



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
DO TIPO I NO ESTADO DE RORAIMA.

Mestrando: André de Lima Guerra Corado

Orientador: Dr. Felipe Gomes Naveca

Co-Orientadora: Dra. Fabiana Granja

MANAUS

2014

ANDRÉ DE LIMA GUERRA CORADO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
DO TIPO I NO ESTADO DE RORAIMA.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e
Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Amazonas, como requisito
para a obtenção do grau de Mestre em Imunologia
Básica e Aplicada.

MANAUS

2014

ANDRÉ DE LIMA GUERRA CORADO

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA
DO TIPO I NO ESTADO DE RORAIMA.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada”.

APROVADA EM: _____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Felipe Gomes Naveca, Presidente
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ/AM

Dr. Gonzalo Belo, Membro Externo
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/RJ

Dr. Rajendranath Ramasawmy
Fundação de Medicina Tropical

DEDICATÓRIA

Dois anos de trabalho duro e cansativo. Dedico esta pesquisa a minha mãe, Ana Lourdete de Lima Guerra Corado, a meu pai Antônio Dionísio da Silva Corado, a minha irmã Isabel Erondina Guerra Corado, aos meus cachorros “Robinho”, “Doralice”, “Condolezza” e “Nina”, a minha avó Izabel Alves de Lima Guerra e a todos os pacientes HIV positivos que participaram da pesquisa.

AGRADECIMENTOS

O resultado do meu trabalho está intimamente ligado a diversas pessoas que ao longo desses dois anos muito me ajudaram a concluir essa etapa. Seria injusto não dedicar um pequeno pedaço desta dissertação para agradecê-las e acima de tudo prestar essa homenagem. Portanto, uma página não será suficiente e de antemão já aviso que a linguagem será coloquial.

Agradeço a Deus pelo dom da Vida, agradeço mais ainda por ter me inserido numa família maravilhosa. Meus pais, Dionísio e Ana e minha irmã Isabel não poderiam ser família melhor para minha vivência neste mundo. A eles que sempre me apoiaram irrestritamente em todas as decisões que tomei, dedico esta dissertação além dos agradecimentos. Obrigado por tudo, sem vocês nada teria sido possível. Enquanto tiver vocês, sei que sempre posso ir mais longe. Amo-os!

A Nívea Corado, Lílian Corado, Júlio (Darkest) e Daniel Corado, que durante algum tempo me abrigaram em sua residência e que sempre me ajudaram quando foi preciso. Obrigado por me fazer sentir em família mesmo estando longe da minha. Sem dúvida esse sentimento foi um dos melhores que tive aqui em Manaus.

A minha Tia Naile Corado, que neste fim de mestrado me ajudou muito. Obrigado por sua generosidade, que Deus continue sempre lhe abençoando. Levarei comigo seu gesto sempre.

Agradeço a minha família de origem Amazonense, os Corados e a minha família de origem Roraimense, os Guerras. Agradeço cada tio, primo e em especial minha avó Izabel Guerra (guardo o presente).

Agradeço muito ao meu amigo George Villarouco, dizem por aí que ele é conhecido como “anjinho”, eu até acredito. Meu amigo, muito obrigado! Obrigado pela sua humildade

e paciência em ensinar a quem pouco sabia. Parte dessa dissertação sem dúvida, devo a você. Obrigado por me ensinar os caminhos das pedras!

Agradeço a Katianne Barbosa, conhecida internamente como “*boss*”. Obrigado por me fazer sentir parte do grupo em diversos momentos. Obrigado pela amizade e companheirismo. *Thank you boss!* Você vale ouro.

Agradeço a meu grande amigo Yury Chaves, mais conhecido popularmente como “Pastor”. Um amigo que fiz no mestrado, amigo para toda vida. Obrigado pela sua amizade. Assim como, agradeço ao meu amigo de mestrado Walter Neves que compartilha torcida pelo mesmo time que eu. Obrigado pelos momentos de riso pelos corredores da FIOCRUZ! Agradeço ao Davi, Dayana, Ana Paula, Vani e Lucas pelos almoços relaxantes, regrados a boas risadas.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Felipe Naveca, obrigado pela oportunidade, pelo conhecimento passado e por “financiar” esta dissertação. Admiro seu conhecimento e sua mentalidade. Obrigado pela paciente ajuda nas correções desta dissertação e nas análises filogenéticas. Sou muito grato a você!

Agradeço também a minha co-orientadora Dra. Fabiana Granja, que me acompanha desde a graduação e que deu o pontapé inicial neste projeto. Obrigado por sempre se dispor a me ajudar a concretizar a pesquisa e pela orientação.

A toda equipe do LACEN/RR, Renato Leão, Bernabeto, Scheila e Luzinete. Sem vocês este trabalho JAMAIS teria saído do papel. Obrigado pela ajuda nas coletas.

Agradeço as Dra. Aya e Dra. Adriana Malheiro, responsáveis pela condução do PPGIBA, obrigado por todo o empenho com relação ao curso e em relação a minha pessoa.

Agradeço a ILMD-FIOCRUZ e aos seus funcionários, em especial a Marizete Duarte que me recebeu com todo carinho.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida, obrigado por me ajudar a sobreviver durante esses dois anos.

Por último, agradeço aqueles que partiram, mas que tenho certeza que estavam lá em cima olhando por mim e me enviando energias positivas sempre. Obrigado Tia Luiza, Tio Matias, Vovó Erondina, Vovô Álvaro, Vovô Guerra, Celso Casadio e meu amigo Danilo Bruno. Tenho certeza, mais que absoluta que vocês sempre olham por mim.

“O homem que diz sou, não é. Porque quem é mesmo é, não sou.” – Baden Powell e Vinícius de Moraes

RESUMO

O estudo da diversidade genética e da presença de mutações de resistências aos antirretrovirais é de fundamental importância para a vigilância epidemiológica do HIV-1, pois pode fornecer informações sobre a biologia do vírus e orientar as políticas de prevenção e tratamento. De 2007 a 2012, dentre todos os estados da federação, Roraima figura entre os cinco primeiros estados com as maiores taxas de incidências, sendo que de 2008 a 2010 ocupou a segunda posição. Da mesma maneira, a capital Boa Vista de 2007 até 2011 também se posiciona entre as cinco capitais com maior taxa de incidência. Dados relacionados a genotipagem do HIV-1 circulante ou dados relacionados sobre mutações de resistência no estado são de fundamental importância para compreender a epidemia local. Nesse contexto, este trabalho identificou os subtipos do HIV-1 circulante, avaliou a resistência primária e secundária nos pacientes portadores de HIV e descreveu a frequência do polimorfismo rs333 no gene CCR5, em pacientes atendidos no Laboratório Central do Estado de Roraima/Laboratório de HIV. Para isso foram coletadas 121 amostras e as regiões do DNA proviral da RT/PR, Integrase e Envelope foram amplificadas e submetidas ao sequenciamento nucleotídico. O DNA genômico humano foi apenas amplificado e comparado por eletroforese. Os dados demográficos foram analisados por estatística descritiva, enquanto que os dados genéticos foram avaliados por diversas ferramentas de bioinformática para análise de resistência, genotipagem, reconstrução filogenética e tropismo viral. Foi observada uma frequência de 9,17% para o genótipo humano CCR5/CCR5 Δ 32 e 90,83% em relação ao CCR5/CCR5. Com relação ao subtipo viral, a maior prevalência encontrada foi para o subtipo B (Integrase) e gene *Pol*, seguido do subtipo F1 e de formas recombinantes B/F (Integrase) e B/D (*Pol*). Somente um caso de resistência primária foi detectado (7,69%), no entanto em pacientes em tratamento esse número atingiu 30,7%. A análise filogenética mostrou que as amostras de Roraima se agrupam em diferentes clados com amostras brasileiras, venezuelanas, uruguaias e guianenses, o que provavelmente reflete eventos distintos de introdução viral. Foram encontradas 25% de amostras com tropismo X4, o que afeta a possibilidade de administração do inibidor de fusão Maroviroque em parte dos pacientes avaliados. Acreditamos que os dados obtidos no presente estudo contribuirão para um melhor entendimento da epidemiologia do HIV/AIDS no estado de Roraima. Além do retorno científico, acreditamos que os resultados contribuirão indiretamente para a melhoria do atendimento desta população de pacientes.

Palavras chaves: HIV, resistência primária, CCR5, Rs333, Roraima.

ABSTRACT

The study of genetic diversity and detection of mutations to antiretroviral therapy is crucial for epidemiological surveillance of HIV-1, because it can provide information about the viral biology, guiding policies for prevention and treatment. From 2007 to 2012, Roraima ranks among the top five states with the highest incidence rates, from 2008 to 2010 occupied the second position. Likewise, the capital of Boa Vista in 2007 until 2011 also ranks among the five capitals with highest incidence rate. Data related to HIV-1 genotyping or related data on resistance mutations in the state are of fundamental importance to understand the local epidemic. In this context, this work has identified circulating HIV-1 subtypes; evaluated primary and secondary resistance in patients with HIV and described the frequency of the CCR5 gene polymorphism (rs333) in patients treated at the Central Laboratory of the State of Roraima / HIV Lab. A total of 121 samples were collected and regions of the proviral DNA of RT / PR, integrase and envelope genes were amplified and subjected to nucleotide sequencing. Human genomic DNA was only amplified and compared by electrophoresis. Demographic data were analyzed using descriptive statistics, while the genetic data were evaluated by several bioinformatics tools for analyzing: resistance, genotyping, phylogenetic reconstruction and viral tropism. A frequency of 9.17% for the human CCR5 genotype / CCR5 Δ 32 and 90.83% in relation to CCR5 / CCR5 was observed. With respect to the viral subtype, the highest prevalence was found for subtype B (Integrase) and Pol gene, followed by subtype F1 and recombinant forms of B / F (Integrase) and B / D (Pol). Only one case of primary resistance was detected (7.69%), however, in patients receiving therapy this number achieved 30,7%. Phylogenetic analysis showed that the Roraima's samples grouped into different clades with Uruguayan, Brazilian, Venezuelan and Guyanese samples, which probably reflects distinct events of viral entry. Around 25% of X4 samples were found, which affects the possibility of administering the fusion Maraviroc inhibitors for these patients. We believe that the data obtained in this study will contribute to a better understanding of the HIV / AIDS epidemiology of in the state of Roraima. Besides the scientific return, we believe that the results will indirectly contribute to improving patient care in this population.

Keywords: HIV, primary resistance, CCR5, Rs333, Roraima State.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do HIV-1.....	19
Figura 2- Esquema gráfico do genoma do HIV-1.	20
Figura 3 - Ligação do HIV-1 na célula do hospedeiro.	22
Figura 4 - Esquema mostrando a formação das partículas do HIV-1, brotamento e maturação	23
Figura 5 - Curso da infecção pelo HIV	25
Figura 6 - Representação explicativa da representação das mutações de resistência ao HIV- 1.	29
Figura7: CRF01_AE.....	35
Figura 8 - Distribuição global dos subtipos pertencentes ao grupo M do HIV-1.....	36
Figura 9 - Subtipos prevalentes no Brasil.....	39
Figura 10 - Prevalência do subtipo C (HIV-1) no Brasil.....	40
Figura 11 - Ranking modificado da taxa de incidência (por 100.000 hab.) de casos de AIDS notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel/Siclom, segundo UF de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 2000-2011.....	44
Figura 12 - Mapa político do estado de Roraima	49
Figura 13 - Resultado de eletroforese do gene CCR5	66
Figura 14 - Resultado de eletroforese da PCR de parte do gene <i>Pol</i>	67
Figura 15 - Resultado de eletroforese da NESTED PCR RT/PR.....	67
Figura 16 - Resultado de eletroforese da PCR de parte do gene da Integrase.....	68
Figura 17 - Resultado de eletroforese da NESTED PCR de parte do gene Integrase.	69
Figura 18 - Resultado de eletroforese da PCR de parte do gene do Envelope.	70
Figura 19 - Resultado de eletroforese da NESTED PCR de parte do gene do Envelope....	70

Figura 20 - A) Prevalência do subtipo B em pacientes HIV positivos do estado de Roraima (gene Pol (RT/PR). B) Prevalência do subtipo B em pacientes HIV positivos do estado de Roraima (gene INT).....	71
Figura 21 - Reconstrução Filogenética da região PR/RT. Amostras deste estudo em vermelho; amostras de referência nomeadas pelo país, ano de obtenção, código da amostra e número de acesso. Valores dos nós correspondem ao suporte aLRT.....	73
Figura 22 - Reconstrução Filogenética da região PR/RT. Amostras deste estudo em vermelho; amostras de referência nomeadas pelo país, ano de obtenção, código da amostra e número de acesso. Valores nos nós correspondem ao suporte aLRT. A) Fragmento da reconstrução filogenética da região RT/PR em pacientes HIV positivos de Roraima. B) Localização do fragmento.	74
Figura 23 - Reconstrução Filogenética da região PR/RT. Amostras deste estudo em vermelho; amostras de referência nomeadas pelo país, ano de obtenção, código da amostra e número de acesso. Valores nos nós correspondem ao suporte aLRT. A) Localização do fragmento.....	75
Figura 24 – Exemplo de resultado da predição viral para vírus R5 e vírus R4.	81
Figura 25 - Prevalência do HIV-1 na região Norte do Brasil.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores para o gene CCR5 e tamanho dos fragmentos gerados.	52
Tabela 2 - Concentração final de reagentes da PCR CCR5.	53
Tabela 3 - Iniciadores dos genes da PR/RT do HIV-1.	54
Tabela 4 - Concentração final dos reagentes da PCR e NESTED PCR HIV-1 RT/PR.	55
Tabela 5 - Iniciadores do gene da Integrase HIV-1.	55
Tabela 6 - Concentração final dos reagentes da PCR e NESTED PCR Integrase.	56
Tabela 7 - Iniciadores do Envelope Viral.	56
Tabela 8 - Concentração final dos reagentes da PCR e NESTED PCR Envelope.	57
Tabela 9 - Tamanho do fragmento gerado vs concentração de DNA.	59
Tabela 10 - Dados gerais dos pacientes coletados.	64
Tabela 11 - Municípios dos pacientes residentes em Roraima.	65
Tabela 12 - Ocorrência de genótipos, frequência genotípica e frequência alélica do gene CCR5.	67
Tabela 13 - Mutações de resistência encontradas na região da RT/PR.	79
Tabela 14 - Mutações de resistência aos inibidores da protease.	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	O vírus da imunodeficiência humana tipo 1.....	18
2.2	Organização genômica do HIV-1.....	19
2.3	Biologia do HIV-1.....	21
2.4	Patogênese.....	23
2.5	Medicamentos antirretrovirais (ARV's).....	25
2.6	Resistência aos antirretrovirais.....	28
2.6.1	Resistência aos antirretrovirais no Brasil	30
2.7	Fatores imunogenéticos associados ao HIV-1	31
2.8	Evolução molecular do HIV-1	34
2.9	Epidemiologia molecular e diversidade genética do HIV-1 pelo mundo 35	
2.10	Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil	37
2.11	HIV-1 em Roraima.....	44
3	JUSTIFICATIVA	45
4	OBJETIVO	47
4.1	Objetivos Específicos.....	47
5	MATERIAL E METÓDOS	48
5.1	Modelo de estudo	48

