. e356, Sept. 2006.

HUTCHINSON, J. The biology and evolution of HIV. **Annu. Rev. Anthropol.**, v. 30, p. 85-108, Oct. 2001.

IDEMYOR, V. Human immunodeficiency virus (HIV) entry inhibitors (CCR5 specific blockers) in development: are they the next novel therapies?. **HIV Clin. Trials**, v. 6, n. 5, p.272-277, Oct. 2005.

ISHAK, K. et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. **J. Hepatol.**, v. 22, n. 6, p. 696-699, June 1995.

JOHNSON, V. A. et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: Fall 2006. **Top HIV Med.**, v. 14, n. 3, p. 125-130, Sept. 2006.

KARON, J. M. 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.**, v. 41, n. RR-18, p.1-29, Dec. 1992.

KEELE, B. F. et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic hiv-1. **Science**, v. 313, n. 5786, p. 523-526, July 2006.

KORBER, B. et al. HIV sequence database. **Numbering positions in HIV relative to HXB2CG Human Retroviruses and AIDS**. Disponível em: <<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/REVIEWS/HXB2.html>>. Acesso em: 30 July 2015.

LEVY, J. A. **HIV and the pathogenesis of AIDS**. Washington: AMS Press, Inc, 2007. 644 p.

LIU, T. F.; SHAFER, R. W. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, n. 11, p. 1608-1618, June 2006.

LOCATELLI, S.; PEETERS, M. Cross-species transmission of simian retroviruses: How and why they could lead to the emergence of new diseases in the human population. **AIDS**, v. 26, n. 6, p. 659-673, Mar. 2012.

METCALFE, P. Platelet antigens and antibody detection. **Vox Sang.**, v. 87, n. 1, p. 82-86, June 2004.

MIALHES, P. et al. Impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on the natural history of hepatitis B virus (HBV) and HIV coinfection: relationship between prolonged efficacy of HAART and HBV surface and early antigen seroconversion. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, n. 5, p. 624-632, July 2007.

MODI, A. A.; FELD, J. J. Viral hepatitis and HIV in Africa. **AIDS Rev.**, v. 9, n. 1, p. 25-39, Mar. 2007.

MOORE, J. P.; DOMS, R. W. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 19, p. 10598-10602, Sept. 2003.

MORIS, A. et al. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I restricted HIV-1 antigen presentation. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2648-2654, Apr. 2004.

MOYLE, G. J.; BACK, D. Principles and practice of HIV-protease inhibitor pharmacoenhancement. **HIV Med.**, v. 2, n. 2, p. 105-113, Apr. 2001.

MULDER, C. F; CHAKRABARTI, L. A; MUESING, M. A. Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 30, p. 27489-27493, Aug. 2002.

MUNHOZ, L. S. R. **Perfil de resistência genotípica do HIV-1 em pacientes com falha na terapia antiretroviral atendidos pela Rede nacional de Genotipagem (RENAGENO) na região de Botucatu, SP-Brasil.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

MURRI, R. et al. Is moderate HIV viremia associated with a higher risk of clinical progression in HIV-infected people treated with highly active antiretroviral therapy: evidence from the Italian cohort of antiretroviral-naive patients study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 41, n. 1, p. 23-30, Jan. 2006.

NAIR, V.; CHI, G. HIV integrase inhibitors as therapeutic agents in AIDS. **Rev. Med. Virol.**, v. 17, n. 4, p. 277-95, Aug. 2007.

NAJERA, R. et al. Genetic recombination and its role in the development of the HIV-1 pandemic. **AIDS**, v. 16, n. 4, p. 3-16, Feb. 2002.

NIJHUIS, M. et al. Stochastic processes strongly influence HIV-1 evolution during suboptimal protease-inhibitor therapy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 24, p. 14441-14446, Nov. 1998.

NOWAK, M. A. Variability of HIV Infections. **J. theor. Biol.**, v. 155, n. 1, p. 1-20, May 1992.

OLINGER, G. G. et al. Cellular factors influence the binding of HIV type 1 to cells. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 18, n. 4, p. 259-267, Apr. 2002.

PENNINGS, P. S. Standing genetic variation and the evolution of drug resistance in HIV. **Plos Computational Biology**, v. 8, n. 6, p. 1-13, June 2012.

PLANTIER, J. C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nat. Med.** v. 15, n. 8, p. 871-872, Aug. 2009.

PUGACH, P. et al. Neutralizing antibody and anti-retroviral drug sensitivities of HIV-1 isolates resistant to small molecule CCR5 inhibitors. **Virology**, v. 377, n. 2, p. 401-407, Aug. 2008.

PULSINELLI, G. A.; TEMIN, H. M. Characterization of large deletions occurring during a single round of retrovirus vector replication: novel deletion mechanism involving errors in strand transfer. **J. Virol.**, v. 65, n. 9, p. 4786-4797, Sept. 1991.

QUINONES-MATEU, M. E. et al. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. **J. Virol.**, v. 74, n. 19, p. 9222-9233, Oct. 2000.

RAVELA, J. et al. HIV-1 protease and reverse transcriptase mutation patterns responsible for discordances between genotypic drug resistance interpretation algorithms. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 33, n. 1, p. 8-14, May 2003.

RICHMAN, D. D. Antiviral drug resistance. **Antiviral Res.**, v. 71, n. 2-3, p. 117-121, Sept. 2006.

ROBBINS, B. L. et al. Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9-*R*-(2-Phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA), Bis(isopropoxyloxymethylcarbonyl)PMPA. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 42, n. 3, p. 612-617, Mar. 1998.

ROBERTS, D. L. et al. Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. **Mol. Cell Biol.**, v. 9, n. 2, p. 469-476, Feb. 1989.

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

SARAFIANOS, S. G. et al. Taking aim at a moving target: designing drugs to inhibit drug-resistant HIV-1 reverse transcriptases. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 14, n. 6, p. 716-730, Dec. 2004.

SCHROEDER, M. L.; RAYNER, H. L. Red cell, platelet and white cell antigens. In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe's clinical hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 616-650.

SCOTT, J. D. Simplifying the treatment of HIV infection with ritonavir-boosted protease inhibitors in antiretroviral-experienced patients. **Am. J. Health Syst. Pharm.**, v. 62, n. 8, p. 809-815, May 2005.

SELIK, R. M. et al. Revised Surveillance Case Definition for HIV Infection - United States, **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 65, n. RR03, p. 1-10, Apr. 2014.

SHAFER, R. W. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, n. 2, p. 247-277, Apr. 2002.

SHAFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. **AIDS Rev.**, v. 2, n. 10, p. 67-84, June 2008.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 1, n. 1, p. 1-41, Sept. 2011.

SOUNDRAVALLY, R.; HOTI, S. L. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. **Hum. Immunol.**, v. 68, n. 12, p. 973-973, Dec. 2007.

SPENCE, R. A. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. **Science**, v. 267, n. 5200, p. 988-993, Feb. 1995.

STAUNTON, D. E. et al. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. **Cell**, v. 56, n. 5, p. 849-853, Mar. 1989.

THIO, C. L. et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). **Lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1921-1926, Dec. 2002.

THIO, C. L. Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection. **Hepatology**, v. 49, n. 5, p. S138-S145, Jan. 2009.

TURAL, C. et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. *AIDS*, v.16, n.2, p.209-218, Jan. 2002.

UNAIDS. **2014 GLOBAL STATISTICS**. Disponível em: <http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/factsheet/2014/20140716_FactSheet_en.pdf>. Acesso em: 28 May 2015.

UNAIDS. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://unaids.org.br/estatisticas/>> Acesso em: 25 May 2015.

URBAN, S. et al. The replication cycle of hepatitis B virus. *J. Hepatol.*, v. 52 , n. 2, p. 282-284, Nov. 2009.

VAN HEUVERSWYN, F. et al. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*, v. 444, n. 7116, p. 164-164, Nov. 2006.

VAN MAARSEVEEN, N. M. et al. An increase in viral replicative capacity drives the evolution of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the absence of drugs. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, v. 42, n. 2, p. 162-168, June 2006.

VERDICHIO-MORAES, C. F. et al. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C vírus. *J. Med. Virol.*, v. 81, n. 4, p. 757-759, Feb. 2009.

WHITCOMB, J.M. et al. Hypersusceptibility to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in HIV-1: clinical, phenotypic and genotypic correlates. *AIDS*, v. 16, n. 15, p. 41-47, Oct. 2002.

WHO. World Health Organization. **HIV/AIDS**. Disponível em: <http://www.who.int/topics/hiv_aids/en/>. Acesso em: 29 Oct. 2015a.

WHO. World Health Organization. **Hepatitis B**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>>. Acesso em: 30 Oct. 2015b.

WICKHAM, T. J. et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 309-319, Apr. 1993.

ZACCARELLI, M. et al. Effect of suppressing HIV viremia on the HIV progression of patients undergoing a genotype resistance test after treatment failure. **Infection**, v. 37, n. 3, p. 203- 209, June 2009.

ZHUANG, J. et al. Human immunodeficiency virus type 1 recombination: rate, fidelity, and putative hot spots. **J. Virol.**, v. 76, n. 22, p. 11273-11282, Nov. 2002.

Capítulo II: Artículo 1

Mutações de resistência na protease e transcriptase reversa do HIV-1 em pacientes coinfetados com os Vírus da Hepatite C (VHC) e Hepatite B (VHB)

Artigo completo para revisão e submissão à periódico científico

Natália Mirele Cantão¹, Andressa Alves de Almeida Cruz¹, Lauana Fogaça², Alexandre Naime Barbosa³, Giovanni Faria Silva⁴, Adriana Camargo Ferrasi¹, Maria Inês de Moura Campos Pardini^{1,4}, Guilherme Targino Valente², Rejane Maria Tommasini Grotto^{1,2}

1-UNESP, Faculdade de Medicina de Botucatu, Divisão Hemocentro, Laboratório de Biologia Molecular.

2-UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.

3-UNESP, Faculdade de Medicina, Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem.

4-UNESP, Faculdade de Medicina, Departamento de Clínica Médica.