5.2	Aspectos Éticos	48
5.3	Local de estudo.....	48
5.4	Participantes da pesquisa.....	49
5.5	Abordagem ao paciente	50
5.6	Coleta, armazenamento e transporte das amostras.....	50
5.7	Informações dos pacientes	51
5.8	Visão geral dos procedimentos laboratoriais	51
5.9	Extração do DNA pró-viral e DNA humano.....	52
5.10	Amplificação das regiões alvo	52
5.10.1	Amplificação de gene endógeno humano.....	52
5.10.2	Amplificação do DNA pró-viral	53
5.11	Confirmação da amplificação.....	57
5.12	Purificação dos produtos oriundos da NESTED-PCR.....	58
5.13	Reação de sequenciamento (Sanger), purificação e sequenciamento	58
5.14	Visão geral das atividades realizadas envolvendo bioinformática.....	61
5.15	Análise manual dos eletroferogramas e montagem da sequência consenso	61
5.16	Ferramentas para a genotipagem do HIV-1	62
5.17	Análises filogenéticas.....	62
5.18	Análise do tropismo viral	63
6	Resultados	64
6.1	Informações sobre a população	64

6.2	Amplificação do gene CCR5.....	66
6.3	Amplificação e sequenciamento do gene <i>Pol</i> , região RT/PR	67
6.4	Amplificação e sequenciamento do gene da Integrase.....	68
6.5	Amplificação e sequenciamento do gene do <i>Envelope</i>	69
6.6	Diversidade genética do HIV-1 em Roraima	71
6.7	Filogenia do HIV-1 em Roraima.....	71
6.8	Resistência aos antirretrovirais.....	76
6.9	Predição do tropismo viral	80
7	DISCUSSÃO	82
7.1	Rss333 em Roraima	84
7.2	Genotipagem em Roraima.....	85
7.3	Filogenia em Roraima	87
7.4	Resistência em Roraima	88
7.5	Tropismo	90
8	CONCLUSÃO	92
9	REFERÊNCIAS.....	93
10	Apêndice 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido	105
11	Apêndice 2 – Questionário.....	107

Anexo 1 – Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima. 109

1 INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é causada por um vírus que infecta macrófagos, células dendríticas e linfócitos T CD4+, sendo caracterizada por severa disfunção do sistema imunológico que acarreta quadro de imunossupressão no portador da doença (BRASIL, 2010).

Desde que a epidemia de AIDS começou 78 milhões de pessoas foram infectadas, 39 milhões faleceram em decorrência desta síndrome e até o final de 2013 35 milhões de pessoas vivem com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (UNAIDS, 2014). No Brasil aproximadamente 718 mil pessoas vivem com HIV/ Aids (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

O avanço científico no estudo do HIV/AIDS levou a produção de medicamentos que prolongam a vida dos pacientes. Os antirretrovirais reduziram globalmente os casos de óbitos por causa básica AIDS em 35% desde 2005. Estima-se que em 2013, 12,9 milhões de pessoas receberam tratamento antirretroviral. (UNAIDS, 2014).

A complexidade do vírus envolve mecanismos evolutivos fascinantes, tais mecanismos provocam grande diversidade e em alguns casos resistência aos medicamentos antirretrovirais.

Pesquisas relacionadas ao HIV/AIDS em busca de uma possível cura não cessam, vacinas que melhoram a resposta imunológica, em especial a resposta celular apresentam grande passo para o controle da replicação do HIV (MUDD et al., 2012), assim como estratégias para eliminar os possíveis reservatórios virais. HU et al., (2014) obtiveram um resultado empolgante quanto aos reservatórios virais, os mesmos conseguiram *in vitro* remover o DNA proviral do genoma de células de origem mielóide.

Além de pesquisas básicas relacionadas ao HIV, estudos aplicados ajudam compreender a epidemia global, revelando dados como genótipos circulantes, resistências e evidências de recombinação viral.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O vírus da imunodeficiência humana tipo 1

No final da década de 70 e início da década de 80, nos Estados Unidos da América foram reportados diversos casos de pacientes que se caracterizavam pelo declínio dos linfócitos TCD4+ e pelo aparecimento de múltiplas doenças oportunistas (GALLO, 2006; MASUR et al., 1981).

Em 1982, foram iniciados os primeiros experimentos visando identificar o agente causador desta síndrome. GALLO *et al.*, (1983) acreditavam na possibilidade de que a AIDS seria causada por um vírus linfotrópico da célula humana (HTLV), ou ainda um novo retrovírus pertencente à família do HTLV, já que esta família de vírus detinha características semelhantes aos dados encontrados em pacientes com AIDS.

No ano de 1983, em linfócitos T isolados de pacientes com sintomas da AIDS descobriu-se um novo retrovírus, que apresentava alguma semelhança ao HTLV, mas distinto dos HTLVs anteriormente isolados, principalmente em sua morfologia e em suas características antigênicas. Descobria-se o LAV (vírus associado a linfonodopatia) ou ainda HTLV III que posteriormente ficaria conhecido como vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BARRÉ-SINOUSI et al., 1983; COFFIN, HAASE, LEVY, J., et al., 1986; GALLO e MONTAGNIER, 2003; GALLO et al., 1984).

O HIV é um retrovírus, que filogeneticamente pode ser dividido em HIV-1 e HIV-2, este último descoberto por CLAVEL et al., (1986) e restrito a países africanos. É membro da família *Retroviridae*, com tamanho entre 100-120nm, formado por um

núcleocapsídeo com duas cópias idênticas de RNA de aproximadamente 9,2 kb e três enzimas virais: a transcriptase reversa, a protease e a integrase. Toda essa estrutura é envolvida por um envelope lipoprotéico no qual se inserem diversas proteínas, em especial gp120 e gp41 (Revisado por: BENJELLOUN; GENIN; PAUL, 2011; GELDERBLOM *et al.*, 1987).

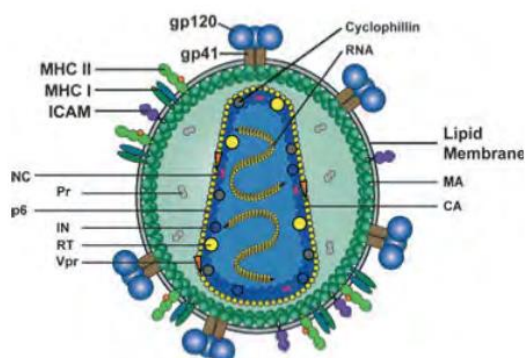


Figura 1 - Representação esquemática do HIV-1 (BENJELLOUN et al., 2011).

2.2 Organização genômica do HIV-1

Em 1985 WAIN-HOBSON et al., e RATNER et al., foram os primeiros pesquisadores a sequenciar o HIV-1. Após anos de aprimoramento das técnicas moleculares e de sequenciamento o mapa gênico do vírus está completamente elucidado (Figura 2). O HIV-1 apresenta duas regiões não codificantes em suas extremidades conhecidas como *Long Terminal Repeats* (LTR) e 9 regiões codificantes que irão dar origem a 15 proteínas (WATTS et al., 2009).

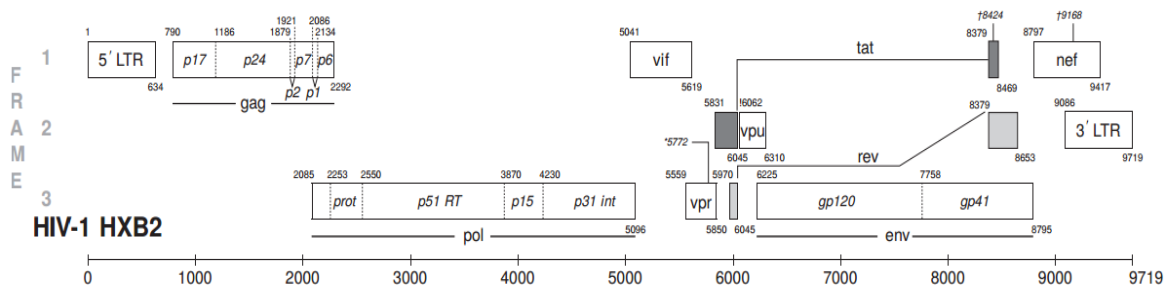


Figura 2- Esquema gráfico do genoma do HIV-1 (LEITNER et al., 2013).

Didaticamente podemos dividir o genoma em genes essenciais e genes acessórios que se dispõem da seguinte maneira:

Genes essenciais: a) *Gag* - Codifica proteínas relacionadas ao nucleocapsídeo (NC), matriz (MA) e capsídeo (CA). b) *Pol* - Codifica a protease viral (PR), a transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN). c) *Env* - Codifica duas proteínas de membrana essenciais para ligação do vírus à célula, a gp120 (proteína de superfície) e a gp41 (proteína transmembranar). (LEITNER et al., 2013)

Genes acessórios: a) *Vif* – Codifica a proteína Vif (fator de infectividade do vírion) que é essencial para a maturação do vírion em alguns tipos celulares (KATO et al., 2002; ROSE et al., 2004). b) *Vpu* – Seu produto está relacionado com a liberação de partículas virais e com degradação de CD4 no retículo endoplasmático (DUBÉ et al., 2010). c) *Vpr* – A proteína viral R (Vpr) é responsável pelo transporte do complexo de pré-integração para o núcleo da célula, por inibir a divisão celular levando a célula infectada a fase G2 da mitose e por interferir na atividade do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (KOGAN e RAPPAPORT, 2011). d) *Tat* – Proteína transativadora (TAT) é uma proteína regulatória, mais conhecida por ser um transativador da transcrição viral, ou seja, ela altera/regula a expressão dos genes virais e celulares (ROMANI, ENGELBRECHT e GLASHOFF, 2010). e) *Rev* – Envolvido com o transporte do RNA e estabilidade do

mesmo (FRANKEL e YOUNG, 1998). f) *Nef* – Promove a regulação negativa (*downregulation*) de CD4 e MHC classe I (LEITNER et al., 2013).

2.3 Biologia do HIV-1

O HIV é transmitido por relações sexuais desprotegidas, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas, transfusão de sangue infectado, de forma vertical ou seja, de mãe para filho e por acidentes ocupacionais (SABATTÉ et al., 2011). A carga viral tem relação estreita com transmissão do vírus. Quanto mais alta a carga viral, maior a probabilidade de um indivíduo que teve algum contato de risco ser infectado. Em um trabalho envolvendo casais sorodiscordantes (um indivíduo HIV+ e outro HIV-) e a transmissão sexual do vírus QUINN *et al.*, (2000) apontam que a transmissão do HIV é rara em pacientes com carga viral com níveis menores a 1500 cópias de HIV-RNA por mililitro.

O HIV-1 é um parasita intracelular obrigatório e por isso é necessária sua ligação e entrada a uma célula para que o mesmo possa ser replicado. Possui tropismo por células do sistema imune, como os linfócitos TCD4+, monócitos, macrófagos e células dendríticas por possuírem em sua membrana uma molécula chamada CD4 (KLATZMANN et al., 1984). Ao interagir com essas células a proteína gp120 do vírus se liga fortemente à molécula CD4 presente, tal ligação gera uma mudança de conformação na região V1/V2 e V3 da própria proteína, que passa a expor uma região altamente conservada a qual irá interagir com um dos dois, ou os dois co-receptores de quimiocina, CCR5 ou CXCR4 da célula do hospedeiro (CLAPHAM e WEISS, 1997; RIZZUTO, 1998; TURNER e SUMMERS, 1999). O HIV que utiliza o co-receptor CCR5 é classificado como R5 HIV, aquele que utiliza o co-receptor CXCR4 são classificados

como R4 HIV e aquele que utiliza os dois co-receptores de quimiocinas são classificados de R5X4 HIV (ARRILDT, JOSEPH e SWANSTROM, 2012; BERGER et al., 1998).

A ligação da gp120 com o co-receptor da célula do hospedeiro culmina em outra mudança de conformação nas proteínas de superfície do vírus que resulta na inserção de partes hidrofóbicas da proteína gp41 na membrana da célula do hospedeiro levando a fusão ao vírus (WILEN *et al.*, 2012) (Figura 3).

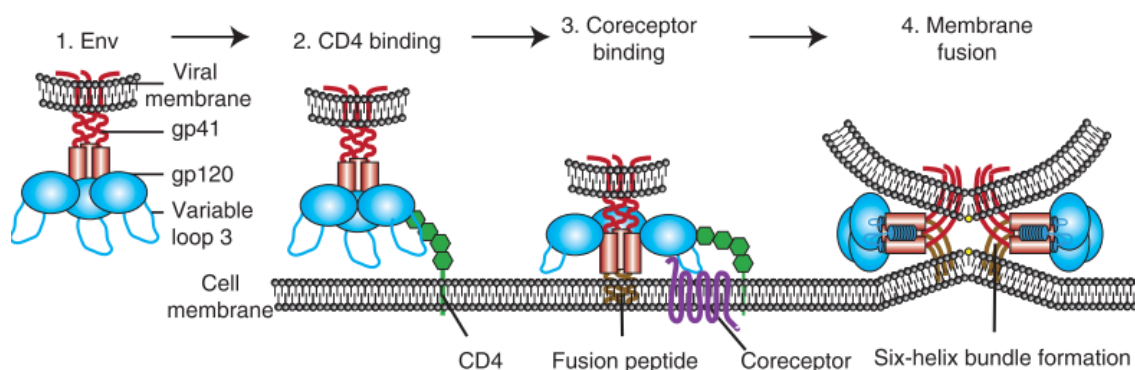


Figura 3 - Ligação do HIV-1 na célula do hospedeiro (WILEN et al., 2012).

Uma vez fundida a membrana celular do hospedeiro no vírus, o core é liberado no processo conhecido como *uncoating*, o qual é fundamental para formação do complexo de transcrição reversa (RTCs) e o complexo de pré-integração (PICs) (ARHEL, 2010). Após o *uncoating*, tendo como molde o RNA viral, a transcriptase reversa (RT) passa a sintetizar um DNA fita dupla, que será transferido ao núcleo celular onde a enzima integrase (IN) o integrará ao genoma da célula hospedeira, tornando-se assim um provírus (NISOLE e SAÏB, 2004). Desta forma o DNA proviral serve como molde para a transcrição de outros RNAs virais, que acabam sendo replicados como se fossem qualquer gene celular (RICHMAN *et al.*, 2004) (Figura 4).