RESUMO

Os antirretrovirais (ARVs) utilizados na terapêutica anti-HIV-1 tem demonstrado efetividade no controle da progressão da infecção e aumento na sobrevida do paciente. No entanto, estes benefícios podem ser comprometidos pelo desenvolvimento de resistência às drogas, consequência da emergência de variantes resistentes. As mutações de resistência aos Inibidores de Transcriptase Reversa e de Protease em pacientes mono infectados pelo HIV-1 já estão bem documentadas. Contudo, ainda não existem estudos na literatura que avaliem o polimorfismo genético do HIV-1 circulante em pacientes co infectados com VHB ou VHC. Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar sequências genéticas que codificam a protease e a transcriptase reversa do HIV-1 em pacientes co infectados HIV/VHB ou HIV/VHC, atendidos no SAE de infectologia “Domingos Alves Meira” e, na Divisão de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica - FMB, Unesp. Foram analisadas 86 sequências do HIV-1, divididas em dois grupos, Grupo 1 (G1) constituído por 52 pacientes mono infectados pelo HIV e, Grupo 2 (G2) constituído por 34 sequências obtidas de pacientes co infectados HIV/VHB ou HIV/VHC. A genotipagem foi realizada pelo kit comercial Trugene HIV-1 Genotyping Kit (Siemens Healthcare Diagnostics). As sequências obtidas foram submetidas ao Algoritmo de Interpretação de Resistência Genotípica da Universidade de Stanford (HIVdb) e a subtipagem foi realizado pelo REGA HIV-1 Subtyping Tool e pelo programa RIP 3.0. As sequências também foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas no *SeaView*, as quais foram editadas no *Figtree*. Os resultados demonstraram semelhança nas características virológicas, imunológicas e clínicas nos dois grupos estudados, assim como nos tipos de mutações encontradas. No entanto, o G1 apresentou maior frequência nas mutações de resistência e maior resistência viral aos ARVs em relação ao G2. Na análise filogenética foi observado agrupamentos das cepas de co infectados HIV/VHB ou HIV/VHC separados dos mono infectados pelo HIV-1 e maior taxa de mutações nas sequências dos mono infectados HIV-1. Estes resultados condizentes sugerem que a presença de vírus hepatotróficos, na infecção pelo HIV-1, possa estar exercendo alguma pressão seletiva que dificulte a emergência de mutações de resistência aos ARVs.

Palavras-chave: HIV, mutações, resistência, VHB, VHC.

INTRODUÇÃO

O HIV-1 exibe alta variabilidade genética (ROBERTS et al., 1989) resultante da elevada taxa de replicação viral, incorporação errônea de nucleotídeos durante a replicação do vírus, ausência de atividade de reparo da enzima transcriptase reversa e, fenômenos de recombinação genética (HO et al., 1995; SHAFER; KANTOR; GONZALES, 2000). Assim, um paciente infectado apresenta variantes de HIV-1 geneticamente distintas caracterizando as *quasispecies* (COFFIN; HUGHES; VARMUS, 1997).

Polimorfismos genéticos nas regiões genômicas do HIV-1 resultam de mutações, deleções e inserções que ocorrem aleatoriamente, ao acaso, durante a replicação do vírus (WALKER, 1999). Mutações deletérias resultam na geração de vírus inviáveis, no entanto, algumas alterações genéticas podem ser transmitidas às gerações futuras, perpetuando-se (QUINONES-MATEU et al., 2000).

Embora a variabilidade genética do HIV-1 ocorra em todas as suas regiões gênicas (LI et al., 2015) quando a mesma está presente nas regiões codificadoras das enzimas protease e transcriptase reversa assume particular importância, uma vez que os medicamentos de primeira linha para o tratamento da infecção pelo HIV-1 visam inibir estas duas enzimas virais (FAUCI, 1988; HUTCHINSON, 2001), essenciais ao ciclo replicativo do vírus (CONNOR; HO, 1992).

Algumas destas alterações genéticas podem conduzir ao escape da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico do hospedeiro ou, à redução da suscetibilidade aos antirretrovirais (KORBER et al., 2001). Na maioria dos casos, em pacientes não tratados, essas variantes resistentes às drogas apresentam mutações que afetam o *fitness* viral, prejudicando-o. No entanto, uma pressão seletiva ineficiente de medicamentos antirretrovirais podem, rapidamente, selecionar mutações compensatórias que favorecem a recuperação da capacidade replicativa do vírus caracterizando a emergência de variantes resistentes (QUINONES-MATEU et al., 2000; LIU; SHAFER, 2006).

As mutações de resistência aos Inibidores de Transcriptase Reversa e Inibidores de Protease em pacientes monoinfectados pelo HIV-1 já estão muito bem documentadas na literatura nacional e internacional (SHAFER; SCHAPIRO, 2008; ANTUNES et al., 2014; NUNES et al.; DUDLEY et al., 2014; PAQUET et al., 2014).

No entanto, a maioria dos estudos conduzidos para avaliação da emergência de variantes resistentes exclui pacientes coinfectados com VHB e/ ou VHC (KIPTOO et al., 2013; WENSING et al., 2014; SEU et al., 2015). Por outro lado, adaptações genéticas do HIV decorrentes da presença de outros agentes já foram documentadas (ORTIZ et al., 2009). Contudo, ainda não existem estudos na literatura científica que avaliem o polimorfismo genético presente nas variantes HIV-1 circulantes em pacientes coinfectados com VHB ou VHC.

Neste contexto, a finalidade deste estudo foi avaliar sequências genéticas que codificam a protease e a transcriptase reversa do HIV-1 em pacientes coinfectados HIV/VHB e HIV/VHC.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Seleção dos Pacientes

Foram incluídos neste estudo 86 pacientes atendidos no Serviço de Atendimento Especializado (SAE) de infectologia “Domingos Alves Meira” e, na Divisão de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, selecionados de acordo com a entrada no serviço e, que obedeceram aos critérios de inclusão. Os pacientes foram divididos em dois grupos sendo Grupo 1 (G1) constituído por 52 sequências de HIV-1 de pacientes mono infectados pelo HIV, com solicitação médica para realização do teste de genotipagem do HIV-1 e, Grupo 2 (G2) constituído por 34 sequências de pacientes coinfectados HIV/VHB ou HIV/VHC convidados a participar do estudo no momento de seu comparecimento no serviço para coleta de sangue destinada aos exames de rotina para o acompanhamento da infecção.

Os critérios de inclusão para G1 foram mono infecção pelo HIV-1, ausência de coinfeções (VHB, VHC, tuberculose); para G2 coinfeção HIV/VHB ou HIV/VHC confirmada por testes de biologia molecular. Os critérios de exclusão foram pacientes que apresentaram qualquer outra doença hepática, gestantes e com idade inferior a 18 anos.

As 52 sequências do HIV-1 dos pacientes que constituíram G1 foram selecionadas a partir de um banco de sequências do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, ponto executor da Rede Nacional de

Genotipagem (RENAGENO), que obedeciam os critérios de inclusão, selecionadas com o programa *Cluster Database at High Identity with Tolerance (CD-HIT)* (LI; GODZIK, 2006), que forma *clusters* com as sequências com 90% de semelhança e, as representa por apenas uma, considerada modelo daquele grupo.

As 34 sequências de HIV-1 do G2 representaram todos os pacientes que obedeceram os critérios de inclusão e, entraram no serviço durante o período do estudo.

Metodologia

As amostras foram obtidas a partir do material excedente da coleta de sangue de rotina realizada para o exame de carga viral do HIV-1, segundo solicitação médica, estocadas no repositório de amostras do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP.

RNA viral foi extraído do plasma utilizando o *QIAamp Viral RNA mini kit* (Qiagen Inc., CA). A amplificação da região codificadora das enzimas protease e transcriptase reversa foi realizada por RT-PCR com o *Trugene HIV-1 Genotyping Kit* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA), resultando um único fragmento de 1,3Kb, o qual foi sequenciado com base no princípio *CLIP* utilizando o *TruGene HIV-1 genotyping Kit* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA). Todas as reações foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. A eletroforese foi conduzida no *Long Read Tower* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA).

O software *OpenGene DNA Sequencing System* (Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Tarrytown, NY, USA), foi utilizado na aquisição e análise das sequências, segundo as instruções do fabricante.

As sequências obtidas foram submetidas ao Algoritmo de Interpretação de Resistência Genotípica da Universidade de Stanford (HIVdb: Genotypic Resistance Interpretation Algorithm) (<http://hivdb.stanford.edu/>) versão 7.0, que analisa as diferenças nas sequências de acordo com o painel de resistência da *International AIDS Society – USA*.

O subtipo viral foi obtido utilizando as sequências em formato *fasta* (posição 2253 – 3290 no HXB2) utilizando o *REGA HIV-1 Subtyping Tool*, versão 3.0,

(<http://regatools.med.kuleuven.be/typing/v3/hiv/typingtool/>), uma ferramenta que utiliza análises filogenéticas para identificar o subtipo de uma sequência específica e analisa a recombinação usando métodos de *bootscanning*, e pelo programa RIP 3.0 (SIEPEL et al., 1995) disponível em *Los Alamos Recombinant Identification Program* (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/RIP/RIP.html>), que identifica a recombinação em uma sequência por meio do cálculo de sua similaridade com o alinhamento de sequências de diferentes subtipos do HIV-1.

Dados clínicos e parâmetros laboratoriais foram coletados do prontuário médico eletrônico dos pacientes. Dados de adesão terapêutica também foram avaliados, segundo a retirada regular dos medicamentos na farmácia hospitalar, o que caracterizou adesão e a ausência de retirada foi considerado não adesão.

Análise dos Dados

Análises estatísticas univariadas para comparação entre os grupos foram conduzidas utilizando o teste exato de *Fisher* com nível de significância de 0,05.

Foi realizada análise filogenética das sequências dos grupos 1 e 2. Para esta análise foi realizada busca de um grupo externo (*outgroup*) utilizando a ferramenta *BLAST* disponível no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) disponível no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> e dados obtidos da literatura científica. Assim, para as análises filogenéticas foi utilizado o Vírus da Imunodeficiência Símia, do inglês, *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) como grupo externo.