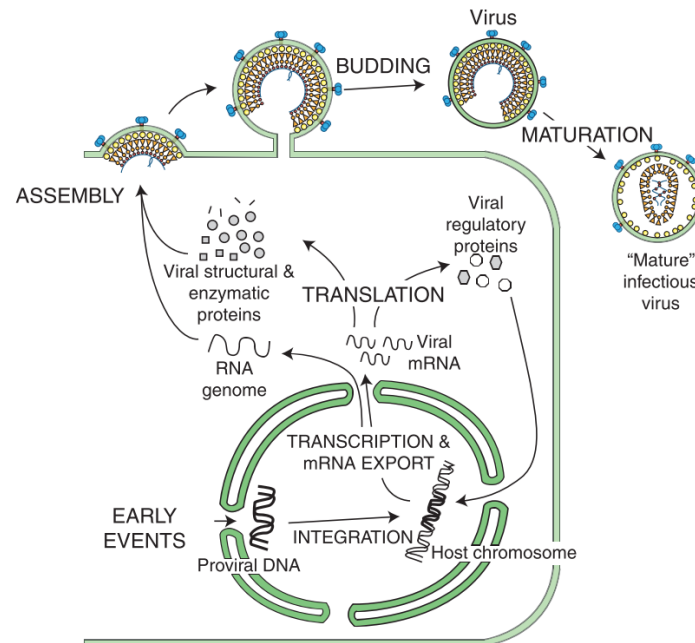


Figura 4 - Esquema mostrando a formação das partículas do HIV-1, brotamento e maturação (SUNDQUIST & KRAUSSLICH, 2012).

O mRNA (RNA mensageiro) viral codifica as proteínas dos genes acessórios primeiramente, e posteriormente as proteínas dos genes essenciais. Ao final, na sua forma matura o HIV deve conter duas cópias positivas de RNA genômico, e as proteínas do Envelope (Env), a proteína GAG e ainda a protease (PR), transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN) (SUNDQUIST e KRÄUSSLICH, 2012).

2.4 Patogênese

No período inicial da infecção, o vírus é replicado e se espalha por diversos tecidos e órgãos, em especial no tecido linfóide associado ao intestino (GALT) onde os linfócitos T CD4+ residentes aos poucos são depletados. A replicação viral neste primeiro momento, apesar de reduzida a ponto do material genético do vírus não ser detectado, contribui para a disseminação do vírus presente no GALT para os linfonodos mais próximos, o que favorece o aparecimento dos reservatórios virais. O GALT possui

importante papel quanto a formação de reservatórios para o HIV-1. Em um estudo com pacientes HIV positivos que faziam uso de medicamento antirretroviral há pelo menos nove anos, CHUN et al., (2008) demonstram que o GALT tem grande papel na persistência da infecção pelo HIV-1 por ser um reservatório. Esta fase é conhecida também como fase eclipse, pois a quantidade de vírus no organismo pode ser indetectável.

A partir da terceira semana, acontece a fase aguda da doença, caracterizada por uma alta taxa de replicação viral que conseqüentemente leva a uma queda de linfócitos T CD4+ (COFFIN e SWANSTROM, 2013) (Figura 5). Nesta fase, a resposta humoral inicial produz primeiramente anticorpos contra a gp41 e posteriormente contra gp120, porém estes anticorpos são incapazes de neutralizar o vírus (TOMARAS et al., 2008). Anticorpos efetivos contra o HIV-1 só passam a ser produzidos três meses após o início da infecção o que é considerado tarde para influenciar no rumo da doença (COHEN, SHAW, et al., 2011).

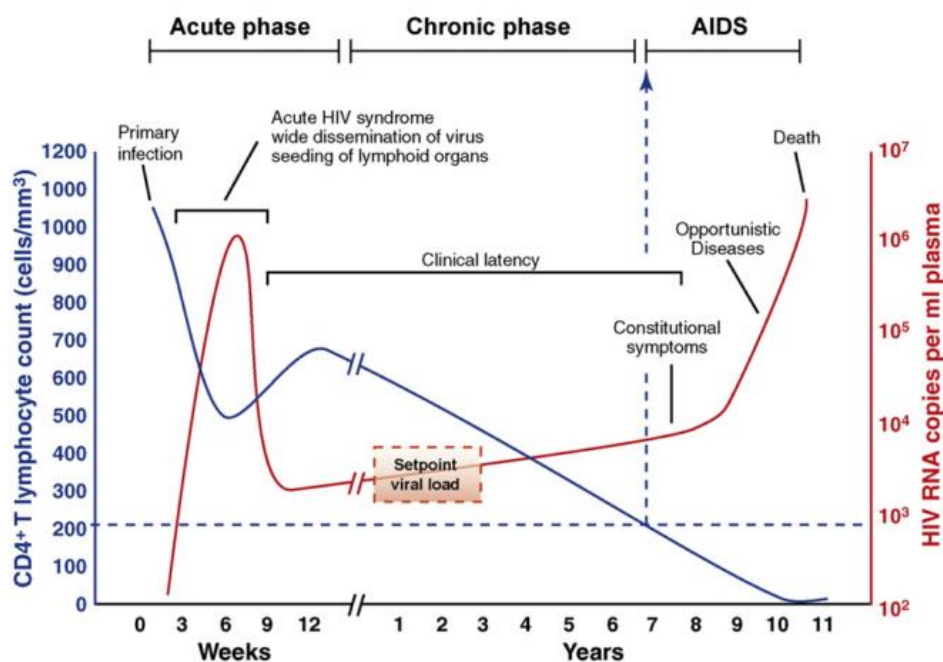


Figura 5 - Curso da infecção pelo HIV (AN e WINKLER, 2010)

No fim da fase aguda a carga viral decai e acontece um pequeno aumento na contagem de linfócitos T CD4+, tal evento ocorre porque o sistema imune começa a produzir anticorpos neutralizantes e a resposta celular está em curso.

Após a fase aguda têm-se a infecção crônica, conhecida por latência clínica, caracterizada por um lento aumento da viremia e uma gradual depleção dos linfócitos T CD4+ que pode perdurar por anos (SILICIANO & GREENE, 2011). Sem tratamento com antirretrovirais nesta fase, 95% dos indivíduos podem morrer ao longo dos anos já que a contagem de linfócito decai com o tempo. Pacientes com contagem de linfócitos T CD4+ acima de 350 células/mm³ apresentam alguns casos infecciosos, entretanto indivíduos com contagem de linfócito abaixo de 200 células/mm³ já apresentam o sistema imune comprometido sendo alvo de infecções oportunistas e neoplasias, configurando quadro de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

2.5 Medicamentos antirretrovirais (ARV's)

A implementação da terapia antirretroviral altamente eficaz (*HAART / Highly Active Antiretroviral Therapy*) para tratamento de pacientes infectados pelo HIV reduziu globalmente os casos de óbitos por causa básica AIDS em 35% desde 2005. Estima-se que em 2013, 12,9 milhões de pessoas receberam tratamento antirretroviral e que a terapia pode ter ajudado a melhorar a qualidade de vida de aproximadamente 40,2 milhões de pessoas desde que a epidemia teve início. (UNAIDS, 2014).

Desde 1996, o Brasil foi o país pioneiro a adotar política pública de acesso a tratamento antirretroviral de forma gratuita no âmbito do SUS (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Dados referentes a 2012 apontam que aproximadamente 313 mil

pacientes distribuídos em todo o país fazem uso da terapia com antirretrovirais, destes 76% apresentam carga viral indetectável (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a).

As recomendações para o início da terapia antirretroviral avaliam o início imediato em todas as pessoas vivendo com HIV/AIDS, em indivíduos sintomáticos independente da contagem de linfócitos T CD4+ e em gestantes. Em indivíduos assintomáticos é recomendado o início se a contagem de linfócitos T CD4+ for ≤ 500 células/mm³ e em outras situações específicas, como coinfeções com outros vírus. (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013b)

Os medicamentos antirretrovirais atuam diretamente em fases do processo de replicação do HIV o que reduz de forma significativa a carga viral, recuperando o sistema imune, fornecendo assim melhor qualidade de vida (HO et al., 1995; RAY et al., 2010). Além disso, o uso prévio da terapia reduz a possibilidade de transmissão do vírus na população (COHEN, CHEN, et al., 2011).

O primeiro medicamento antirretroviral de atuação eficaz na melhoria da qualidade de vida dos pacientes, foi o AZT (Zidovudina) testado em 1985 e comercializado em 1987 (Revisado por: RICHMAN, 1991). Após anos de pesquisas e de desenvolvimento tecnológico, várias classes de medicamentos que atuam em diferentes estágios do ciclo replicativo do HIV-1 foram desenvolvidos.

São cinco classes de antirretrovirais disponíveis no Brasil:

1) Inibidores Nucleosídicos (análogos) da Transcriptase Reversa (INTR ou NRTI): Os nucleosídeos que compõem esse medicamento competem com os dNTPs utilizados pela célula para formar o DNA viral. Dessa maneira, os nucleosídeos atuam como um falso substrato para a enzima e ao ser incorporado na fita interrompe o processo de replicação. Nessa classe de medicamento o SUS dispõe: Lamivudina, Abacavir, Estavudina, Tenofovir, Zidovudina, Didanosina e a combinação Lamivudina/Zidovudina.

2) Inibidores Não-Nucleosídeos (não análogos) da Transcriptase Reversa (INNTR ou NNRTIs): Estes se ligam diretamente ao sítio alostérico da transcriptase reversa do vírus induzindo alteração na estrutura da enzima que conseqüentemente reduz a atividade polimerase da enzima. Nessa classe de medicamento o SUS dispõem: Efavirenz, Nevirapina e Etravirina.

3) Inibidores da Protease (IPs): Essa classe de medicamento se liga ao sítio ativo da protease o que impede a ligação do substrato da enzima a este sítio. Dessa maneira, a enzima não tem efetividade em clivar proteínas que tornam o vírus maturo e infeccioso. Nessa classe de medicamento o SUS dispõem: Atazanavir, Darunavir, Fosamprenavir, Indinavir, Lopinavir/r, Nelfinavir, Ritonavir, Saquinavir e Tipranavir.

4) Inibidores da Integrase (IIs): Se ligam a enzima integrase impedindo a integração do DNA proviral ao material genético humano. Com isso a replicação é reduzida. Nessa classe de medicamento o SUS dispõe: Raltegravir.

5) Inibidores de fusão: Basicamente inibem a ligação do vírus a célula. Nessa classe de medicamento o SUS dispõem: Enfuvirtida e Maraviroque (TAN et al., 2013). (ANASTASSOPOULOU, 2012; ARTS e HAZUDA, 2012; BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010, 2011; QADIR e MALIK, 2010)

De acordo com o Protocolo clínico e as diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos publicado pelo BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2013c) a primeira linha de tratamento inclui dois INTR e um INNTR; a segunda inclui dois INTR e um IP/r.

Apesar dos avanços nos medicamentos antiretrovirais, que possibilitaram aos portadores do HIV uma significativa melhora em sua qualidade de vida, vírus resistentes aos antiretrovirais foram selecionados em todos os locais onde a terapia fora utilizada (WAINBERG, ZAHARATOS e BRENNER, 2011).

2.6 Resistência aos antirretrovirais

A resistência viral pode ser definida pela presença de mutações em um ou vários genes, que reduzem total ou parcialmente o efeito do medicamento antirretroviral (ARELLANO-GALINDO et al., 2012). Essa redução total ou parcial do efeito do medicamento pode levar ao paciente a um quadro de falha terapêutica, que acontece quando a carga viral plasmática se torna detectável em pacientes que usavam medicamento ou quando após seis meses do início ou troca do tratamento antirretroviral, a carga viral se mantém detectável (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013c).

Para entender como se origina a resistência viral adota-se a complementariedade dos fatores ,causa e consequência. A causa da resistência viral tem síntese de diversos e complexos fatores, dentre eles problemas que envolvem medicamentos, como dosagem inadequada e mal funcionamento do antirretroviral, problemas como a adesão correta do tratamento e o contágio com cepa resistente (AFANI e GALLARDO, 2011). Como consequência dos fatores anteriormente citados, ocorre a alta produção de partículas que se alia a fatores evolutivos característicos do HIV-1 como a alta taxa de mutação e recombinação viral. Nesse ambiente, mutações de resistência podem surgir e ser fixadas.

Pode-se classificar de duas maneiras a resistência viral em: (1) Resistência primária, onde o indivíduo se contaminou com vírus resistente selecionado em outro hospedeiro e (2) Resistência secundária que se apresenta em pacientes que fazem o uso de antirretrovirais e que uma ou mais mutações de resistência são selecionadas e fixadas (Revisado por: PAREDES e CLOTET, 2010).

O primeiro caso de resistência viral foi noticiado por ERICE et al., no ano de 1993. Após esse fato, o desenvolvimento de tecnologia para mapeamento das mutações de resistência acabaram sendo difundidas pelo mundo. Basicamente há quatro tipos de ensaios para se detectar e mapear mutações de resistência, o ensaio genotípico, o ensaio

fenotípico, o ensaio fenotípico virtual e o teste de tropismo (ARELLANO-GALINDO et al., 2012). O mapeamento das resistências aos antirretrovirais representou um grande avanço na qualidade de vida dos pacientes, pois a partir da detecção de cepas resistentes a medicação pode ser trocada e a carga viral reduzida.

As mutações classificadas como principais ou *Major Mutations*, são aquelas que podem conferir perfis alto, intermediário e baixo de resistência, e mutações acessórias são aquelas que não apresentam perfil de resistência significativa de forma isolada.

Como dito anteriormente as mutações de resistência visam reduzir total ou parcialmente o efeito do medicamento antirretroviral, dessa maneira as mutações vão prejudicar a atuação dos antirretrovirais nas etapas da ligação, replicação e maturação do vírus.

As mutações contra os INTR agem de duas maneiras: (1) Evitando a incorporação do nucleosídeo análogo, tendo como consequência o prosseguimento do processo replicativo. Um exemplo de mutação de resistência que causa tal efeito é a mutação M184V e L74V, que inviabilizam o uso do medicamento Lamivudina.

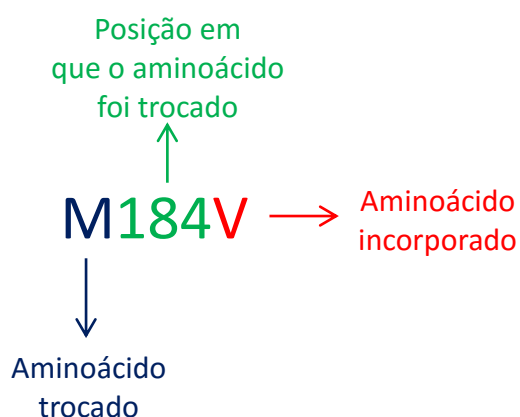


Figura 6 - Representação explicativa da representação das mutações de resistência ao HIV-1. Elaborado por: André Corado

(2) Removendo o nucleosídeo análogo já incorporado na fita. As mutações que causam essa remoção são conhecidas mutações análogas a timina. (Revisado por: CLAVEL e HANCE, 2004)

Os INNTR atuam se ligando diretamente ao sítio alostérico da transcriptase reversa do vírus induzindo alteração na estrutura da enzima que conseqüentemente reduz a atividade polimerase da enzima. As mutações contra os INNTR modificam a estrutura deste sítio impedindo a ligação do inibidor à enzima. As mutações contra os IPs e IFis (inibidores de fusão), atuam de forma semelhantes aos INNRT's, as mutações alteram estruturalmente o local onde o inibidor iria se ligar. (Revisado por: SHAFER, 2002)

2.6.1 Resistência aos antirretrovirais no Brasil

Em 2003, BRINDEIRO et al., analisaram a resistência a antirretrovirais em oitos estados do Brasil com uma coorte de seqüências amplificadas de 409 pacientes. Como resultado, obtiveram resistência primária em 2,24% ao inibidor de protease, 2,36% para o inibidor nucleosídico da transcriptase reversa e 2,06% aos inibidores não nucleosídicos.