As sequências de nucleotídeos das regiões codificadoras da protease e transcriptase reversa foram alinhadas utilizando o software *SeaView*, pelo alinhador *Muscle* e, as de proteínas o *Clustal*. Uma vez alinhadas, a ferramenta *Gblocks* online, editor de alinhamento (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html) foi utilizada para remover *gaps* e interferentes. A avaliação da perda de sinal filogenético foi realizada pelo teste de saturação com o software *Danbe*. Para o cálculo de modelo evolutivo foi utilizado o *Jmodeltest2*. Com os modelos calculados gerou-se a árvore filogenética de máxima verossimilhança no *SeaView*, setando os parâmetros calculados utilizando os softwares anteriormente citados e, para visualizar e editar as árvores utilizou-se o *Figtree*.

RESULTADOS

As características dos pacientes incluídos neste estudo estão representadas na tabela 1. Os resultados mostraram que G1 e G2 apresentam constituição semelhante quanto à sexo, idade, carga viral, contagem de células T CD4, presença de aids, tratamento utilizado e subtipo viral.

A tabela 2 mostra o número total de mutações encontradas segundo a região genômica avaliada, PR ou TR. Maior número de pacientes sem nenhuma mutação associada à resistência foi encontrado em G2 ($P < 0,05$). Maior número de mutações de resistência evidenciado em G1 ($P < 0,05$).

Quando analisada a distribuição das mutações de resistência, em G1 e G2, segundo o número de classes de antirretrovirais, maior número de mutações de resistência comprometendo duas e três classes de drogas foi encontrado no grupo de mono infectados pelo HIV-1 (G1) em relação ao grupo de co infectados com VHB ou VHC (G2) ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Os resultados mostram que quanto às mutações de resistência aos ITRNs, a M184V foi a mais frequente, presente em 48 (92,3%) pacientes de G1 e, 11 (32,3%) pacientes em G2. Em relação as mutações associadas aos timidínicos (TAMs), foram detectadas em 48 (92,3%) pacientes de G1, com a presença de uma ou mais das mutações M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F e K219Q/E e, 9 (26,5%) pacientes de G2. Em relação às vias mutacionais das TAMs, 22 (45,8%) pacientes de G1 apresentavam mutações pertencentes a apenas uma dessas vias mutacionais, sendo estas distribuídas em 10 (20,8%) na via TAM 1 (M41L, L210W e T215Y), e 12 (25%) na via TAM 2 (D67N, K70R, T215F e K219Q/E). Os 26 (54,2%) pacientes restantes que apresentaram TAMs possuíam mutações das vias TAM 1 + 2. Em G2 88,9% das sequências com TAMs apresentavam mutações apenas a uma via, sendo 1 (11,1%) a via TAM 1 e, 7 (77,8%) a TAM 2, com apenas 1 (11,1%) sequência apresentando mutações das vias TAM 1+2. As TAMs K70R e L210W foram encontradas juntas em apenas 2 (4,7%) de G1.

Entre as mutações de resistência aos ITRNNs as mais frequentes encontradas no G1 foram K103N e G190A ambas presentes em 20 (37%) pacientes, resultados. Em G2 a mutação K103N também foi a mais encontrada, presente em 5 (14,7%) pacientes.

Quanto às mutações de resistência aos IPs, as mutações principais ou primárias mais frequentes encontradas no G1 foram I54V (26 - 50%), V82A (23 - 44,2%), M46I (22 - 42,3%) e L90M (21 - 40,4%). Comparado ao G1, a frequência destas mutações foi inferior em G2: I54V (1 - 2,9%), V82A (4 - 11,7%), M46I (3 - 8,8%) e L90M (21 - 40,4%).

No entanto, as mutações aos IPs mais frequentes no G2 foram mutações acessórias não encontradas em G1, como S37N (11 - 32,3%), I15V (9 - 26,5%) e M36I (8 - 23,5%). A mutação A71V foi a mutação acessória que prevaleceu em G1, presente em 24 (46,1%) pacientes, enquanto, em G2 a mesma foi observada em 1 (2,9%) paciente.

Em relação à resistência aos antirretrovirais os dados encontrados corroboram os achados relacionados à presença de mutações de resistência, evidenciando que a resistência às três classes de drogas (ITRN, ITRNN e IP) foi significativamente mais frequente em pacientes mono infectados pelo HIV (Tabela 4)

Os achados aqui obtidos quanto às mutações de resistência (Tabelas 2 e 3) e, resistência (Tabela 4) foram concordantes com a análise filogenética realizada. A árvore filogenética e os agrupamentos dos ramos (Figura 1) demonstrou que o grupo de co infectados com VHB ou VHC tendeu a formar agrupamentos (*clusters*) separados dos mono infectados pelo HIV-1. Nota-se, ainda, que a taxa de mutação encontrada tende a ser superior em pacientes mono infectados pelo HIV-1 quando comparados aos co infectados.

DISCUSSÃO

As características demográficas (sexo, idade), virológicas (carga viral, subtipo HIV), imunológicas (contagem de células T CD4) e clínicas (caso aids, tratamento antirretroviral) (Tabela 1) nos dois grupos estudados (mono infectados HIV-1 e co infectados HIV/VHB ou HIV/VHC) são concordantes com estudos anteriores encontrados na região de Botucatu (CORVINO et al., 2007) e em diferentes estados brasileiros (RODRIGUES et al., 2005; VARELLA et al., 2008; WALERIA-ALEIXO et al., 2008).

Os resultados mostraram que, em ambos os grupos, o maior número de mutações de resistência estava associada aos ITRNs (Tabela 2). Esta classe de

drogas foi muito utilizada no início da terapêutica antirretroviral, muitas vezes, em esquemas pouco eficazes, o que poderia explicar o grande número de variantes com estas alterações genéticas (CREAGH-KIRK et al., 1988; MOORE et al., 1991). Por outro lado, mutações que conduzem à resistência aos ITRNs tendem a desaparecer rapidamente na introdução de um esquema de resgate eficaz (SHAFER; SCHAPIRO, 2008), mas variantes viáveis portadoras destas mutações podem permanecer nas populações minoritárias, podendo reemergir (MELLORS et al., 2003; BRASIL, 2013).

Em relação às mutações de resistência associadas aos ITRNs, a M184V, relacionada à falha virológica precoce durante a terapia utilizando a Lamivudina (3TC), droga amplamente utilizada no Brasil, foi a mais frequente deste estudo (48 pacientes em G1, 92,3%), evidenciado pela alta resistência ao 3TC nos pacientes monoinfectados pelo HIV-1 (Tabela 4). Essa mutação é descrita na literatura brasileira como uma das mais frequentes em indivíduos infectados pelo HIV-1, oscilando de 60 a 80% (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2007; VARELLA et al., 2008; MUNHOZ, 2011). Entre os pacientes do grupo de coinfectados HIV/VHB ou HIV/VHC essa mutação foi menos frequente (11 pacientes, 32,3%), indicando menor frequência dessa mutação em cepas virais do HIV na presença de vírus hepatotrópicos.

Os resultados em relação as mutações associadas aos timidínicos (TAMs), detectadas em 48 (92,3%) pacientes de G1, estão de acordo com o evidenciado pela literatura segundo Rodrigues et al. (2005), Couto-Fernandez et al. (2005), Varella et al. (2008), Sa-Filho et al. (2008) e Waleria-Aleixo, et al. (2008). Estas mutações são selecionadas pelos análogos de timidina AZT e d4T e podem conferir redução da suscetibilidade a todos os ITRNs e resistência cruzada ao ABC, DDI e TDF (WHITCOMB et al., 2003). Em G2 as TAMs foram menos frequentes ao descrito na literatura, apenas em 9 (26,5%) pacientes, sugerindo mais uma vez um perfil diferencial na presença do VHB ou VHC.

Em relação às mutações de resistência aos ITRNs os dados aqui obtidos corroboram aos encontrados em estudos brasileiros (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; CAVALCANTI et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007; DE SA-FILHO et al., 2008; VARELLA et al., 2008). Essas mutações são selecionadas pelo uso de NVP e EFV,

levando a resistência a estas drogas (RHEE et al., 2006). Em G2 a mutação K103N foi a mais encontrada, presente em 5 (14,7%) pacientes, apresentando frequência inferior aos estudos em monoinfectados pelo HIV-1.

Quanto às mutações de resistência aos IPs, as mutações principais ou primárias mais frequentes encontradas no G1 foram I54V (26 - 50%), V82A (23 - 44,2%), M46I (22 - 42,3%) e L90M (21 - 40,4%). Estudos nacionais demonstraram as mutações M46I e L90M como as mais frequentes (RODRIGUES et al., 2005; COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; DE SÁ-FILHO et al., 2008) podendo ser mutações importantes para marcadores de resistência transmitida, devido à baixa prevalência em pacientes não tratados (OLIVEIROS, 2009). Comparado ao G1, a frequência destas mutações foi inferior no G2: I54V (1 - 2,9%), V82A (4 - 11,7%), M46I (3 - 8,8%) e L90M (21 - 40,4%).

No entanto, as mutações aos IPs mais frequentes em G2 foram mutações acessórias não encontradas em G1, como S37N (11 - 32,3%), I15V (9 - 26,5%) e M36I (8 - 23,5%). Estas mutações podem ser transmitidas ou emergir posteriormente as principais e, isoladamente, tem menor efeito na resistência, mas podem alterar a taxa de replicação viral (JOHNSON et al., 2006). A mutação A71V foi a mutação acessória que prevaleceu no G1, presente em 24 (46,1%) pacientes, enquanto, no G2 a mesma foi observada em 1 (2,9%) paciente, sendo A71T/V polimorfismos que ocorrem em 2-3% das pessoas não tratadas, mas que aumentam em pessoas que recebem inibidores de protease, e A71I/L mutações não-polimórficas que ocorrem em vírus com múltiplas mutações de resistência aos IP (RHEE et al., 2003).

O número de mutações de resistência observado nesse estudo foi, significativamente, superior em G1 ($P < 0,05$) (tabela 2). Da mesma forma, G1 apresentou maior comprometimento das classes dos antirretrovirais (tabela 3). A presença de uma ou mais mutações de resistência foram identificadas em 100% dos pacientes do G1, portanto, nenhum vírus selvagem foi observado nos monoinfectados pelo HIV-1. Em contrapartida, o G2 apresentou 7 (20,6%) dos pacientes sem mutações de resistência na PR e RT. A proporção de pacientes infectados pelo HIV, sem mutações na PR e RT, encontrada em estudos brasileiros, varia entre 2,8% e 6,8% vírus selvagem (CAVALCANTI et al., 2007; VARELLA et al., 2008; WALERIA-ALEIXO et al., 2008; TOLEDO et al., 2010; MUNHOZ, 2011).

Já foi demonstrado que a coinfeção pelo VHB ou VHC acelera a progressão da aids e, da doença hepática crônica (OCKENGA et al., 1997; TIO et al., 2002). No entanto, estudos já mostraram que a utilização da HAART foi associada com menor progressão da doença hepática de etiologia viral (BENHAMOU et al., 2001) e, com menor mortalidade dos pacientes coinfectados (QURISHI et al., 2003). Além disso, tem sido demonstrado que algumas coinfeções parasitárias podem alterar a dinâmica do HIV (CUADROS; GARCIA-RAMOS, 2012). Assim, os resultados deste estudo sugerem que parece estar existindo uma maior pressão para a emergência de variantes resistentes no grupo de pacientes mono infectados pelo HIV-1.

Uma abordagem nova e promissora é a utilização das informações contidas nos genomas dos patógenos para se inferir a dinâmica da evolução da sequência e da interação dos vírus hepatotróficos e o HIV-1. A análise filogenética das sequências do vírus HIV permite a abordagem de questões referentes à evolução da sequência do vírus, momento em que determinadas variantes foram introduzidas em uma população buscando integrar aspectos relevantes para a diversidade dos parasitas, como suas taxas de mutação e adaptação.

Os resultados obtidos pela análise filogenética corroboram os achados de que maior número de mutações está ocorrendo no grupo de mono infectados pelo HIV-1 (G1) uma vez que demonstra maior acúmulo de mutações neste grupo (Figura 1). Quando nota-se que as variantes virais obtidas de pacientes coinfectados agrupam-se separadamente daquelas obtidas de mono infectados pelo HIV-1 (Figura 1), conclui-se que as características evolutivas das variantes virais obtidas de coinfectados são distintas das oriundas de mono infectados, o que fortalece a hipótese de que os vírus hepatotróficos possam estar exercendo alguma pressão seletiva que dificulte a perpetuação de mutantes resistentes.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, D. A. et al. New Insights into the In Silico Prediction of HIV Protease Resistance to Nelfinavir. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 1-12, Jan. 2014.

BENHAMOU, Y. et al. Factors affecting liver fibrosis in human immunodeficiency virus– and hepatitis C virus–coinfected patients: impact of protease inhibitor therapy. **Hepatology**, v. 34, n. 2, p. 283-287, Aug. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos**. Brasília, 2013, 227 p.

CAVALCANTI, A. M. et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 785-792, Dec. 2007.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S.H.; VARMUS, H.E. **Retroviruses.**, New York: Cold Spring Harbor, 1997.

CONNOR, R. I.; HO, D. D. Etiology of AIDS: biology of human retrovirus. In: DEVITA, V.T. **AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention**. Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 1992. p. 13-85.

CORVINO, S. M. et al. Co-infecção HIV/HCV em pacientes de Botucatu e região. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 10, n. 4, p. 537-543, 2007.

COUTO-FERNANDEZ, J. et al. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 73-78, Feb. 2005.

CREAGH-KIRK, T. et al. Survival experience among patients with AIDS receiving zidovudine. Follow-up of patients in a compassionate plea program. **JAMA**, v. 260, n. 20, p. 3009-3015, Nov. 1988.

CUADROS, D. F.; GARCIA-RAMOS, G. Variable effect of co-infection on the HIV infectivity: Within-host dynamics and epidemiological significance. **Theor Biol Med Model.**, v. 9, n.9, p. 1-19, Mar. 2012.

DE SA-FILHO, D. J. et al. HIV type 1 pol gene diversity and antiretroviral drug resistance mutations in Santos, Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.**, v. 24, n. 3, p. 347-353, Mar. 2008.

DUDLEY, D. M. et al. Cross-clade simultaneous HIV drug resistance genotyping for reverse transcriptase, protease, and integrase inhibitor mutations by Illumina MiSeq. **Retrovirology.**, v. 11, n. 122, p. 1-15, Dec. 2014.

FAUCI, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science**, v. 239, n. 4840, p. 617-22, Feb. 1988.

HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123-126, Jan. 1995.

HUTCHINSON, J. The biology and evolution of HIV. **Annu. Rev. Anthropol.**, v. 30, p. 85-108, 2001.

JOHNSON, V. A. et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2009. **Top. HIV Med.**, v. 17, n. 5, p. 138-145, Dec. 2009.

KIPTOO, M. et al. HIV-1 drug resistance-associated mutations among HIV-1 infected drug-naïve antenatal clinic attendees in rural Kenya. **BMC Infect. Dis.**, v. 13, n. 517, p. 1-4, Nov. 2013.

KORBER, B. et al. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. **Br. Med. Bull.**, v. 58, n. 1, p. 19-42, 2001.

LI, G. et al. An integrated map of HIV genome-wide variation from a population perspective. **Retrovirology**, v. 12, n. 18, p. 1-16, Feb. 2015.

LI, W.; GODZIK, A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. **Bioinformatics.**, v. 22, n. 13, p. 1658-1659, July 2006.

LIU, T. F.; SHAFER, R. W. Web resources for HIV type 1 genotypic-resistance test interpretation. **Clin. Infect. Dis.**, v. 42, n. 11, p. 1608-1618, June 2006.

MEDEIROS, M. S. et al. Genotype testing and antiretroviral resistance profiles from HIV-1 patients experiencing therapeutic failure in northeast Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 11, n. 4, p. 390-394, Aug. 2007.

MELLORS, J. et al. Low frequency non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI)-resistant variants contribute to failure of efavirenz-containing regimens in NNRTI experienced patients with negative standard genotypes for NNRTI mutations. **Antivir. Ther.**, v. 8, n. 3, p. 134-134, Sept. 2003.

MOORE, J. P.; DOMS, R. W. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, n. 19, p. 10598-10602, Sept. 2003.

MUNHOZ, L. S. R. **Perfil de resistência genotípica do HIV-1 em pacientes com falha na terapia antiretroviral atendidos pela Rede nacional de Genotipagem (RENAGENO) na região de Botucatu, SP-Brasil.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

NUNES, E. R. M. et al. Analysis of HIV-1 Protease Gene Reveals Frequent Multiple Infections Followed by Recombination among Drug Treated Individuals Living in São Paulo and Santos, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 1-10, Jan. 2014.

OCKENGA, J. et al. Hepatitis B and C in HIV-infected patients: prevalence and prognostic value. **J. Hepatol.**, v. 27, n. 1, p. 18-24, July 1997.

OLIVEIROS, M.P.R. **Evolução das mutações de resistência aos inibidores de protease em pacientes infectados pelo HIV-1 tipo F.** 2009. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de São Paulo, 2009.

PAQUET, A. C. et al. A decade of HIV-1 drug resistance in the United States: trends and characteristics in a large protease/reversetranscriptase and co-receptor tropism database from 2003 to 2012. **Antivir. Ther.**, v. 19, n. 4, p. 435-441, Feb. 2014.

QUINONES-MATEU, M. E. et al. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. **J. Virol.**, v. 74, n. 19, p. 9222-9233, Oct. 2000

QURISHI, N. et al. Effect of antiretroviral therapy on liver-related mortality in patients with HIV and hepatitis C virus coinfection. **Lancet**, v.362, n.9397, p.1708-1713, Nov. 2003.

RHEE, S. et al. HIV RT and Protease Sequence Database. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 298-303, 2003.

ROBERTS, D. L. et al. Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. **Mol. Cell Biol.**, v. 9, n. 2, p. 469-476, Feb. 1989.

RODRIGUES, R. et al. Prevalence of ARV resistance mutations and impact of genotyping test in HIV patients with advance disease in Sao Paulo, Brazil. **J. Clin. Virol.**, v. 32, n. 4, p. 336-337, Jan. 2005.

SEU, L. et al. Characterization of HIV Drug Resistance Mutations Among Patients Failing First-Line Antiretroviral Therapy From a Tertiary Referral Center in Lusaka, Zamb. **J Med. Virol.**, v. 87, n. 7, p. 1149-1157, July 2015.

SHAFER, R. W.; KANTOR, R.; GONZALES, M. J. The genetic basis of HIV-1 resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. **AIDS Rev.**, v. 2, n. 4, p. 211-228, Feb. 2000.

SHAFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. **AIDS Rev.**, v. 10, n. 2, p. 67-84, Apr. 2008.

SIEPEL, A. C. et al. A computer program designed to screen rapidly for HIV type 1 intersubtype recombinant sequences. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.**, v. 11, n. 11, p. 1413-1416, Nov. 1995.

TIO, C. L. et al. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the Multicenter Cohort Study (MACS). **Lancet**, v. 360, n. 9349, p. 1921-1926, Dec. 2002.

TOLEDO, P. V. et al. HIV-1 genotypic resistance profile of patients failing antiretroviral therapy in Parana, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 14, n. 4, p. 360-371, Oct. 2010.

VARELLA, R. B. et al. Prevalence of resistance-associated mutations in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals failing HAART in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 12, n. 5, p. 380-384, Oct. 2008.

WALERIA-ALEIXO, A. et al. Drug resistance mutation (DRM) profile and accumulation kinetic in HIV+ individuals infected with subtype B and F failing highly active antiretroviral therapy (HAART) is influenced by different viral codon usage. **Antimicrob. Agents and Chemother.**, v. 52, p. 1-21, Oct. 2008.

WALKER, M. R; RAPLEY, R. **Guia de rotas na tecnologia de genes.** São Paulo: Atheneu, 1999. 334 p.

WENSING, A. M. et al. Special Contribution 2014 Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. **Top Antivir. Med.**, v. 22, n. 3, p. 642-650, June 2014.

WHITCOMB, J. M. et al. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. **J. Infect. Dis.**, v. 188, n. 7, p. 992- 1000, Sept. 2003.