Em 2009, SPRINZ et al., realizaram outro grande estudo envolvendo a resistência primária, desta vez 13 cidades brasileiras com 387 pacientes foram analisados. O resultado da resistência primária ficou em 7%, com prevalência de 1% aos inibidores de protease, 4,4% aos inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa e 1,3% aos inibidores nucleosídicos. Diversos estudos sobre resistência primária foram publicados: em Tocantins a mesma ficou em 11,5% (CARVALHO et al., 2011). Em Recife dois trabalhos avaliaram a resistência primária que ficou em 3,6 e 4,6% (CAVALCANTI et al., 2012; MEDEIROS, DE et al., 2006). No Mato Grosso, especificamente na capital Cuiabá a resistência primária foi de 5,4% (FERREIRA, 2011). Em Santa Catarina GRÄF et al.,(2011) analisaram 80 pacientes *naïves* ou recém diagnosticados, com prevalência

primária de 11%. No estado do Ceará 9,5% dos pacientes apresentaram resistência primária. Na região norte, em Manaus JACOMINI, (2007) analisou 52 amostras de pacientes *naïves* e encontrou resistência primária de 11,5%.

Outra pesquisa realizada em nove estados brasileiros, mas somente com pacientes homossexuais, aponta para resistência primária de 21,4% e secundária de 35,8% (BERMÚDEZ-AZA et al., 2011).

Analisando a resistência secundária em pacientes com falha terapêutica do Distrito Federal CERQUEIRA et al., (2004) encontraram mutações de resistência em 84,0% dos pacientes analisados. Em Piracema, município do estado do Rio de Janeiro, em indivíduos que fazem uso de medicamento a resistência registrada foi de 33,3% (EYER-SILVA e MORGADO, 2005). Em outro estudo com pacientes em falha terapêutica do Amazonas e Pará foram respectivamente encontradas mutações de resistências contra os NRTI (96,9%), PI (62,5%) e NNRTI (56,3%) nas amostras do Pará e NRTI (91,6%), PI (61,1%) e NNRTI (50,5%) nas amostras do Amazonas (MACÊDO, 2010).

Em São Paulo KALMAR, (2007) encontrou mutações de resistência em 27,7% de pacientes em interrupção terapêutica por mais de seis meses. Além disso, 76,3% apresentavam mutações para os análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa, 39,4% para os não análogos nucleosídeos inibidores da transcriptase reversa e 13,1% para os inibidores da protease.

2.7 Fatores imunogenéticos associados ao HIV-1

Grande parte dos indivíduos infectados com o HIV que não recebem tratamento com ARVs ao longo dos anos apresentam depleção contínua dos linfócitos T CD4+ e aumento da carga viral. Entretanto, alguns indivíduos conseguem ao longo dos anos

manterem uma boa contagem de linfócitos TCD4+ e carga viral reduzida quando sem tomar medicamento (CAO et al., 1995). Estudos de associação apontam que fatores genéticos do hospedeiro poderiam influenciar no curso da doença, positivamente, como por exemplo, mantendo a carga viral abaixo dos limites detectáveis, ou ainda negativamente acelerando a progressão da doença (Revisado por: DEEKS e WALKER, 2007)

Um dos fatores imunogenéticos protetivos presente em pacientes HIV positivos é um alelo mutante oriundo da deleção de 32 pares de bases (pb) do gene CCR5, descrito primeiramente por DEAN et al., (1996). O HIV-1 possui tropismo pela molécula CD4 presente na superfície dos linfócitos, macrófagos e células dendríticas, entretanto só esta ligação não é suficiente para que o vírus ingresse na célula, é necessário a ligação do vírus a um o co-receptor, neste caso, o de quimiocina CCR5 codificado pelo gene CCR5 (ARRILDT, JOSEPH e SWANSTROM, 2012; FAUCI, 1988; RIZZUTO, 1998). O gene CCR5 está localizado no braço curto do cromossomo três (3p21.31), contendo uma região codificante de 1055 pares de bases, o alelo CCR5- Δ 32 (rs333) está localizado no éxon 3, posição no gene 8315 e resulta num códon de terminação, originando proteínas do CCR5 truncadas que acabam não sendo expressas na superfície da célula que consequentemente evitam a entrada do HIV-1 (Revisado por: AN e WINKLER, 2010). Portanto, o HIV-1 não consegue infectar células de indivíduos que são homozigotos para o CCR5/ Δ 32, todavia indivíduos heterozigotos (CCR5/CCR5 Δ 32) apresentam uma progressão mais lenta da doença, pois expressam proteínas do CCR5 que ainda possuem certa funcionalidade (DEAN et al., 1996).

Em um estudo de meta-análise com indivíduos sadios a prevalência do homozigoto recessivo (CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32) encontrada foi de apenas 1% (LIU et al.,

2012), destaca-se que esta homozigose recessiva é predominante em caucasianos (LIU et al., 1996).

Estudos para avaliar a frequência do rs333 em pacientes HIV positivos hoje é de extrema importância, pois a identificação do polimorfismo contribui para a indicação de um medicamento muito eficaz, o Maraviroque, antagonista de CCR5, que inibe a ligação do vírus a célula (HUGHES e NELSON, 2009).

Na América Latina, precisamente na Colômbia com 29 pacientes HIV positivos, encontrou apenas um (3,57%) único paciente CCR5/CCR5 Δ 32, os demais eram CCR5/CCR5 (DÍAZ et al., 2000).

No Brasil, um grande estudo abrangendo a região sudeste, com uma coorte de 152 pacientes *naïves* e 450 pacientes em AIDS foi realizado para determinar a frequência de rs333 nesta população. Como resultado, a prevalência encontrada para CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32 foi zero, para CCR5/CCR5 Δ 32 foi de 7,2% e para CCR5/CCR5 foi de 92,8% (REICHE et al., 2008). Em São Paulo, dos 183 pacientes analisados quanto ao rs333, 11,5% eram CCR5/CCR5 Δ 32 e 88,5% CCR5/CCR5 (MUNERATO et al., 2003). GRIMALDI et al., (2002) realizaram um estudo que incluía 113 portadores do HIV na Bahia. Como resultado, obtiveram a prevalência para indivíduos heterozigotos (CCR5/CCR5 Δ 32) de 8,8% e o restante 91,2% para indivíduos homozigotos (CCR5/CCR5). No estado de Pernambuco 260 indivíduos infectados pelo HIV também foram analisados, 22 (8,4%) apresentaram genótipo CCR5/CCR5 Δ 32 e 238 (91,6%) apresentaram o genótipo CCR5/CCR5. Na região norte, o único estudo relacionando o rs333 e pacientes HIV positivos foi realizado no Pará. Em sua monografia, GOMES, (2009) analisou 330 pacientes HIV positivos e observou prevalência de 4% para CCR5/CCR5 Δ 32 e 96% para indivíduos CCR5/CCR5.

2.8 Evolução molecular do HIV-1

O HIV-1 é conhecido por apresentar alta variabilidade genética a ponto de um único genótipo gerar grandes quantidades de vírus geneticamente distintos uns dos outros (*quasispecies*) (CICHUTEK et al., 1992). A explicação para esta marcante característica abrange questões como alta taxa de mutação, alta produção de partículas virais, recombinação viral e a própria pressão seletiva do organismo do hospedeiro por intermédio de seu sistema imune.

A maioria das mutações que resultam na modificação do HIV-1 podem ter origem no processo de replicação do vírus, seja quando o DNA proviral transcreve o RNA pela ação da RNA polimerase II, seja quando o RNA viral é transcrito em DNA proviral pela atuação da transcriptase reversa, ou quando, o DNA proviral é replicado pela DNA polimerase do hospedeiro no processo de replicação celular (ABRAM et al., 2010). Estudos mostram que especificamente, a transcrição reversa é a principal fonte de mutação do HIV-1 (Revisado por: SMYTH, DAVENPORT e MAK, 2012). O principal motivo dessa alta taxa de mutação, seria a enzima transcriptase viral do HIV-1, que apresenta uma baixa fidelidade, cometendo erros como: substituições, deleções e adições de bases nucleotídicas (ROBERTS, BEBENEK e KUNKEL, 1988) na taxa de 0,1 – 0,2 a cada ciclo (PRESTON, POIESZ e LOEB, 1988; Revisado por: RAMBAUT et al., 2004). Contribui ainda para esse processo o fato da transcriptase reversa do HIV-1 não apresentar atividade exonucleásica, ou seja não possuir um mecanismo reparador .

Outro fator importante que influencia a diversidade genética do HIV-1 é a sua alta taxa de replicação. Estima-se que a replicação do HIV-1 dure aproximadamente 2,1 dias com produção diária 10^9 novos vírions (PERELSON et al., 1996). Aliado a alta taxa de mutação e alta produção viral existe ainda outro fator preponderante para a grande diversidade genética, os eventos de recombinação. A recombinação genética no HIV-1

acontece quando uma célula é infectada por dois vírus distintos simultaneamente e a transcriptase reversa alterna seus *templates* (Revisado por: RAMBAUT *et al.*, 2004). A recombinação pode acontecer entre tipos e subtipos e até mesmo entre regiões do mesmo vírus (BURKE, 1997) (Figura 6). A taxa de recombinação do HIV-1 é uma das mais altas entre todos os organismos, é estimada em aproximadamente três eventos recombinatórios por ciclo de replicação (ZHUANG *et al.*, 2002).

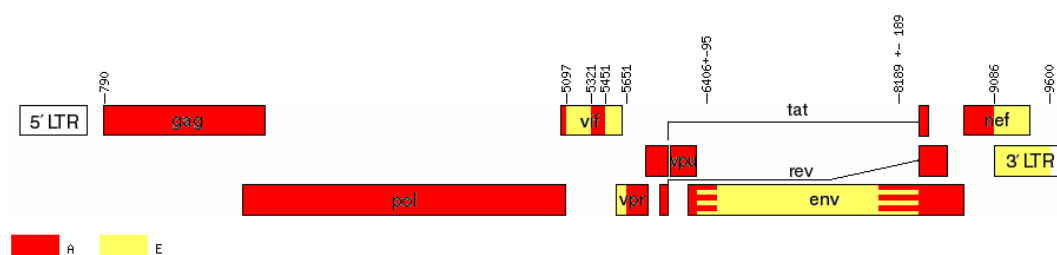


Figura7: CRF01_AE Retirado de:

www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/breakpoints.html#CRF01

2.9 Epidemiologia molecular e diversidade genética do HIV-1 pelo mundo

Apesar da grande diversidade genética o HIV-1 pode ser dividido filogeneticamente em grupos/tipos (grupos M (*major*), O (*outlier*), N (*non-M/non-O*) e P), subtipos, sub-subtipos ou sub-clados e ainda em CRFs (Formas Recombinantes Circulantes) ou em URFs (Única Forma Recombinante) (Revisado por: PEETERS, D'ARC e DELAPORTE, 2014).

Existem 35 milhões de pessoas vivendo com o HIV no mundo (UNAIDS, 2014), e as cepas virais pertencentes ao grupo M são responsáveis por 90% desta epidemia. O grupo M é dividido em nove subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), alguns subtipos podem ser classificados como sub-subtipos como é o caso do subtipo F, classificado em F1 e F2

(TRIQUES et al., 1999), ou ainda subtipo A, dividido em A, A2, A3 e A4 e ainda dentro deste grupo podem ser encontradas mais de 60 CRFs e inúmeras URFs (PEETERS, D'ARC e DELAPORTE, 2014). Os subtipos no grupo M variam entre si de acordo com o gene estudado, por exemplo, o gene *gag* varia 15% e o gene *env* 25% entre os subtipos (ROBERTSON et al., 2000). Quanto a distribuição dos subtipos, nas Américas encontra-se o subtipo B, o mosaico B/F e o subtipo C, na Europa há circulação dos subtipos A, B, C, G, na Ásia encontra-se A, B, C, G e as formas recombinantes AB, BC e AE, na Oceania há predominância do subtipo B e no continente africano além do HIV-2 há predominância dos subtipos A, C, D e AG (Revisado por: CASTRO-NALLAR et al., 2012) (figura 7). O subtipo C representa 48% da infecção global, seguido pelo subtipo A com 12% e subtipo B com 11%, CRF02_AG com 8%, CRF01_AE com 5%, o subtipo G com 5% e o subtipo D com 2%. Os demais subtipos e as CRFs e URFs são responsáveis por aproximadamente 5% dos casos (HEMELAAR et al., 2011).

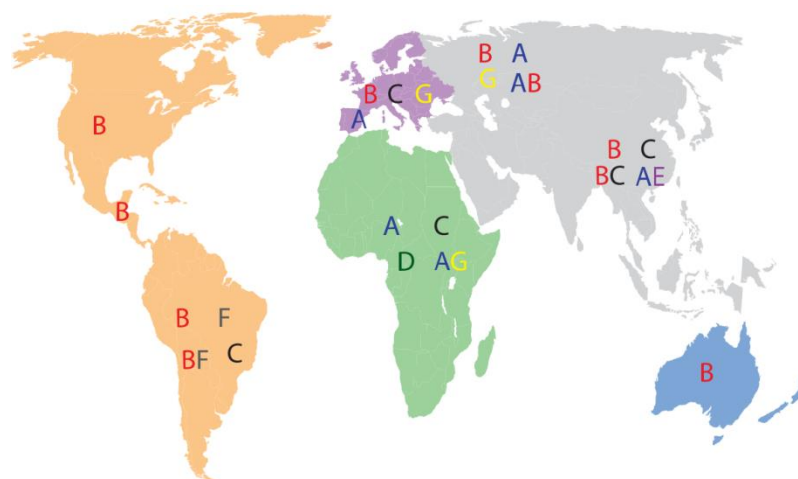


Figura 8 - Distribuição global dos subtipos pertencentes ao grupo M do HIV-1 (Revisado por: CASTRO-NALLAR et al., 2012)

O grupo O (*outlier*) foi descrito por GÜRTLER et al., (1994) ao estudar o vírus de uma paciente camaronesa que nunca havia saído de seu país. Cepas virais pertencentes a este grupo se limitam ao continente africano, especialmente em Camarões ou pessoas ligadas a este país. O grupo N descrito em 1998 e desde então foram menos que 20 casos registrados (SIMON et al., 1998), a grande maioria restrito ao continente africano. O Grupo P foi descoberto em uma paciente oriunda de Camarões que havia se mudado para a França, este grupo é restrito ao continente africano (PLANTIER et al., 2009).

2.10 Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil

A UNAIDS (2014) estima que 1.6 milhões de pessoas na América Latina sejam portadores do HIV, e que 47% deste total são casos registrados no Brasil. Acredita-se que o HIV foi introduzido no Brasil entre a década de 70 e início da década de 80, sendo o primeiro caso notificado no ano de 1982 na cidade de São Paulo-SP (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). A partir daí o HIV se espalhou por todo território nacional.

A vigilância epidemiológica no Brasil, sempre baseou seus dados na notificação compulsória de casos de AIDS. Entretanto, após recomendação de especialistas, já está em vigor a notificação de casos de infecção pelo HIV (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a). Tal medida será de grande importância para compreensão da infecção do HIV-1 na população brasileira, já que os indivíduos portadores do HIV não entravam nas estatísticas e assim a real situação do vírus na população não era completamente revelada. Sem dúvida, esta medida fornecerá melhor subsídio para o direcionamento das políticas de prevenção, diagnóstico e tratamento da doença.

Acredita-se que aproximadamente 718 mil indivíduos vivam com HIV/AIDS no Brasil, sendo a prevalência de infecção pelo HIV de 0,2% na população de 15 a 49 anos

de idade (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a). A epidemia brasileira é classificada como concentrada, pois o número de casos, novos ou antigos, em qualquer população de risco é maior que 5%. (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012a) (BRASIL, 2011)

Estudos que visam caracterizar o HIV-1 circulante nos estados brasileiros vem sendo realizados com frequência ao longo dos últimos 20 anos. A epidemia de AIDS no país contém cepas virais do grupo M, com prevalência dos subtipos B, F1 e C e das formas recombinantes B/F1 e B/C (figura 8) (BERMÚDEZ-AZA et al., 2011; BRINDEIRO et al., 2003). A entrada do subtipo B e F no país remonta o início da década de 70 e início da década de 80 (BELLO, GUIMARÃES e MORGADO, 2006), tal informação confere com o primeiro caso notificado de paciente HIV-1 positivo, registrado ano de 1982, levando em consideração o período de latência da doença (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Acredita-se que o subtipo B veio dos Estados Unidos da América e o subtipo F da África Central (BELLO et al., 2007). O subtipo C circulante no Brasil pode ter entrado no início da década de 80 e possui grande similaridade com uma cepa africana proveniente do Burundi (BELLO et al., 2008). Ainda é mistério como uma cepa ligada a este país foi introduzida no Brasil, já que os países não apresentam ligação histórica.

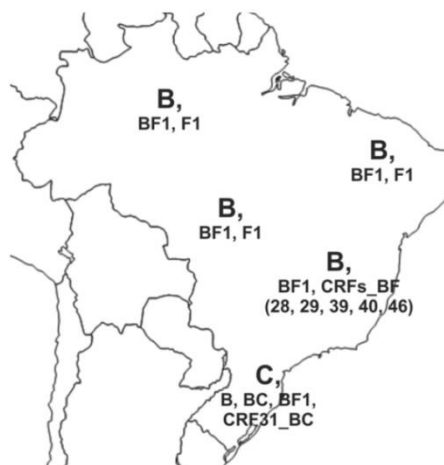


Figura 9 - Subtipos prevalentes no Brasil SILVEIRA et al., 2012.

A prevalência de cada subtipo varia conforme a localidade geográfica analisada no Brasil. Na região Sul do Brasil muitos trabalhos envolvendo a genotipagem do HIV-1 circulante foram realizados. MARTÍNEZ, et al., no ano de 2002 analisaram o gene *env* de 69 pacientes identificados entre 1994 e 1997, como resultado 52 sequências (75%) foram identificadas como subtipo B, 15 (22%) como subtipo C e 2 (3%) como subtipo F. No ano de 2003, BRINDEIRO *et al.*, num trabalho com pacientes *naïves*, que envolveram vários estados do Brasil, incluindo dois estados da região Sul, Paraná e Rio Grande do Sul, encontraram a predominância dos subtipos B (64%), C (30%), F1 (4%) e formas recombinantes (2%) e subtipos B (45%), C (31%), F1 (12%), CRF31a (9%), B/F1 (1,5%) e B/D (1,5%) respectivamente. Apesar da alta prevalência do subtipo B nos trabalhos anteriormente citados, trabalhos publicados mais recentemente mostram que na região sul o subtipo C é o mais prevalente (Revisado por: GRÄF e PINTO, 2013). Em um estudo realizado no município de Canoas, Rio Grande do Sul, observou-se uma prevalência maior do subtipo C, seguida pelo CRF31_BC e pelo subtipo B e F (SIMON et al., 2010). Ainda no Rio Grande Sul, em uma amostragem de 245 pacientes, 56% foram classificados como C, 21% como B, 5% como F1, 10,5% como URF_BC, 0,5% como CRF31 e 6%

como URF_BF1 (SILVEIRA et al., 2012). Em Santa Catarina, precisamente na capital do estado, Florianópolis, 82 amostras compreendendo os genes *int*, *env* e parte da *pol* RT/PR apontaram predominância do subtipo C (65,8%), seguido da forma recombinante B/C (18,3%), do subtipo B (13,5%), subtipo F1 (1,2%) e uma forma recombinante B/C/F (1,2%) (GRÄF et al., 2011).

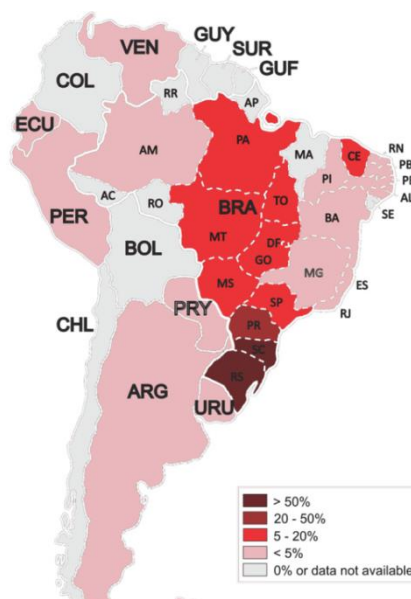


Figura 10 - Prevalência do subtipo C (HIV-1) no Brasil (Revisado por: GRÄF e PINTO, 2013).

Na região centro-oeste há predominância do subtipo B. No estado de Goiás, na capital Goiânia o subtipo B representou 82,5% das amostras analisadas seguidos dos subtipos, F1 (6,2%), C (3,1%), B/F1 (7,2%) e de um único mosaico F1/C/B (CARDOSO, QUEIROZ e STEFANI, 2009). Ainda no estado de Goiás COSTA et al., (2013) analisaram as regiões RT/PR de 18 pacientes grávidas portadoras do HIV-1. Como resultado encontraram maior prevalência do subtipo B (66,7%) seguido do subtipo C (16,7%), da forma recombinante B/F1 (11,1%) e um único registro do subtipo F1 (5,5%). Em Palmas, Tocantins, 52 pacientes tiveram as regiões PR/RT sequenciadas, como

resultado 78,8% das amostras foram classificadas como subtipo B, 5,8% como subtipo C, e um paciente como subtipo F1. Formas recombinantes B/F1 e C/F1 também foram encontradas (ao todo representam 13,5%) (CARVALHO et al., 2011). No Distrito Federal a genotipagem foi realizada com 19 amostras tendo como alvo de amplificação as regiões da transcriptase reversa e protease. Foi encontrada uma predominância do subtipo B (89,5%) e duas amostras recombinantes B/F1 (10,5%) (CERQUEIRA et al., 2004). Em 2007 também no Distrito Federal, VÉRAS et al., encontraram novamente o subtipo B (95,1%) como mais prevalente, seguido do mosaico B/F (4,9%). Em Mato Grosso, na capital Cuiabá, 92 pacientes HIV+/AIDS tiveram parte do gene *pol* amplificado e sequenciado, o resultado mostrou o predomínio do subtipo B, que representou 71,7% dos isolados, seguido dos subtipos C e F1 representaram respectivamente 5,4% e 3,3% (FERREIRA, 2011).

Na região nordeste também há prevalência dominante ao subtipo B. Em um trabalho realizado com 130 pacientes *naïves* e recém diagnosticados da região metropolitana de Recife no estado de Pernambuco CAVALCANTI et al., (2012) encontrou maior prevalência do subtipo B (56,9%), seguido de F (37,7%), C (3,1%) e B/F (2,3%). Ainda no Recife, outro trabalho com amostras de 84 pacientes *naïves* MEDEIROS et al., (2006) analisaram parte da RT/PR encontrando o subtipo B em 61 (72,6%) pacientes, subtipo F em 19 (22,6%), subtipo B/F em três (3,6%) e subtipo C em um único paciente oriundo do Sul do Brasil. No estado do Ceará das 74 amostras da região RT/PR 63 (85,1%) foram classificadas como subtipo B, seis (8,1%) amostras classificadas como subtipo F, quatro (5,4%) como subtipo C e uma amostra CRF_28 (ARRUDA et al., 2011). Na capital baiana, Salvador, MONTEIRO et al., (2009) também encontraram a predominância do subtipo B (84%), seguido do F (2,3%) e outros subtipos. Ainda na Bahia, na cidade de Feira de Santana, 52 amostras de mulheres na faixa

reprodutiva foram analisadas. O sequenciamento nucleotídico demonstrou 33 sequências do subtipo B, quatro sequências do subtipo F, uma subtipo C e 14 sequências da forma recombinante B/F (SANTOS et al., 2009).

Na região Sudeste: no estado de Minas Gerais, na capital Belo Horizonte analisando o gene *env*, PROIETTI et al., (1999) encontraram predominância do subtipo B e um vírus mosaico B/F. Porém, destaca-se que este trabalho teve apenas 11 pacientes como n amostral, número considerado muito baixo para se caracterizar uma capital ou ainda um estado. No estado de Espírito Santo em um trabalho realizado por CABRAL et al., (2006) com 97 pacientes, foram classificadas 73 amostras como subtipo B, nove como subtipo F, seis como C e 12 como forma recombinantes F/B. Em São Paulo, no município de Santos, 33 amostras foram analisadas, 22 pertencem ao subtipo B, quatro ao subtipo F, e dois subtipo C, além disso, cinco foram classificadas como B/F recombinantes (SA-FILHO, DE et al., 2009).

Na região norte poucos dados relacionados a genotipagem do HIV-1 foram publicados, algumas informações são provenientes de dissertações de mestrado ou teses de doutorado. Um dos primeiros trabalhos publicados com amostras dessa região foi o de VICENTE et al., no ano de 2000. Nesta pesquisa 31 pacientes de Manaus tiveram a região do envelope viral sequenciadas, como resultado foram obtidas proporções quase iguais dos subtipos B e F. Além disso, foram encontradas 14 formas recombinantes dos subtipos B,C e F entre os genes *p24 gag*, *pro*, e regiões do *env*. O estado de Amapá, precisamente a capital Macapá foi tema da dissertação de MOREIRA (2007), nesta capital analisando o segmento *pro* do vírus encontrou predominância do subtipo B (93,7%) seguido do subtipo F (6,3%). Em outra dissertação de mestrado, mas desta vez tendo como base a capital do estado do Amazonas, Manaus, JACOMINI, 2007 analisando parte do gene *RT* revelou a prevalência predominante do subtipo B (92,4%), seguido do subtipo F1 (3,8%)

e subtipo C (3,8%), até aquele momento, o subtipo C do HIV-1 não tinha sido detectado no estado do Amazonas.

Em um estudo que compreendeu pacientes dos estados do Pará e Amazonas (85%) amostras virais do HIV-1 foram classificadas como subtipo B, seguidas pelo subtipo F1 (4,7%) e pelas formas recombinantes B/F1 (4,7%) e C/F1 (0,8%) (MACÊDO, 2010; MACÊDO et al., 2012). Em uma pesquisa mais recente, ainda no estado do Amazonas, mas com 30 doadores de sangue HIV-1 positivos atendidos na Fundação Hemocentro de Manaus, encontrou-se novamente a predominância do subtipo B e duas amostras do subtipo C (CUNHA et al., 2012). Tal pesquisa corrobora com a detecção da circulação do tipo C no estado do Amazonas e ainda aponta que o tipo circulante apresenta alta similaridade com as cepas da região sul do Brasil.

A identificação do subtipo D pela primeira vez na região norte se deu em trabalho publicado por MACHADO et al., em 2009. Estes pesquisadores coletaram amostras de indivíduos HIV positivos do Pará e Amapá entre os anos de 1998 e 2002 a fim de caracterizar o vírus circulante nos estados. Como resultado, analisando parte do gene *env* foi encontrado predominância em Belém do subtipo B, seguido de F, D e C, e em Macapá existência somente do subtipo B. Analisando o gene *pro* a predominância em Belém permaneceu praticamente a mesma com exceção apenas do surgimento da forma recombinante CRF02_AG, em Macapá analisando ainda *pro* uma cepa foi classificada como F. Dessa maneira, seis cepas foram caracterizadas como mosaico, B^{env}/F^{pro}, F/B, C/B e B/D. Em sua dissertação de mestrado publicada em 2009 COSTA, estudou pacientes do sexo feminino HIV positivas dos estados do Acre e Tocantins. No estado do Acre, 11 amostras buscando informações de uma região da protease foram amplificadas, sendo todas elas caracterizadas como como subtipo B. O mesmo resultado ocorreu em relação ao segmento da transcriptase reversa.

2.11 HIV-1 em Roraima

O primeiro caso da síndrome da imunodeficiência adquirida diagnosticado oficialmente em Roraima foi no ano de 1988, e deste ano até o final de 2013 foram diagnosticados 1349 casos, sendo a maioria dos infectados residentes na capital, Boa Vista (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a). Roraima apresenta dados que chamam a atenção, principalmente no que tange a incidência dos casos de AIDS. De 2007 a 2012, dentre todos os estados da federação, Roraima figura entre os cinco primeiros estados com as maiores taxas de incidências, sendo que de 2008 a 2010 ocupou a segunda posição. Da mesma maneira, a capital Boa Vista de 2007 até 2011 também se posiciona entre as cinco capitais com maior taxa de incidência (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012b) (figura 10).