YAHI, N. et al. Mutation L210W of HIV-1 reverse transcriptase in patients receiving combination therapy. Incidence, association with other mutations, and effects on the structure of mutated reverse transcriptase. **J. Biomed. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 507-513, Dec. 2000.

TABELAS

Tabela 1: Características demográficas, virológicas e clínicas dos pacientes incluídos no estudo (n=86), distribuídos em G1 (Mono infectados pelo HIV) e G2 (Coinfectados HIV/VHB ou HIV/VHC).

	G1 (N=52)	G2 (N = 34)
Característica		
Idade, anos [média (IQR)]*	41,5 (36,7-48,2)	44,5 (39,0-48,7)
Sexo, Masculino [N (%)]*	30 (57,7)	24 (70,5)
Carga Viral do HIV* [N (%)]		
Inferior a 10.000 cópias de RNA/mL	14 (26,9)	19 (29,4)
Superior a 10.000 cópias de RNA/mL	38 (73,1)	15 (73,5)
Contagem de Células TCD4*		
Inferior a 250 células/mm ³	31 (59,6)	16 (47,1)
Superior a 250 células/mm ³	21 (40,4)	18 (52,9)
Caso Aids**		
Sim	38 (73,1)	26 (76,5)
Não	14 (26,9)	08 (23,5)
Subtipo HIV***		
Subtipo B puro	37 (71,1)	29 (85,3)
Subtipo F	07 (13,5)	01 (02,9)
Outros	08 (15,4)	04 (11,8)
Tratamento Antirretroviral*#		
2ITRN + 1ITRNN	08 (15,4)	07 (20,6)
2ITRN + 1IP	31(59,6)	10 (29,4)
Outros	13 (25,0)	04 (11,8)

IQR, intervalo interquartil; ITRN, inibidor de transcriptase reversa análogo nucleosídeo; ITRNN, inibidor de transcriptase reversa não análogo nucleosídeo; IP, inibidor de protease. *informação retirada do prontuário médico do paciente. **De acordo com o critério CDC modificado (SELIK, 2014). ***Considerado B puro quando tanto a sequência da protease quanto da transcriptase reversa foram B; F quando ambas F e outros quando outro subtipo ou recombinante de B. #Do grupo de coinfectados 13 pacientes não puderam ser avaliados quando ao tratamento antirretroviral por não terem apresentado adesão ao tratamento.

Tabela 2: Número de mutações de resistência nas regiões genômicas codificadoras da protease e transcriptase reversa encontradas nos pacientes incluídos no estudo (n=86), distribuídos em G1 (Mono infectados pelo HIV) e G2 (Coinfectados HIV/VHB ou HIV/VHC).

	G1 (n=52)	G2 (n=34)
	N (%)	N (%)
Protease		
0	04 (7,7)*	09 (26,6)*
1	05 (9,6)	05 (14,7)
2	01 (1,9)	03 (8,9)
3	01 (1,9)	03 (8,9)
4	02 (3,8)	01 (2,9)
5 ou mais	39 (75,0)*	13 (38,2)*
Trascriptase Reversa		
Mutações associadas aos ITRN		
0	0	14 (41,3)
1	2 (3,8)	0
2	1 (1,9)	1 (2,9)
3	2 (3,8)	0
4	2 (3,8)	1 (2,9)
5 ou mais	45 (86,5)*	18 (52,9)*
Trascriptase Reversa		
Mutações associadas aos ITRNN		
0	5 (9,6)*	20 (58,8)*
1	8 (15,4)	7 (20,5)
2	10 (19,3)	3 (8,9)
3	7 (13,5)	2 (5,9)
4	13 (25,0)	2 (5,9)
5 ou mais	9 (17,3)	0

ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa Análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo ou nucleotídeo. *Diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) usando o Teste Exato de Fisher.

Tabela 3: Frequência de mutações de resistência pelo número de classe de antirretrovirais nos pacientes incluídos no estudo (n=86), distribuídos em G1 (Monoinfectados pelo HIV) e G2 (Coinfectados HIV/VHB ou HIV/VHC).

	G1 (n=52)	G2 (n=34)	P-value
	N (%)	N (%)	
Nenhum	00 (0,0)	07 (20,6)	
1 Classe*	01 (1,9)	05 (14,7)	0,0001
2 Classes**	07 (13,5)	12 (35,3)	
3 Classes***	44 (84,6)	10 (29,4)	

*ITRN ou ITRNN ou IP. **ITRN e ITRNN ou ITRN e IP ou ITRNN e IP. ***ITRN e ITRNN e IP

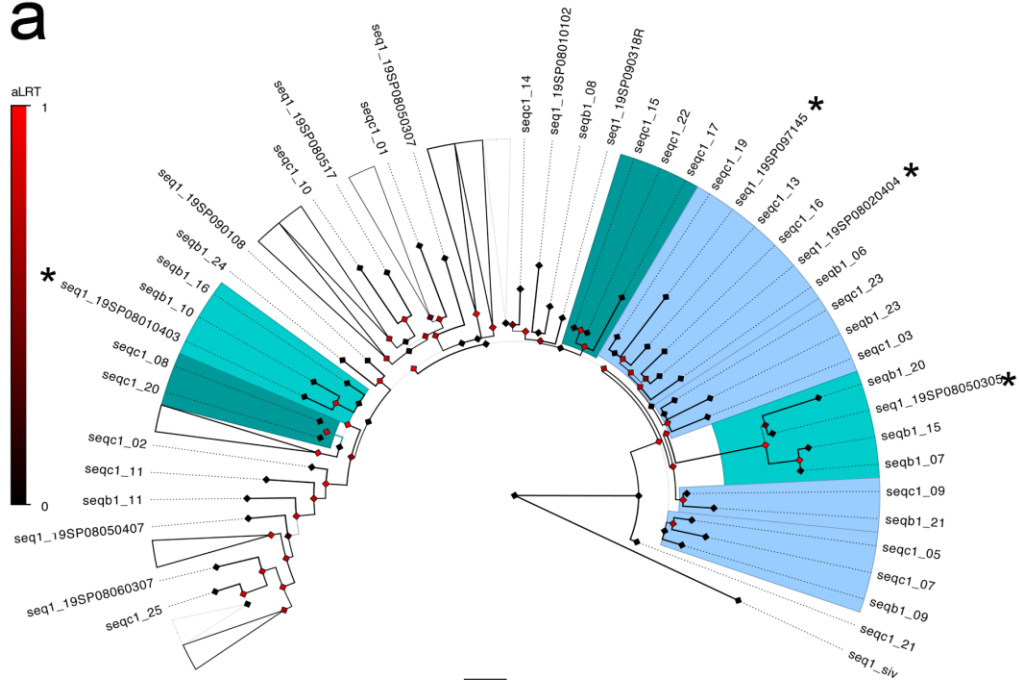
Tabela 4: Frequências da resistência genotípica aos antirretrovirais nos pacientes incluídos no estudo (n=86), distribuídos em G1 (Mono infectados pelo HIV) e G2 (Coinfectados HIV/VHB ou HIV/VHC).

	G1 (N=52)	G2 (N=34)
ITRN		
3TC	50	12
ABC	52	05
AZT	49	06
d4T	51	06
ddl	51	05
FTC	50	12
TDF	49	03
ITRNN		
EFV	46	13
NVP	47	12
ETR	45	06
DLV	47	00
IP		
ATV/R	45	05
DRV/R	30	02
FPV/R	45	04
IDV/R	45	05
LPV/R	45	05
NFV/R	45	04
SQV/R	44	05
TPV/R	38	02

ITRN: Inibidor de Transcriptase Reversa análogo nucleosídeo ou nucleotídeo; ITRNN: Inibidor de Transcriptase Reversa não análogo nucleosídeo; IP: Inibidor de Protease. 3TC: Lamivudina; ABC: Abacavir; AZT: Zidovudina; d4T: Estavudina; ddl: Didavudina; FTC: Emtricitabina ; TDF: Tenofovir; EFV: Efavirenz; NVP: Nevirapina; ETR: Etravirina; DLV: Delavirdina; ATV/r: atazanavir/ritonavir; DRV/r: darunavir/ritonavir; FPV/r: fosamprenavir/ritonavir; IDV: indinavir/ritonavir; LPV/r: lopinavir/ritonavir; NFV/r: nelfinavir/ritonavir; NVP: Nevirapina. SQV/r: saquinavir/ritonavir; TPV/r: tipranavir/ritonavir

FIGURAS

a



b

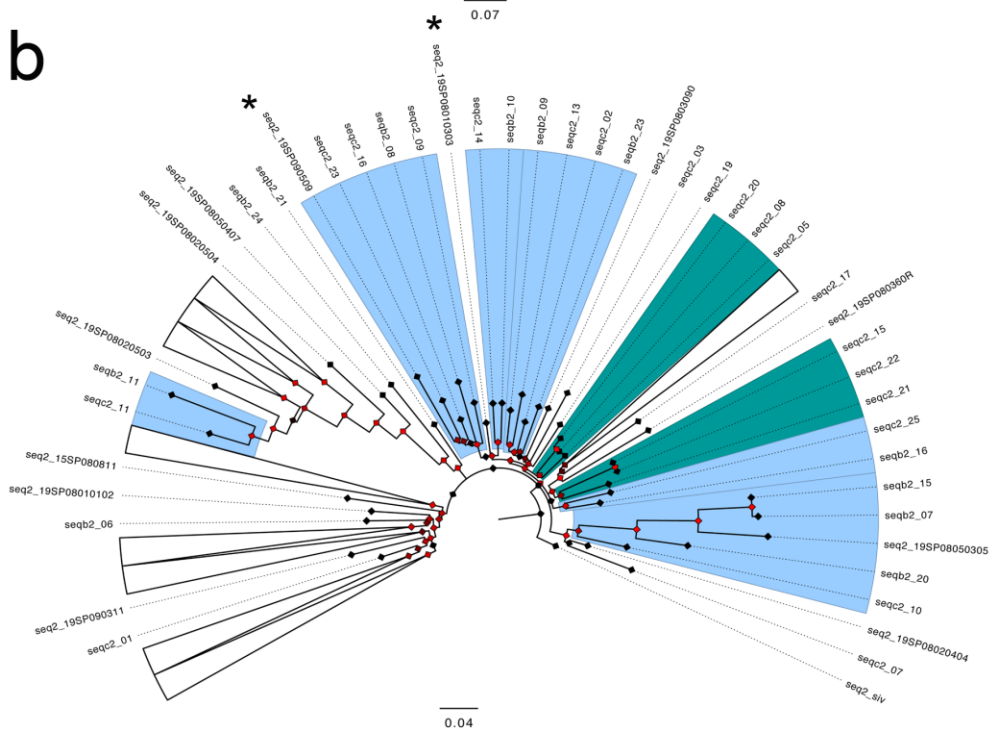


Figura 1: Árvore filogenética das variantes virais estudadas. A) Região genômica da transcriptase reversa, em verde escuro o agrupamento de indivíduos coinfectados com VHC, verde claro os coinfectados com VHB e azul presença de sequências com ambas as coinfeções; B) Região genômica da protease, em verde escuro o agrupamento dos indivíduos coinfectados com VHC e azul com ambas as coinfeções. (*) representa as sequências de mono infectados que foram agrupadas com as coinfectadas.