UF de residência	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
1 Rio Grande do Sul	31,5	33,3	40,9	40,9	35,7	33,9	36,9	44,1	42,9	40,2	39,1	40,2
2 Santa Catarina	30,5	33,5	41,6	37,7	36,8	34,4	33,9	29,9	31,3	32,8	31,6	36,4
3 Rio de Janeiro	29,3	29,6	37,0	34,0	36,3	33,3	32,4	30,7	28,8	32,7	31,4	31,5
4 Amazonas	10,8	12,0	15,2	13,2	17,5	19,2	19,6	20,9	28,7	31,5	31,5	29,4
5 Roraima	15,1	15,7	10,1	25,5	29,1	16,9	17,1	26,7	36,1	34,2	35,3	27,6
6 Mato Grosso	9,7	13,9	20,4	21,9	21,9	20,9	18,3	21,4	20,5	20,0	18,9	21,5
7 Rondônia	9,9	9,9	13,4	13,6	13,4	14,3	17,3	17,7	18,2	17,4	17,7	21,4
8 São Paulo	28,4	26,2	29,5	28,1	25,1	24,7	22,3	19,5	21,4	21,1	19,9	20,6
9 Amapá	7,1	9,6	13,2	9,0	12,7	12,3	13,5	16,5	17,6	18,0	17,5	20,3
10 Espírito Santo	15,7	17,3	21,7	20,2	20,8	19,0	18,0	16,9	20,4	20,9	21,8	20,3
11 Distrito Federal	20,0	16,1	23,5	27,9	21,7	20,1	17,7	16,8	17,4	17,7	16,7	19,5
12 Pará	4,7	8,2	9,4	10,4	14,6	13,1	13,1	14,6	18,4	17,9	19,4	19,1
13 Pernambuco	9,5	11,4	15,2	14,0	14,6	17,9	16,3	16,7	17,9	16,9	19,5	18,8
14 Paraná	17,4	16,9	21,5	19,4	17,2	16,4	16,1	16,9	26,4	17,9	17,3	18,0
15 Mato Grosso do Sul	13,4	13,9	19,9	21,4	19,0	17,5	18,4	18,7	22,3	20,1	18,8	17,6
16 Maranhão	5,9	6,2	6,7	8,6	11,3	10,7	11,7	12,0	13,8	15,8	15,4	17,1
17 Goiás	12,3	14,0	14,9	14,3	14,0	13,3	12,8	12,9	11,9	14,0	14,0	14,6
18 Minas Gerais	9,6	11,5	16,8	15,3	15,4	15,0	13,7	13,7	14,3	13,3	12,9	13,4
19 Ceará	7,4	8,1	8,8	10,0	11,4	9,8	9,7	13,8	13,8	13,1	12,1	12,6
20 Alagoas	5,3	7,1	7,8	8,5	7,4	9,0	8,9	12,1	14,8	11,4	11,2	12,6
21 Bahia	6,4	6,7	9,4	8,7	9,3	9,0	9,0	10,2	11,2	11,7	12,7	12,6
22 Sergipe	6,4	5,2	6,6	8,5	8,0	8,5	9,4	11,2	15,1	11,6	13,2	12,5
23 Tocantins	4,9	5,7	6,8	6,8	7,3	6,1	7,9	7,0	9,8	11,7	9,8	12,3
24 Rio Grande do Norte	6,2	5,9	5,5	6,9	4,9	10,2	8,3	11,1	11,3	11,5	10,6	11,9
25 Piauí	6,0	5,5	6,6	6,4	10,1	10,1	8,5	10,4	10,2	12,3	11,3	11,0
26 Paraíba	7,0	7,0	8,3	8,0	9,0	9,0	8,6	9,3	9,6	9,9	10,9	10,4
27 Acre	4,5	5,0	7,3	6,2	8,8	8,2	5,2	8,1	8,1	5,9	7,8	9,6

Figura 11 - Ranking modificado da taxa de incidência (por 100.000 hab.) de casos de AIDS notificados no Sinan, declarados no SIM e registrados no Siscel/Siclom, segundo UF de residência por ano de diagnóstico. Brasil, 2000-2011. (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012)

3 JUSTIFICATIVA

Dados que forneçam informações mais específicas sobre a epidemia do HIV/AIDS em Roraima não são encontrados com muita facilidade. Portanto, as informações sobre a epidemia HIV/AIDS em Roraima de uma forma geral, se resumem a basicamente dados expostos no Boletim Epidemiológico publicados pelo Ministério da Saúde.

A pouca informação de certos dados epidemiológicos se complementa com poucas/nenhumas informações relacionados a epidemiologia molecular do vírus circulante no estado. Após extensa revisão da literatura, não foram encontrados estudos relacionados com a genotipagem do HIV circulante no estado de Roraima, tampouco dados relacionados a resistência primária e resistência secundária. Apenas dados do estado do Amazonas (comentado anteriormente), fronteiro a Roraima podem garantir alguma possível noção sobre características moleculares do HIV circulante. Mesmo assim, somente dados relacionados ao Amazonas não garantem uma noção da real situação. Deve-se levar em conta que Roraima faz fronteira com dois países, a Guiana e a Venezuela, e há um intenso fluxo de pessoas entre essas nações. Brasileiros, venezuelanos e guianenses desempenham várias atividades, que envolvem desde atividades turísticas (que incluem o turismo sexual) a atividades econômicas (como o garimpo) e atividades criminosas (como o tráfico e exploração de mulheres). Além disso, deixa-se claro que pacientes HIV positivos de origem venezuelana e guianense cruzam a fronteira brasileira para usufruir de toda a estrutura que a saúde pública oferece aos cidadãos brasileiros portadores do HIV. Após revisão na literatura, não foram encontrados trabalhos relacionados ao HIV-1 circulante na Guiana. Em contrapartida, a Venezuela apresenta panoramas sobre a sua situação frente ao HIV. CASTRO et al., em 2003, BOUCHARD et al., em 2007 e CASTILLO et al., em 2009 encontraram

predominância do subtipo B e da forma recombinante B/F1. Além disso, foram encontrados o subtipo C e a forma recombinante B/C (CASTRO et al., 2005). Entretanto, tais estudos abrangeram populações que vivem ao norte e oeste do país, enquanto que ao sul (fronteira com o Brasil) não se encontraram trabalhos relacionados a genotipagem.

Roraima tem grande importância para estudos epidemiológicos, principalmente no que tange a vigilância, pois o estado é uma “porta” para o caribe, já que faz fronteira com os países Guiana e Venezuela, no entanto não se sabe qual a influência destes países na epidemia da HIV-1 em Roraima. Além disso, destaca-se que Roraima já foi porta de entrada do vírus Dengue sorotipo 4, genótipo II, possivelmente proveniente da Venezuela. Nesse contexto fronteiro, e pela falta de informação sobre o HIV circulante, dados sobre a caracterização dos subtipos circulantes do HIV-1 e de cepas virais resistentes são de fundamental importância já que possuem implicação na pandemia do HIV e seu controle por informarem sobre a biologia do vírus e suscetibilidade.

4 OBJETIVO

Caracterizar o HIV-1 circulante no estado de Roraima e fator imunogenético em pacientes atendidos no Laboratório Central do Estado de Roraima/Laboratório de HIV.

4.1 Objetivos Específicos

1. Identificar os subtipos do HIV-1 que circulam no estado de Roraima pelo gene da polimerase (região da transcriptase reversa, protease) do genoma pró-viral do HIV-1.
2. Investigar mutações (resistência primária e resistência secundária), nos vírus de portadores de HIV/Síndrome da imunodeficiência adquirida.
3. Descrever a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único rs333 no gene CCR5 relacionado à resposta imune ao HIV nos pacientes estudados.
4. Identificar o tropismo do HIV-1 pelos correceptores de quimiocina CCR5 e CXCR4.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Modelo de estudo

Estudo descritivo de corte transversal que se utilizou de sangue total excedente de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) atendidos pelo Laboratório Central do Estado de Roraima (LACEN/RR), que via assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1) concordaram em participar da pesquisa.

5.2 Aspectos Éticos

O estudo foi submetido à Plataforma Brasil em 18/05/2013 que por sua vez direcionou na mesma data ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Roraima (COEP/UFRR) (CAAE: 15629013.8.0000.5302). Em 10/10/2013 o projeto foi aceito pelo COEP/UFRR e o primeiro parecerem que já conteve a aprovação do projeto foi liberado em 29/11/2103 com o número do parecer em sendo aprovado com o número do parecer 474.028 (Anexo 1).

5.3 Local de estudo

O estado de Roraima com área de 224.300,506 km² está localizado na região norte do Brasil e faz fronteira com o estado do Amazonas ao sul e oeste, com o estado do Pará ao sudeste, com a Venezuela ao norte e Guiana Inglesa ao leste (Figura 7).

Na capital Boa Vista, vivem mais de 60% dos 450.479 habitantes do estado, os demais habitantes se espalham entre os 14 municípios restantes; Alto Alegre, Amajari, Bonfim, Cantá, Caracará, Caroebe, Iracema, Mucajaí, Normandia, Pacaraima, Rorainópolis, São João da Baliza, São Luiz e Uiramutã (IBGE, 2010).

Em Boa Vista, encontra-se o Laboratório Central de Roraima, entidade responsável e credenciada pelo Ministério da Saúde para realizar gratuitamente o diagnóstico sorológico do HIV e os exames de acompanhamento, carga viral e contagem de linfócitos TCD4+ e TCD8+. Pacientes HIV positivos se dirigem a cada 3 meses oriundos de todos os municípios de Roraima ao LACEN/RR para realizarem seus exames de acompanhamento.



Figura 12 - Mapa político do estado de Roraima

5.4 Participantes da pesquisa

Participaram do estudo indivíduos com sorologia positiva para o HIV, que assinaram o TCLE, de ambos os sexos, com faixa etária acima de 18 anos e até 65 anos,

e que realizam exames rotineiros para o acompanhamento do progresso da infecção no LACEN/RR.

5.5 Abordagem ao paciente

As coletas das amostras foram realizadas no LACEN/RR, as terças e quintas-feiras. Iniciada na primeira semana de Dezembro e finalizada na terceira semana de Janeiro 2013. A abordagem para a entrevista e assinatura do TCLE aconteceu na sala de espera do local de coleta quando o indivíduo, munido de seu documento de identidade se apresenta ao técnico do LACEN/RR para a realização da venopunção.

5.6 Coleta, armazenamento e transporte das amostras

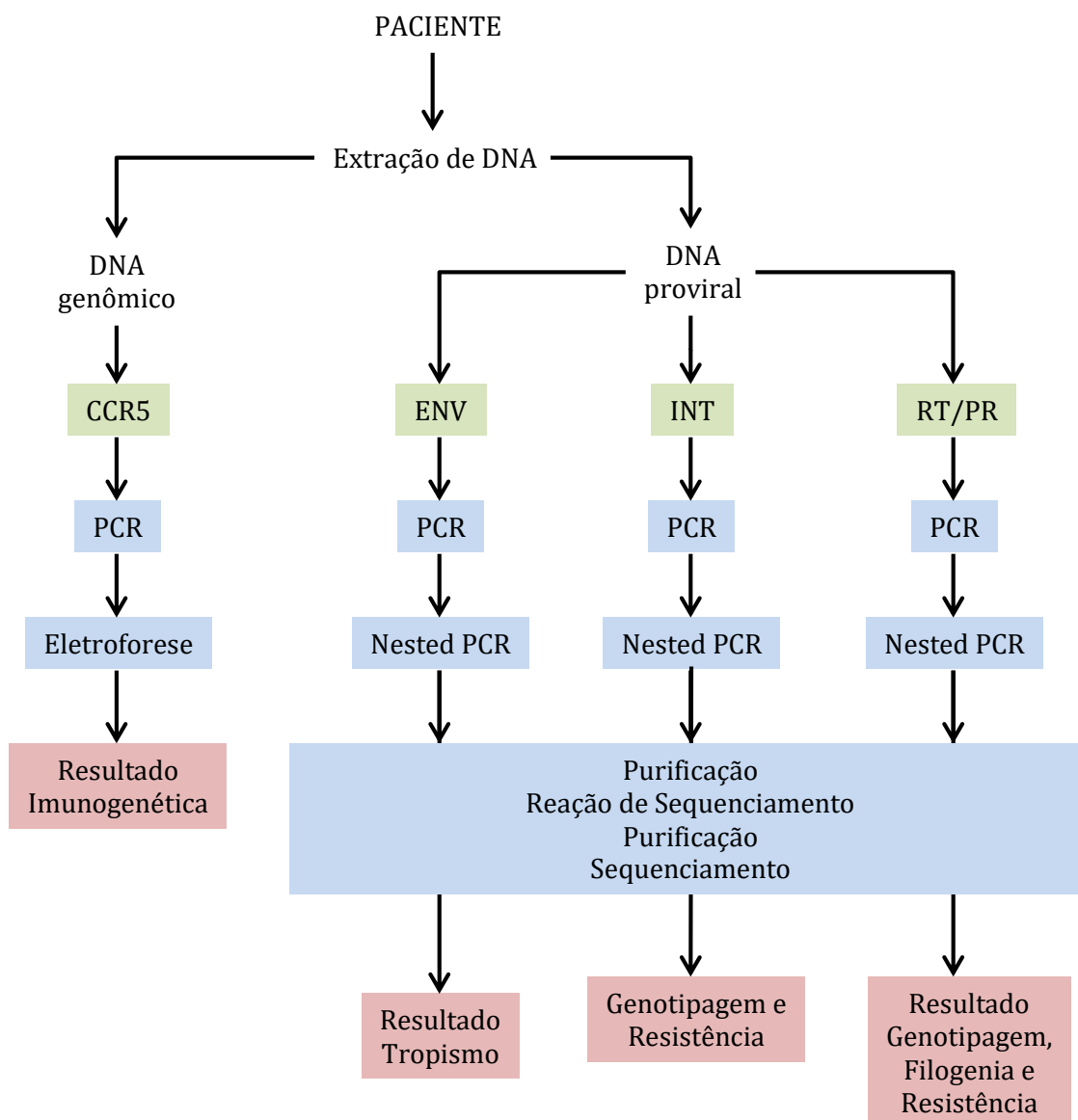
Para a realização de exames de carga viral e contagem de linfócitos T-CD4⁺/CD8⁺, o LACEN/RR colhe dois tubos de 5ml de sangue (com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) via punção venosa à vácuo. Um volume de 50µl de amostra foi retirado pelos técnicos da instituição para a contagem de linfócitos T-CD4⁺/CD8⁺, o sangue total excedente, liberado então para o estudo, foi alíquotado em dois tubos estéreis com quantidades iguais e identificados conforme o prontuário do paciente. Após a identificação os microtubos foram armazenados em *ultrafreezer* com temperatura -80°C pertencente ao próprio LACEN/RR até a data de envio.

O envio para o Instituto Leônidas e Maria Deane, localizado na cidade de Manaus, se deu por transporte aéreo. As amostras foram armazenadas em caixa com gelo seco, específica para transporte de materiais infecto contagiantes. Em Manaus, as amostras foram novamente armazenadas em *ultrafreezer* com temperatura -80°C.

5.7 Informações dos pacientes

Um questionário virtual foi criado no software Epiinfo 7 (Dean, A. G. et al. 2011) contendo todas as informações dos pacientes registradas nos questionários físicos aplicados durante a entrevista.

5.8 Visão geral dos procedimentos laboratoriais



5.9 Extração do DNA pró-viral e DNA humano

A extração e a purificação do DNA pró-viral e humano a partir de sangue total foi realizado pelo sistema automatizado QIAcube (QIAGEN), utilizando o kit QIAamp DNABlood (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Após extração determinou-se a concentração do DNA (ng/μl) e pureza no espectrofotômetro Biodrop Duo (Biochrom).

5.10 Amplificação das regiões alvo

A pesquisa visou amplificar parte do material genético do vírus e parte do material genético humano. No gene CCR5 realizou-se a amplificação somente pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese para revelação do fragmento esperado. Os genes pertencentes ao HIV passaram por duas etapas de amplificações (PCR e NESTED-PCR). Para melhor compreensão separou-se por tópicos os procedimentos adotados para a análise do material genético de cada espécie.

5.10.1 Amplificação de gene endógeno humano

5.10.1.1 CCR5

Os iniciadores para a reação de PCR foram escolhidos a partir do protocolo utilizado por FARIAS et al., (2012) conforme tabela abaixo.

Iniciadores	Sequência	Tamanho do Fragmento
CCR5 (F)	5'-GGTCTTCATTACACCTGC - 3'	CCR5/CCR5 = 137 bp
CCR5 (R)	5'-AGGATTCCCGAGTAGCAGATG - 3'	CCR5/CCR5Δ32 = 137 bp + 105bp CCR5Δ32/CCR5Δ32 = 105 bp

Tabela 1 - Iniciadores para o gene CCR5 e tamanho dos fragmentos gerados.

A concentração final da PCR para este gene, assumindo uma reação com volume total de 25µl encontra-se na tabela a seguir:

<i>Template</i>	50-200 ng
Mg ²⁺	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primers	0,4 µM
Enzima ¹	1 U
dH ₂ O UP	q.s.p

Tabela 2 - Concentração final de reagentes da PCR CCR5.

As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) nas condições térmicas e temporais a seguir: 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e seguido de extensão final com tempo de 7 minutos a 72°C.

5.10.2 Amplificação do DNA pró-viral

As regiões interessadas para amplificação via PCR e NESTED-PCR do vírus, são os genes: Pol - transcriptase reversa (RT) e protease (PR), o gene da integrase e parte do gene do envelope (*env*), este último utilizado apenas para identificação do tropismo viral.

¹ Para reação de PCR utilizou-se a enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega – Madison, WI, USA Cat.#M5001), tampão 5X Colorless GoTaq® (Promega – ¹Madison, WI, USA Part.#M890A) e Mg²⁺ 25mM (Promega –Madison, WI, USA Part.#A351B)

5.10.2.1 Genes *Pol* - *Transcriptase Reversa* e *Protease*.

A amplificação do gene *Pol* composto em parte pelo gene da transcriptase reversa e protease foi realizada em duas partes. Os iniciadores utilizados nesta pesquisa (tabela 3) foram retirados de (BELLO et al., 2008) e de (AULICINO et al., 2006).

Região	Iniciadores	Sequência	Posição em HXB2 ²	Fragmento
PR/ RT	1 rd G17	5'-AAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGA-3'	2017-2040	1630
	3 rd MMRT6	5'-TTTTACATCATTAGTGTGGG-3'	3628-3647	
	2 rd MMRT10	5'- CAGGCTAATTTTTTAGGGAA -3'	2077-2096	1497
	MMRT5	5'- TAAATTTGATATGTCCATTG -3'	3555-3574	

Tabela 3 - Iniciadores dos genes da PR/RT do HIV-1.

As amplificações foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) nas condições térmicas e temporais a seguir: a) PCR - 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 43°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, seguido de extensão final com tempo de 10 minutos a 72°C; b) NESTED PCR - 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 43°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos, seguido de extensão final com tempo de 10 minutos a 72°C. A concentração final da PCR e da NESTED PCR para uma reação com volume total de 25µl encontra-se na tabela abaixo. Destaca-se que para a segunda amplificação utilizou-se 2µl do produto da PCR como *template*.

² GenBank, accession number: K03455

³ rd - Round

<i>Template</i>	50-200 ng
Mg ²⁺	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
Primers	0,2 μM
Enzima ⁴	1 U
dH ₂ O UP	q.s.p

Tabela 4 - Concentração final dos reagentes da PCR e NESTED PCR HIV-1 RT/PR.

5.10.2.2 Gene da Integrase

Para a região da integrase do HIV foram utilizados os mesmos iniciadores do trabalho de Gräf et al., (2011) descritos na tabela abaixo:

Região	Iniciadores	Sequência	Posição em HXB2	Tam. Fragmento
INT	1 rd	MMRT7	5'-CATGGGTACCAGCACA-3'	4150-4165
		MMINT7	5'-TCTCCTGTWTGCARMCCCCAATATGTTGT-3'	5239-5267
	2 rd	MMRT2	5'-ATTGGAGGAAATGAACAAGTAGA-3'	4173-4195
		MMINT6	5'-GGGATGTGTACTTCTGAACTT-3'	5193-5213

Tabela 5 - Iniciadores do gene da Integrase HIV-1.

As amplificações, tanto a primeira como a segunda (NESTED PCR), foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) nas condições térmicas e temporais a seguir: a) PCR - 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 46°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e seguido de extensão final com tempo de 10 minutos a 72°C; b) NESTED PCR - 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 46°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e seguido de extensão final com

⁴ Para reação de PCR utilizou-se a enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega – Madison, WI, USA Cat.#M5001), tampão 5X Colorless GoTaq® (Promega – Madison, WI, USA Part.#M890A) e Mg²⁺ 25mM (Promega – Madison, WI, USA Part.#A351B)

tempo de 10 minutos a 72°C. Foram utilizados 2µl do produto amplificado na PCR como *template* para a NESTED PCR. A concentração final utilizada tanto na PCR como para a NESTED PCR assumindo um volume total de 25µl encontra-se na tabela a seguir:

<i>Template</i>	50-200 ng
Mg ²⁺	2,0 mM
dNTPS	0,2 mM
Primers	0,2 µM
Enzima ⁵	1 U
dH ₂ O UP	q.s.p

Tabela 6 - Concentração final dos reagentes da PCR e NESTED PCR Integrase.

5.10.2.3 Gene do Envelope viral

A região do envelope do HIV que determina o tropismo pelos receptores CCR5 ou CXCR4 será amplificada pelos iniciadores utilizados por DELWART et al., (1995).

Iniciadores	Sequência	Posição em HXB2	Tam. Fragmento
ED5 (outer)	5' – ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG-3'	6556/ 6281	1236
ED12 (outer)	5' – AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG -3'	7822/ 7792	
ED31 (inner)	5' – CCTCAGCCATTACACAGGCCTGTCCAAAG-3'	6816/ 6844	564
ED33 (inner)	5' – TTACAGTAGAAAAATTCCCCTC -3'	7359/ 7380	

Tabela 7 - Iniciadores do Envelope Viral.

⁵ Para reação de PCR utilizou-se a enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega – Madison, WI, USA Cat.#M5001), tampão 5X Colorless GoTaq® (Promega – Madison, WI, USA Part.#M890A) e Mg²⁺ 25mM (Promega – Madison, WI, USA Part.#A351B)

As ampliações, tanto a “*outer*” como a “*inner*”, foram realizadas no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) nas condições térmicas a seguir: a) PCR - 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e seguido de extensão final com tempo de 10 minutos a 72°C; b) NESTED PCR - 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 52°C por 45 segundos e 72°C por 2 minutos e seguido de extensão final por 10 minutos a 72°C.

Foram utilizados 2µl do produto amplificado na PCR “*outer*” como *template* para a PCR “*inner*”, a concentração final utilizado tanto na PCR como na NESTED PCR para uma reação com volume total de 25µl, encontra-se na tabela abaixo:

<i>Template</i>	50-200 ng
Mg ²⁺	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
Primers	0,2 mM
Enzima	1 U
dH ₂ O UP	q.s.p

Tabela 8 - Concentração final dos reagentes da PCR e NESTED PCR Envelope.

5.11 Confirmação da amplificação

Para cada amostra, 5µl do produto amplificado foi adicionado a 1µl de tampão de carregamento de amostra submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% preparado em Gel Red™ em tampão TAE 1X, com tensão de 100V por 1 hora.

5.12 Purificação dos produtos oriundos da NESTED-PCR

Utilizou-se o protocolo de purificação por Polietilenoglicol 8.000 à 20% (PEG – Promega – Madison, WI, USA - Cat. V3011) (Humphreys, Willshaw, & Anderson, 1975 com modificações) para purificar os produtos oriundos da NESTED-PCR.

Neste protocolo seguiram-se as seguintes etapas: 1) Em um microtubo de 1,5mL, na razão de 1/1, foi adicionado o produto da NESTED-PCR e PEG (20%). 2) Agitou-se a solução levemente e levou-se a incubação a 37°C por 15 minutos. 3) Centrifugou-se a 2500 CRF por 15 minutos a temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado prontamente. 4) Adicionou-se 125µl de etanol 80% gelado e em seguida uma nova centrifugação a 1450 CRF por 2 minutos. 5) Novamente o sobrenadante foi descartado. 6) Para a remoção de resíduos de etanol colocou-se o microtubo com a tampa aberta no concentrador de DNA a vácuo Mivac (Genevac SP Scientific) sob temperatura de 37°C por 15 minutos. 7) Por último, adicionou-se 20µl de água livre de nuclease.

Após o processo de purificação para melhor eluição do DNA, o produto purificado foi deixado por um período de duas horas à temperatura de 4°C para posterior quantificação no espectrofotômetro Biodrop Duo (Biochrom) e reação de sequenciamento.

5.13 Reação de sequenciamento (Sanger), purificação e sequenciamento

O sequenciamento por Sanger contemplou apenas os genes ligados ao HIV-1. Dessa maneira, os iniciadores utilizados neste procedimento foram oriundos do *round 2* (NESTED PCR) das amplificações.

As reações de sequenciamento foram realizadas no sentido senso e anti-senso, utilizando o *Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, cat: 4337455) contendo: 0,33µM de cada iniciador; 1x de Tampão 5x “*Save Money*”; 0,3µL

de BigDye; quantidade de *amplicon* determinada de acordo com o tamanho do fragmento gerado nas amplificações (tabela 9) e água livre de nucleases para completar o volume de 10µL. Microplacas específicas de 96 poços foram utilizadas para este fim. As reações aconteceram no termociclador Veriti® (Applied Biosystems) nas condições térmicas e temporais a seguir: 96°C por 1 minuto, 20 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos. Em seguida, 10 ciclos de 96°C por 2 minutos, 55°C por 15 segundos e 3 minutos a 62°C.

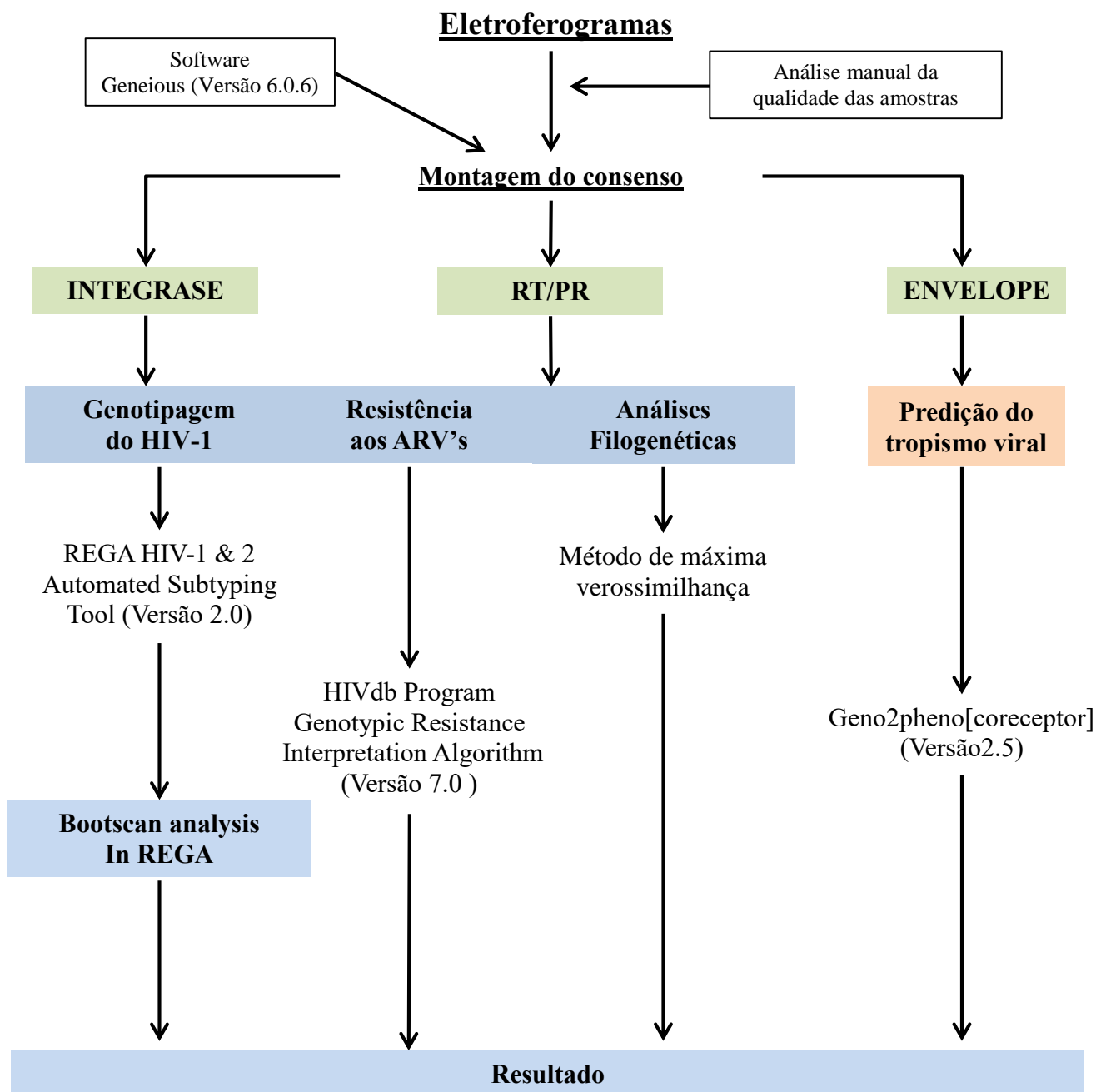
Tamanho do fragmento gerado (pb)	Concentração de DNA
100-200	1-3ng
200-500	3-10ng
500-1000	5-20ng
1000-2000	10-40ng
> 2000	20-50ng

Tabela 9 - Tamanho do fragmento gerado vs concentração de DNA.

Após o término da reação de sequenciamento foram realizadas as etapas de purificação dos produtos seguindo o protocolo de purificação EtOH/EDTA/Acetato de Sódio (Applied Biosystems). Basicamente, este protocolo inicia-se com preparação de solução contendo EDTA 125mM, acetato de sódio 3M (pH 5,2) na mesma proporção. Após o preparo, 2µL desta solução e 25 µL de EtOH 100% foram pipetados em cada um dos poços. A placa foi incubada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz para posteriormente ser centrifugada a 3.000 RCF por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida se adicionou 35µL de EtOH a 70% em cada um dos poços, acompanhando de uma nova centrifugação por 15 minutos, à 4°C e 1.650 RCF. Novamente o sobrenadante foi descartado e a placa aquecida à 52°C por 15 minutos. Antes de sequenciar o produto da reação de sequenciamento foi ressuspensionado com 10

μL de formamida Hi-Di e a placa aquecida a 95°C por 1 minuto. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems), instalado na plataforma de genômica do Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia.