Capítulo III: Artículo 2

**Detection of Human Immunodeficiency Virus (HIV) in
platelets exposed to virus: evaluation of polymorphism
HPA -1, -3 and -5**

Artigo submetido para publicação na revista "*Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*"

RUNNING TITLE: Human Platelet Polymorphism, HIV and HCV**TITLE: Human Platelets Antigens (HPA) influences the viral load platelets after HCV and HIV-platelet interaction *in vitro***

Rejane Maria Tommasini Grotto^{1,2}, Natália Mirele Cantão¹, Juliana Lara Padovani¹, Lenice do Rosário de Souza³, Giovanni Faria Silva⁴, Adriana Camargo Ferrasi^{1,4}, Maria Inês de Moura Campos Pardini^{1,4}

1-Molecular Biology Laboratory, Blood Transfusion Center, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP Botucatu, São Paulo, Brazil.

2-Department of Bioprocess and Biotechnology, School of Agricultural Sciences, Lageado Experiment Station, Sao Paulo State University, Unesp, Botucatu, São Paulo, Brazil.

3-Tropical Diseases Department, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

4-Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil.

Correspondece to: Rejane Maria Tommasini Grotto, PhD, Department of Bioprocess and Biotechnology, School of Agricultural Sciences, Lageado Experiment Station, Sao Paulo State University, Unesp, Botucatu 18610307, São Paulo, Brazil e-mail: regrotto@fca.com.br. Telephone: +55-14-3880-7162. Fax Number: +55-14-3815-3438

ABSTRACT

Platelets have been considered a carrier of the HIV and HCV in blood circulation but they do not express CD4 and CD81, the main receptors associated with HIV and HCV, respectively. Others molecules might be suggest as candidates in interaction virus-platelets as Human Platelet Antigens (HPA). It has already demonstrated that platelets interact with HIV and HCV *in vitro*, but it is still unknown if this interaction occurs in the same way or depends on genetic factors. This study evaluated the viral load in the platelets after the HCV and HIV-platelet interaction *in vitro*, and if the HPA polymorphisms could modify these interactions. Platelets were obtained from 100 volunteer donors HPA genotyped, and, separately, incubated with HIV or HCV during 48 hours at 37°C. The viral load after *in vitro* expositions was detected by qPCR. HPA-1 and -3 was genotyped by PCR-SSP and HPA-5 by PCR-RFLP. The results showed that the RNA viral load in platelets after being exposed to virus, is bigger in the HIV exposition, suggesting, for the first time, that the HIV-platelets ligation could be more efficient than the HCV-platelets interaction. The platelets-HCV interaction seems to be influenced by the presence of the HPA -1b allele.

Keywords Genotype, Hepatitis C Virus, HPA polymorphisms, Human Immunodeficiency Virus

Financial support: FAPESP

INTRODUCTION

Platelets have been considered a carrier of the Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV) in blood circulation of infected patients (Pugliese et al. 2004, Flaujac et al. 2010).

However the platelets do not express CD4 and CD81 molecules (Clemetson et al. 2000, Hamaia & Allain 2001) the main receptors associated, respectively, with HIV and HCV interactions in their target cells (Abbas et al. 2008, Molina et al. 2008, Farquhar et al. 2011). Thus, others molecules might be suggest as candidates in interaction HIV and HCV-platelets.

Many viruses use molecules involved in cell adhesion as receptors or correceptors, for example, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) for rhinovirus (Greve et al. 1989, Stauton et al. 1989), integrins to echovirus (Bergelson et al. 1992) and adenovirus (Wickham et al. 1993). In the same way, it has already demonstrated that cell-virus interactions can be mediated by integrins (Coulson et al. 1997).

Platelets express proteins of the integrins family such as the glycoprotein complex GPIa-IIa and GPIIb-IIIa (Duperray et al. 1989). These glycoprotein complexes contain polymorphic antigenic determinants named Human Platelet Antigens (HPA) (Bussel & Kaplan, 1998). Their polymorphism is due a substitution of a single amino acid in the protein consequent to a single nucleotide substitution in the gene that code them (Metcalf et al. 2003).

The systems HPA-1, HPA-3, HPA-4 and HPA-5 have been the most studied in *platelet disorders* (Metcalf et al. 2003). HPA polymorphism was already associated

with viral infections such as dengue (Soundravally & Hoti, 2007) and HCV infection (Verdichio-Moraes et al. 2009) in infected patients studies.

It has already demonstrated that platelets interact with the both virus HIV and HCV *in vitro* (Boukour et al. 2006, Padovani et al. 2013), but it is still unknown if this interaction occurs in the same way or depends on some viral or genetic factors.

In this context, the goal of this study was to evaluate the differential viral load in the platelets after the HCV and HIV-platelet interaction *in vitro*, and if the HPA polymorphisms could modify these platelet-HIV or HCV interactions.

MATERIALS AND METHODS

Clinical samples

Platelets were obtained from peripheral venous blood from 100 health volunteer donors HPA genotyped, attended in the Blood Transfusion Center, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), SP, Brazil. Inclusion criteria were presence of RNA-HIV and RNA-HCV confirmed by molecular assays and signed informed consent. Fifty of these volunteers, were used in the HCV experiment and 100 of them, in HIV experiment. This study was approved by the Research Ethics Committee of Botucatu School of Medicine, Sao Paulo State University (UNESP).

Methods

DNA genomic isolated from total blood from all 100 donors, was used to genotype the HPA-1 and -3 by PCR-SSP according to Klüter et al. (1996) and the HPA-5 by PCR-RFLP according to Kalb et al. (1994) and the platelet pellets were obtained using the protocol described by Padovani et al. (2013).

The platelet pellets (already genotyped) were, separately, incubated with 1 mL of plasma pool containing $100.000\text{U}\text{mL}^{-1}$ subtype B HIV or genotype 1 HCV virus respectively, in a micro tube, during 48 hours, in a temperature of 37°C .

The viral load (HCV or HIV) after these *in vitro* expositions, was detected by Quantitative-PCR with lower detection limit of 1.70 log using Abbott real-time PCR system (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL).

The analysis were performed according viral load: (G1) RNA lower or equal 1.70 log, (G2) RNA upper 1.70 log in order to evaluate HPA polymorphism influence in the HCV or HIV-platelet interaction quantitatively.

All procedure was performed using negative controls to guarantee the results veracity.

The χ^2 test was used to investigate possible differences in platelet viral load after, *in vitro*, HCV or HIV-platelet interactions. The Hardy–Weinberg equilibrium test was carried out to evaluate the distribution of allelic frequencies of HPA -1, -3 and -5 among the groups. The Fisher's Exact Test was used to investigate possible associations between the RNA viral load in platelet and (a) the genotype frequencies of HPA, (b) the allelic frequencies of HPA. The significance level for all statistical tests was set at 0.05.

RESULTS

Viral load in platelets obtained from health donors and so, exposed to the HCV, was found to be lower when compared with ones exposed to the HIV. No platelets exposed to the HIV presented viral load undetectable (lower 1.70 log) after

viral exposition. On the other hand, 21 (42%) platelets exposed to the HCV presented viral load undetectable (lower 1.70 log) after viral exposition.

There were no significant differences ($P>0.05$) in the allelic and genotypic frequencies for all evaluated HPA systems, when considering undetectable (lower 1.70 log) and detectable (upper 1.70 log) HIV RNA loads in platelets (data not shown).

Table I: Allelic and genotypic frequencies for HPA -1, -3 and -5 according HCV viral load in platelets from uninfected individuals exposed to the virus (n=50) ($p<0.05$).

Viral Load	Undetectable (lower 1.70 log)	Detectable (upper 1.70 log)	<i>p value</i>
Alleles			
HPA - 1a	25*	56*	0.0272
HPA - 1b	11*	8*	
HPA - 3a	27	44	0.5085
HPA - 3b	9	20	
HPA - 5a	32	58	0.7812
HPA - 5b	4	6	
Genotypes			
HPA - 1a/1a	9	24	0.0676
HPA - 1a/1b	7	8	
HPA - 1b/1b	2	0	0.5183
HPA - 3a/3a	12	17	
HPA - 3a/3b	3	10	0.7683
HPA - 3b/3b	3	5	
HPA - 5a/5a	14	26	0.7683
HPA - 5a/5b	4	6	
HPA - 5b/5b	0	0	

a) HPA: Human Polymorphism Antigen. b) (*) Significant difference

Table I shows the relation between platelets HCV viral load and allelic and genotypic frequency of HPA-1, -3 and -5. There were no significant differences ($P>0.05$) in the genotypic frequencies for all HPA systems when considering undetectable (lower 1.70 log) and detectable (upper 1.70 log) HCV RNA loads in platelets. On the other hand, there was deviation from Hardy–Weinberg equilibrium in the HPA-1 system: the frequency of HPA -1b allele was found to be significantly lower ($P<0.05$) in platelets with HCV RNA loads detectable.

DISCUSSION

This study showed that although both viruses interact with platelets *in vitro*, the RNA viral load in platelets after being exposed to virus is bigger in the HIV exposition than to the HCV, suggesting, for the first time, that the HIV-platelets ligation could be more efficient than the HCV-platelets interaction.

It has already been demonstrated that platelets interact with HIV and HCV *in vitro* (Boukour et al. 2006, Padovani et al. 2013) although they do not express these viral entry receptors (Clemetson et al. 2000, Hamaia et al. 2001).

This finding could be due to the presence of other molecules in platelet membrane, such as CXCR4, DC-SIGN or CLEC-2, which have already been associated with the capture of HIV by the platelets (Dragic et al. 1996, Chaipan et al. 2006).

In the same way, the HPA -1, -3 and -5 polymorphism seems do not interfere with the HIV-platelets interaction whereas the platelets-HCV interaction seems to be influenced by the presence of the HPA -1b allele (Table I).

The results suggest that HPA -1b allele could be involved, somehow, with lower viral loads, which could be advantageous *in vivo*.

Other studies should be conducted to elucidate the mechanism of HCV interaction with platelets and the real role of HPA -1b allele in this interaction, since there are still controversies whether platelet could be act as a reservoir to the HCV during the infection.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to FAPESP for financial support.

REFERENCES

- Abbas AK, Litchman AH, Pillai S 2008. *Imunologia celular e molecular*, 6th ed., Elsevier, Rio de Janeiro, 565 pp.
- Bergelson JM, Shepley MP, Chan BM, Hemler ME, Finberg RW 1992. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 255:1718–1720.
- Boukour S, Masse JM, Benit L, Dubart-Kupperschmitt A, Cramer EM 2006. Lentivirus degradation and DC-SIGN expression by human platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost* 4:426–435.
- Bussel J, Kaplan C 1998. The fetal and neonatal consequences of maternal alloimmune thrombocytopenia (Review). *Baillieres Clin Haematol* 11:3911–3918.
- Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, Geier M, Stewart EA, Eisemann J, Steinkasserer A, Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Pearce AC, Watson SP, Hoxie JA, Baribaud F, Pöhlmann S 2006. DC-SIGN and CLEC-2

mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol* 80:8951–8960.

Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Baggiolini M, Wells TN 2000. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood* 96:4046–4054.

Coulson BS, Londrigan SL, Lee DJ 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *Proc Natl Acad Sci* 94:5389–5394.

Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667–673.

Duperray A, Troesch A, Berthier R, Chagnon E, Frachet P, Uzan G, Marguerie G 1989. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes: Evidence that assembly between pro-GPIIb and GPIIIa is a prerequisite for expression of the complex on the cell surface. *Blood* 74:1603–1611.

Farquhar MJ, Harris HJ, McKeating JA 2011. Hepatitis C virus entry and the tetraspanin CD81. *Biochem Soc Trans* 39:5329–536.

Flaujac C, Boukour S, Cramer-Bordé E 2010. Platelets and viruses: an ambivalent relationship. *Cell Mol Life Sci* 67:545–556.

Greve JM, Davia G, Meyer AM, Forte CP, Yost, SC, Marlor CW, Kamarck ME, McClelland A 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-I. *Cell* 56:8399–847.

Hamaia S, Li C, Allain JP 2001. The dynamics of hepatitis C virus binding to platelets and 2 mononuclear cell lines. *Blood* 98:2293–2300.

Kalb R, Santoso S, Unkelbach K, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C 1994. Localization of the Br polymorphism on a 144bp exon of the GPIa gene and its application for platelet DNA typing. *Tromb Haemost* 71:651–654.

Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G 1996. Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers. *Vox Sang* 71:121–125.

Metcalf P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S 2003. Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang* 85:240–245.

Molina S, Castet V, Pichard-Garcia L, Wychowski C, Meurs E, Pascussi J, Sureau C, Fabre J, SaCunha A, Larrey D, Dubuisson J, Coste J, McKeating J, Maurel P, Fournier-Wirth C 2008. Serum-Derived Hepatitis C Virus Infection of Primary Human Hepatocytes Is Tetraspanin CD81 Dependent. *J Virol* 82:569–574.

Padovani JL, Corvino SM, Drexler JF, Faria GF, Pardini MIM, Grotto RMT 2013. In vitro detection of hepatitis C virus in platelets from uninfected individuals exposed to the virus. *Rev Soc Bras Med Trop* 46:154–155.

Pugliese A, Gennero L, Cutufia M, Enrietto M, Morra E, Pescarmona P, Ponzetto A 2004. HCV infective virions can be carried by human platelets. *Cell Biochem Funct* 22:353–358.

Soundravally R, Hoti SL 2007. Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever and shock syndrome: role of TAP and HPA gene polymorphism. *Hum Immunol* 68:973-973.

Stauton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD, Springer TA 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-I, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* 56:49–53.

Verdichio-Moraes CF, Toralles-Pereira C, Grotto RM, Silva GF, Pardini MI 2009. Allelic frequencies of HPA-1 to 5 human platelet antigens in patients infected with hepatitis C virus. *J Med Virol* 81:757–759.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresh DA, Nemerow GR 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73:309–319.

Capítulo IV: Artículo 3

Polimorfismos dos sistemas HPA -1, -3 e -5 e a evolução da infecção pelo HIV

Resumo de artigo em fase de finalização

A aids é a fase sintomática de uma doença caracterizada por uma imunodebilitação progressiva, resultante da infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). A infecção pelo HIV depende da expressão na superfície celular de receptores capazes de interagir com a glicoproteína do envelope viral gp120. Embora as células alvo do HIV sejam as que expressam o marcador de superfície celular CD4, principal receptor associado à entrada do vírus nas células, já é bem documentado que o HIV pode estar presente em células CD4- incluindo plaquetas. As plaquetas além de funcionarem como carreadoras do vírus na circulação do paciente infectado apresentam, também, a capacidade de internalizar o vírus. Assim, na ausência de CD4 em sua superfície, é provável que outras moléculas sejam relacionadas à interação do HIV com plaquetas. Já foi documentado que alguns vírus utilizam moléculas de adesão celular como receptores ou correceptores de entrada como, por exemplo, as integrinas, já associadas à entrada de echovirus e adenovírus em suas células alvo. Dessa forma, moléculas de adesão como as integrinas constituem fortes candidatas a interação HIV-plaqueta em pacientes infectados. As plaquetas expressam integrinas em sua superfície, na forma de complexos glicoproteicos, nos quais são expressos determinantes antigênicos polimórficos denominados Antígenos Plaquetários Humanos (HPA). Os sistemas HPA mais estudados são os HPA -1, -2, -3, -4 e -5; dos quais os HPA -1, -3, -4 e -5 residem em integrinas. Nos últimos anos, foi encontrada associação do polimorfismo HPA com a presença do Vírus da Hepatite C (VHC) e com a presença de dengue hemorrágica, demonstrando que o polimorfismo HPA, seguindo o modelo do HLA pode se associar a doenças de etiologia viral. Desta forma, a finalidade deste estudo está sendo avaliar, em caráter inédito, uma possível associação do polimorfismo HPA -1, -3 e -5 em pacientes infectados pelo HIV e, a possível relação deste polimorfismo com parâmetros de progressão da doença. DNA genômico extraído de sangue total foi utilizado para análise do polimorfismo do HPA -1 e -3 por PCR-SSP e, do HPA -5 por PCR-RFLP. RNA viral extraído do plasma foi utilizado para determinação da carga viral do HIV por qPCR. Parâmetros clínicos e laboratoriais da

progressão da infecção foram retirados dos prontuários médicos dos pacientes incluídos no estudo.

Para os 49 pacientes incluídos a média de idade foi de 43,53 anos [IQR: 35,0 - 50,0], sendo 27 (55,10%) pacientes do sexo masculino. O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi utilizado para avaliar a distribuição das frequências alélicas entre os pacientes infectados pelo HIV e um grupo controle de doadores de sangue saudáveis relatado por Verdichio-Moraes e colaboradores (2009). O teste de qui-quadrado (χ^2) foi utilizado para avaliar possíveis associações entre os alelos e genótipos HPA e a presença do vírus HIV (Tabela 1).

Pelos resultados demonstrados na tabela 1 não foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo dos sistemas HPA -1, -3 e -5 e a presença do vírus HIV considerando as amostras analisadas até o presente momento. No entanto, é necessário a ampliação do n amostral para confirmar este achado.

A tabela 2 mostra a análise parcial realizada para os 49 pacientes com genotipagem plaquetária já realizada em relação a busca de uma associação entre o polimorfismo HPA -1, -3 e -5 e, os níveis de carga viral plasmática.

Os resultados da tabela 2, também, demonstraram ausência de associação significativa entre os níveis de RNA viral no plasma e o polimorfismo dos sistemas HPA -1, -3 e -5. No entanto, esses achados preliminares devem ser confirmados com a ampliação do n amostral.

A tabela 3 mostra a mesma análise de associação entre o polimorfismo dos sistemas HPA avaliados em relação à contagem de células TCD4.

Na tabela 3 pode-se notar que não houve associação significativa ($p > 0,05$) entre o polimorfismo do sistema HPA -1, -3 e -5 e a contagem de células T CD4 em pacientes infectados pelo HIV.

Tabela 1: Frequência Alélica e Genotípica do sistema HPA-1, -3 e -5 em pacientes infectados com HIV (n = 49) e, sem o vírus (n = 257*), P <0,05

	Pacientes infectados		<i>p-value</i>
	com HIV	Sem HIV	
	(n=49)	(n = 257)*	
Alelos			
HPA-1a	78	436	0,19
HPA-1b	20	78	
HPA-3a	61	340	0,45
HPA-3b	37	174	
HPA-5a	84	467	0,11
HPA-5b	14	47	
Genótipos			
HPA-1a/1a	30	188	0,14
HPA-1a/1b	18	60	
HPA-1b/1b	01	09	
HPA-3a/3a	22	119	0,49
HPA-3a/3b	17	102	
HPA-3b/3b	10	36	
HPA-5a/5a	36	212	0,29
HPA-5a/5b	12	43	
HPA-5b/5b	01	02	

HPA: Antígeno Plaquetário Humano; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana. *Dados reportados por Verdichio-Moraes e colaboradores (2009).