5.14 Visão geral das atividades realizadas envolvendo bioinformática.



5.15 Análise manual dos eletroferogramas e montagem da sequência consenso

A edição dos eletroferogramas visa eliminar possíveis erros ocorridos no sequenciamento, para isso foi utilizado o *software* Geneious (v.6.0.6 criado por Biomatters).

Para montagem dos *contigs* os eletroferogramas foram alinhados com a sequência referência HXB2 (GenBank número de acesso: K03455) utilizando a ferramenta *map to reference* usando algoritmo de mapeamento do Geneious com ajuste de alta sensibilidade e interação de até 25 vezes. Foram removidos dos eletroferogramas regiões nas extremidades 5' e 3' das sequências com até 5% de chance de erro (*trimmed*). Após montagem dos *contigs* a sequência consenso foi extraída.

5.16 Ferramentas para a genotipagem do HIV-1

A identificação dos subtipos circulantes foi realizada utilizando o REGA HIV-1 & 2 *Automated Subtyping Tool* (Version 2.0) ferramenta que utiliza tanto os métodos filogenéticos como os de *bootscanning* e que analisa os genes *gag*, *pol* e *env* (Oliveira et al. 2005). Foram consideradas sequências que apresentavam suporte de 70%, abaixo desse valor as sequências foram analisadas no *bootscanning* do próprio REGA com uma janela de 400pb e um passo de 50 pb.

5.17 Análises filogenéticas

A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de máxima verossimilhança com o programa PhyML (GUINDON et al., 2010), no servidor ATGC da rede de plataformas de bioinformática francesas <http://atgc.lirmm.fr/phyml/>.

O alinhamento com 156 taxas e 1428 posições em formato PHYLIP, foi submetido ao servidor, sendo escolhido o método de substituição de nucleotídeos GTR+I+G de acordo com o resultado no software JModelTest JModelTest 2.1.6 v20140903 (DARRIBA et al., 2012) com análise de 5 esquemas de substituição e 40 modelos testados. A escolha do melhor modelo foi realizado pelo teste de AIC (Akaike Information Criterion). A topologia da árvore foi aferida pelo método de NNI (Nearest

neighbor interchange) e a probabilidade de existência de cada ramo foi verificada pelo método aLRT (approximate likelihood ratio test).

5.18 Análise do tropismo viral

O teste de predição do tropismo foi realizado pelo programa *geno2pheno[coreceptor]* avaliando a região V3 do envelope do HIV. Dados clínicos dos pacientes que incluíram carga viral, %CD4, contagem de CD8 e contagem de CD4, foram necessários para aumentar a confiabilidade da predição. Tais dados foram obtidos juntos ao LACEN/RR.

6 RESULTADOS

6.1 Informações sobre a população

Foram coletadas um total de 121 amostras, destas 95 são de pacientes crônicos infectados pelo HIV, e 26 se encaixam em pacientes recém diagnosticados e/ou *naives* (virgens de tratamento). A faixa etária variou entre 20 a 61 anos, sendo a mediana de 38 anos de idade. Quanto ao sexo, a maioria dos pacientes pertence ao sexo masculino (58,68%) (Tabela 10).

Dados	N (%)
Paciente	
Crônico	95 (78,51%)
<i>Naive</i>	9 (7,44%)
Recém diagnosticado	17 (14,04%)
Total de pacientes	121
Sexo	
Masculino	71 (58,68%)
Femino	50 (41,32%)
País residente	
Brasil	116 (95,85%)
Venezuela	4 (3,30%)
Guiana Inglesa	1 (0,85%)
Opção sexual	
Heterossexuais	89 (73,55%)
Homossexuais	23 (19,00%)
Bissexuais	9 (7,45%)

Tabela 10 - Dados gerais dos pacientes coletados.

Quanto à opção sexual, a maioria dos pacientes se declaram heterossexuais (73,55%), seguidos daqueles que se declararam homossexuais (19,00%) e daqueles que se declararam bissexuais (7,45%).

O ano de diagnóstico declarado pelos pacientes teve média o ano de 2008, e abrange amplitude mínima de 1992 e amplitude máxima o ano da coleta, 2013.

Dos 116 pacientes que residem no Brasil, três residem no estado do Amazonas, e um no estado do Pará, os 112 restantes residem em Roraima. Dos 14 municípios que abrangem Roraima, em 12 os pacientes declaram residência (tabela 11). Apesar de agora residirem no Brasil, nove pacientes brasileiros declararam que nos últimos 20 anos moraram em outros países.

Município	Pacientes
Alto Alegre	2
Bonfim	3
Boa Vista	92
Cantá	4
Caracaráí	2
Mucajaí	1
Pacaraima	1
Rorainópolis	3
São Luís do Anauá	3
Vila Iracema	1

Tabela 11 - Municípios dos pacientes residentes em Roraima.

Quanto ao tipo de exposição que podem ter levado os mesmos a serem infectados pelo HIV, 102/121 declararam que podem ter contraído o HIV em relações sexuais, quatro declararam que a transfusão de sangue foi a responsável, um destes é de origem venezuelana. Dois pacientes declararam ter sido infectados por usarem seringas contaminadas (usuário de drogas injetáveis), seis declararam acidente com material perfuro cortante contaminado e sete não souberam informar.

6.2 Amplificação do gene CCR5

Das 121 amostras apenas uma não pode ser amplificada. A amplificação do gene CCR5 gerou fragmentos de 137pb (CCR5/CCR5) e dois fragmentos um de 137pb e outro de 105pb (CCR5/CCR5 Δ 32) (Figura 13).

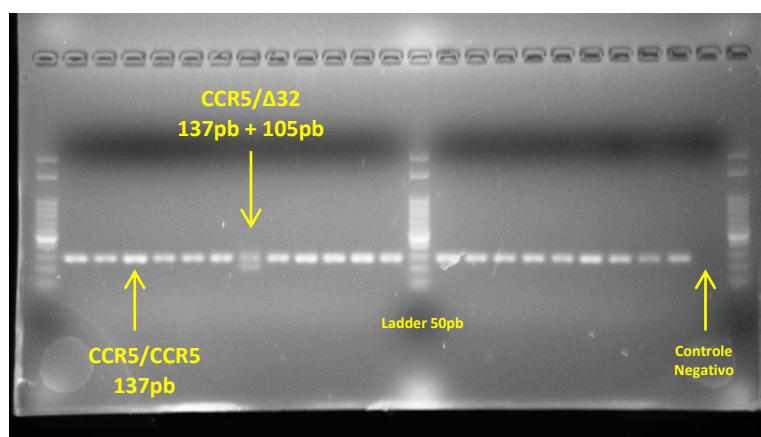


Figura 13 - Resultado de eletroforese do gene CCR5

Como resultado obteve-se prevalência de 90,83% para CCR5/CCR5, 9,17% para o CCR5/CCR5 Δ 32 e para o homozigoto recessivo a prevalência foi nula.

Perfil Genético	Frequência
Genótipo	Paciente (n = 120)
CCR5/CCR5	109 (90,83%)
CCR5/CCR5 Δ 32	11 (9,17%)
CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32	0
Frequência Genotípica	
CCR5/CCR5	0,910
CCR5/CCR5 Δ 32	0,090
CCR5 Δ 32/CCR5 Δ 32	0
Frequência Alélica	
CCR5	0,954
CCR5 Δ 32	0,046

Tabela 12 - Ocorrência de genótipos, frequência genotípica e frequência alélica do gene CCR5.

6.3 Amplificação e sequenciamento do gene *Pol*, região RT/PR

As reações de amplificação dos genes da *Pol* RT/PR foram realizadas em duas etapas. Na primeira PCR o fragmento esperado era de aproximadamente 1700pb. Das 121 amostras, 91 amplificaram (76,0%). Relatou-se que nesta primeira reação muitos fragmentos inespecíficos de revelação fraca são gerados (figura 14).

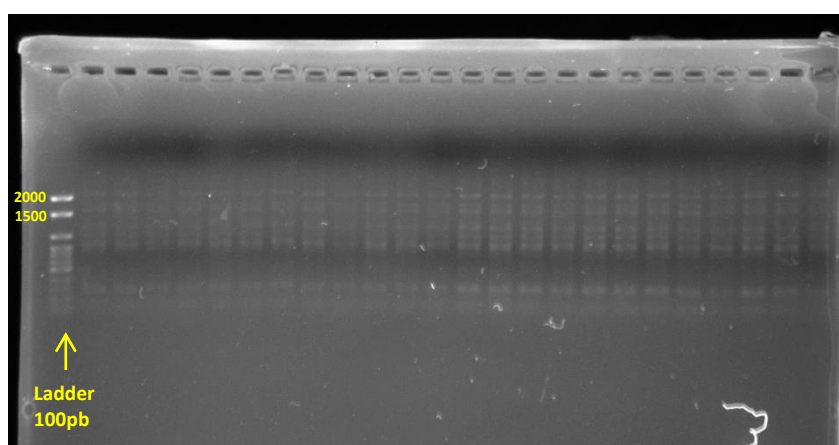


Figura 14 - Resultado de eletroforese da PCR de parte do gene *Pol*.

Na NESTED-PCR (segunda etapa) 81/91 (88%) amostras amplificaram gerando cada uma um fragmento de aproximadamente 1500pb (figura 15).

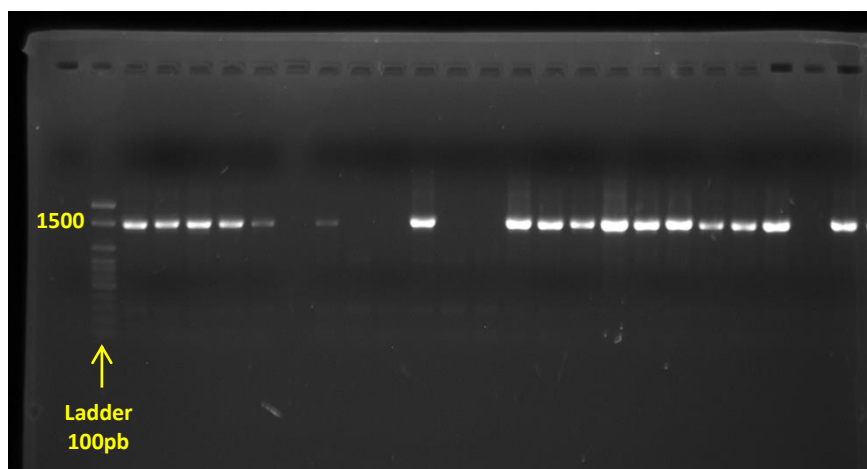


Figura 15 - Resultado de eletroforese da NESTED PCR RT/PR.

Após os processos de purificação, reação de sequenciamento e nova purificação as 81 amostras amplificadas na NESTED-PCR foram sequenciadas. Ao analisar manualmente a qualidade dos eletroferogramas de cada amostra, 29/81 foram descartadas, restando 52/81 (64,1%) amostras para genotipagem, análise filogenética e resistência viral.

6.4 Amplificação e sequenciamento do gene da Integrase

As reações de amplificação de parte do gene Integrase também foram realizadas em duas etapas. Na primeira PCR o fragmento esperado era de aproximadamente 1712pb. Das 121 amostras, 116 amplificaram (96,0%) nesta primeira etapa. Relatou-se também que nesta primeira reação muitos fragmentos inespecíficos de revelação fraca são gerados (figura 16).

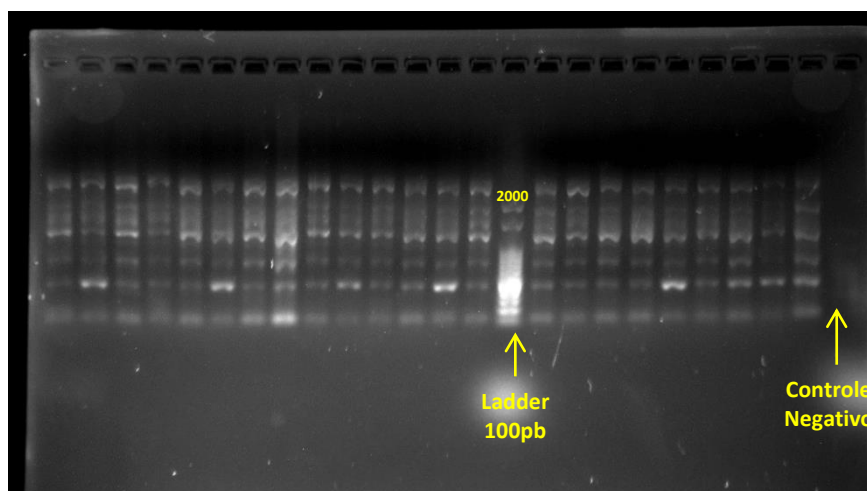


Figura 16 - Resultado de eletroforese da PCR de parte do gene da Integrase.

Na NESTED-PCR (segunda etapa) 80/116 (70%) amostras amplificaram gerando cada uma um fragmento de aproximadamente 1080pb (figura 17).

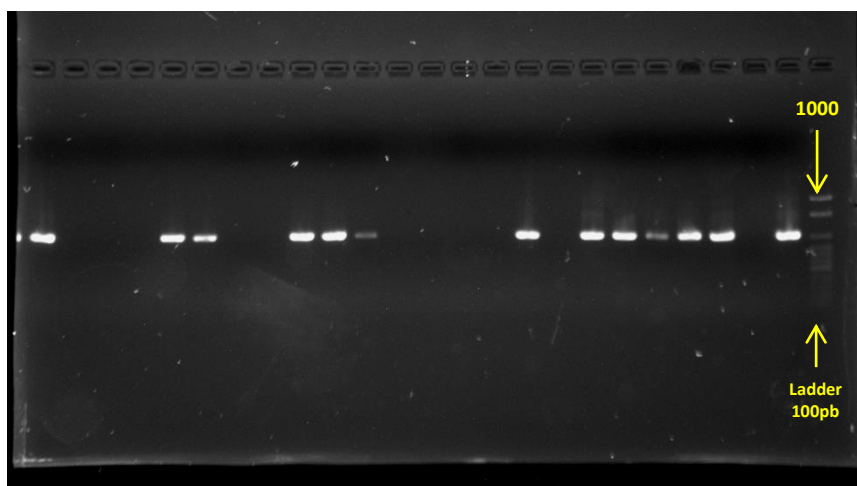


Figura 17 - Resultado de eletroforese da NESTED PCR de parte do gene Integrase.

Após os processos de purificação, reação de sequenciamento e nova purificação as 80 amostras amplificadas na NESTED-PCR foram sequenciadas. Ao analisar manualmente a qualidade dos eletroferogramas de cada amostra, 18/80 foram descartadas, restando 62/80 (65,4%) amostras para genotipagem, análise filogenética e resistência viral.

6.5 Amplificação e sequenciamento do gene do *Envelope*

Assim como