Tabela 2: Frequência Alélica e Genotípica do sistema HPA-1, -3 e -5 em pacientes infectados com HIV de acordo com a carga viral plasmática do HIV (n=49), P <0,05

	Carga Viral Plasmática		<i>p-value</i>
	Indetectável*	Detectável**	
	(n=25)	(n=24)	
Alelos			
HPA-1a	38	40	0,37
HPA-1b	12	08	
HPA-3a	30	31	0,64
HPA-3b	20	17	
HPA-5a	43	41	0,93
HPA-5b	07	07	
Genótipos			
HPA-1a/1a	14	16	
HPA-1a/1b	10	08	0,55
HPA-1b/1b	01	00	
HPA-3a/3a	11	11	
HPA-3a/3b	08	09	0,80
HPA-3b/3b	06	04	
HPA-5a/5a	18	18	
HPA-5a/5b	07	05	0,62
HPA-5b/5b	00	01	

HPA: Antígeno Plaquetário Humano; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana. *Indetectável: carga viral inferior a 40 cópias de RNA/mL. **Detectável: carga viral igual ou superior a 40 cópias de RNA/mL.

Tabela 3: Frequência Alélica e Genotípica do sistema HPA-1, -3 e -5 em pacientes infectados com HIV de acordo com a contagem de células T CD4 (n=49), P <0,05

	Contagem de células TCD4		<i>p-value</i>
	Inferior a 500 células/mm ³ (n=18)	Superior a 500 células/mm ³ (n=31)	
Alelos			
HPA-1a	42	51	0,33
HPA-1b	14	11	
HPA-3a	33	38	0,79
HPA-3b	23	24	
HPA-5a	49	53	0,75
HPA-5b	07	09	
Genótipos			
HPA-1a/1a	15	21	
HPA-1a/1b	12	09	0,26
HPA-1b/1b	01	01	
HPA-3a/3a	12	14	
HPA-3a/3b	09	10	0,97
HPA-3b/3b	07	07	
HPA-5a/5a	22	22	
HPA-5a/5b	05	09	0,35
HPA-5b/5b	01	00	

HPA: Antígeno Plaquetário Humano; HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana.

ANEXOS

ANEXO I

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Perfil de mutações e resistência do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) em pacientes coinfectados com o Vírus da Hepatite B (VHB)

Pesquisador: NATÁLIA MIRELE CANTÃO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 20858413.4.0000.5411

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Médica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 430.610

Data da Relatoria: 21/10/2013

Apresentação do Projeto:

A co-infecção HIV/vírus da hepatite B (VHB) tornou-se um importante problema de saúde pública trazendo implicações terapêuticas e prognósticas, devido à possibilidade desses vírus agirem sinergicamente, acelerando a progressão da doença hepática relacionada ao VHB. Estima-se que 4-10% das pessoas infectadas pelo HIV tenham Hepatite B crônica. Sabe-se que a história natural da infecção pelo VHB é alterada pelo HIV. Em pacientes coinfectados o HIV eleva as taxas de replicação do VHB, aumentando as chances de cronificação deste, quando comparados a pessoas mono infectadas pelo VHB. Contudo, a influência do VHB sobre a evolução do HIV é pouco compreendida, embora a coinfecção pareça piorar o prognóstico do paciente, bem como interferir nos resultados e na escolha da terapia antirretroviral. Atualmente, estudos sobre resistência e mutações vêm sendo conduzidos em pacientes mono infectados pelo HIV. No entanto, não se sabe se a presença do VHB pode favorecer a emergência de variantes do HIV resistentes a drogas nos pacientes submetidos à terapêutica antirretroviral. O objetivo deste estudo é avaliar o perfil de mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease em variantes de HIV em indivíduos coinfectados com VHB e avaliar o perfil de mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa em variantes de VHB em indivíduos coinfectados com HIV/VHB. Serão incluídos neste estudo 100 pacientes coinfectados pelos vírus HIV/VHB, maiores

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

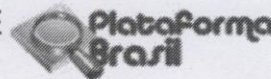
UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 430.610

de 18 anos, atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e no Hospital dia Domingos Alves Meira. Os critérios de inclusão serão falha virológica confirmada; carga viral plasmática do HIV com pelo menos 1.000 cópias/ml e uso regular de antirretrovirais. Serão excluídos pacientes que apresentarem qualquer outra doença hepática, gestantes e pacientes com idade inferior a 18 anos. O paciente será convidado a participar do estudo no momento da coleta do exame de rotina para carga viral do HIV. A amostra utilizada para execução deste estudo será o material excedente da coleta de sangue realizada por ocasião da realização do exame de carga viral, teste de rotina para o acompanhamento da infecção pelo HIV, que será armazenado no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Botucatu, Faculdade de Medicina, UNESP. Dessa forma, nenhuma amostra de sangue adicional será necessária para a realização do estudo. O grupo controle será constituído por uma população monoinfectada pelo HIV do estudo de Munhoz e colaboradores (2010). Será realizada genotipagem do HIV-1 pela tecnologia Trugene HIV-1 (Siemens). O DNA extraído de plasma será utilizado para detecção de mutações de resistência do VHB. Análise de resistência às drogas será realizada utilizando o programa HBVseq disponível no site da Universidade de Stanford (<http://hivdb.stanford.edu/HBV/HBVseq/development/HBVseq.html>). A pesquisa será desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro HC/FMB - UNESP, com duração prevista de 16 meses. Parâmetros clínicos serão obtidos do prontuário médico dos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o perfil de mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa e inibidores de protease em variantes de HIV em indivíduos coinfectados com VHB. Avaliar o perfil de mutações de resistência aos inibidores de transcriptase reversa em variantes de VHB em indivíduos coinfectados com HIV/VHB.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Uma vez respeitados o sigilo e a privacidade dos sujeitos de pesquisa, os principais riscos deste estudo incluem aqueles inerentes à coleta de sangue, tais como equimose no local da inserção da agulha e desmaio, além do risco de acidente de trabalho com a amostra infectada. Os benefícios deste estudo serão principalmente indiretos, podendo acarretar melhora no tratamento de pessoas coinfectadas pelo HIV/VHB.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo observacional cujo objetivo principal é avaliar o perfil de mutações de resistência do HIV e VHB aos antivirais em indivíduos coinfectados por ambos os vírus. Para tanto

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

**FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP**

Continuação do Parecer: 430.610

será realizada genotipagem do HIV e pesquisa de mutações de resistência do VHB na amostra de sangue excedente colhida para a carga viral do HIV. O projeto de pesquisa está bem estruturado, e o pesquisador incluiu o protocolo de coleta de dados clínicos conforme recomendado por este Colegiado, esclarecendo quais parâmetros clínicos serão obtidos do prontuário médico dos pacientes. O TCLE está adequado, uma vez que está em forma de convite, com linguagem acessível, garante o sigilo e a privacidade, esclarece que a participação é voluntária e quais os procedimentos do estudo. O cronograma apresentado é adequado, com conclusão prevista para fevereiro de 2015. Não há orçamento, mas os autores informam que será financiada com recursos próprios, com material remanescente de outras pesquisas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No processo constam as autorizações pertinentes solicitadas por esse CEP, dentre elas o termo de compromisso de cumprimento da resolução 466, as declarações de autorização do responsável pelo Serviço de Ambulatório Especial Domingos de Alves Meira, do chefe de departamento de Clínica Médica, do Hemocentro, do diretor da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) e do superintendente do Hospital das Clínicas da FMB, o termo de entrega do relatório final de atividades e a declaração de cumprimento das legislações que regulamentam o uso e manipulação de informações médicas.

Recomendações:**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Parecer favorável à aprovação por este colegiado, sem necessidade de envio a CONEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de pesquisa APROVADO em reunião extraordinária do CEP de 21/10/2013. Ao final do projeto apresentar Relatório Final de Atividades.

Endereço: Chácara Butignolli, s/n**Bairro:** Rubião Junior**CEP:** 18.618-970**UF:** SP**Município:** BOTUCATU**Telefone:** (14)3880-1608**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

FACULDADE DE MEDICINA DE
BOTUCATU -UNESP



Continuação do Parecer: 430.610

BOTUCATU, 21 de Outubro de 2013

Assinador por:
Trajano Sardenberg
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli, s/n

Bairro: Rubião Junior

CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1608

E-mail: capellup@fmb.unesp.br

Anexo II



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 02 de abril de 2012

Of. 148/2012

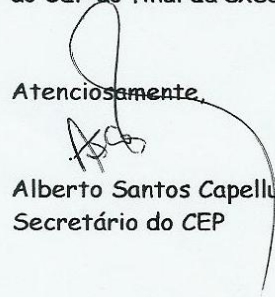
Ilustríssima Senhora
Prof.^a Dr.^a Maria Inês de Moura Campos Pardini
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Prof.^a Maria Inês,

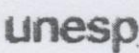

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4179-2012) "Detecção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em plaquetas expostas ao vírus: avaliação do polimorfismo HPA-1, -3 e -5", a ser conduzido por Natália Mirele Cantão, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada por Rejane Maria Tommasini Grotto, com a colaboração da Prof.^a Dr.^a Lenice do Rosário de Souza, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02/04/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".


Atenciosamente,


Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo III

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu 

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

 Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

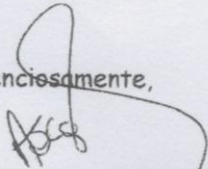
Botucatu, 02 de julho de 2012 327/2012-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Rejane Maria Tommasini Grotto
Divisão de Hemocentro da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^ª. Rejane,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4265-2012) "Avaliação do perfil de mutações e resistência aos inibidores de transcriptase reversa e protease em variantes do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) circulantes em pacientes coinfectados pelo Vírus da Hepatite C (VHC)", a ser conduzido por Andressa Alves de Almeida Cruz, orientada por Vossa Senhoria, co-orientada pela Prof^ª. Dr^ª. Maria Inês de Moura Campos Pardini, com a colaboração de Alexandre Naime Barbosa, Giovanni Faria Silva, Lenice do Rosário de Souza e Sarita Fiorelli Dias Barreto, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 02/07/2012.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

- Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP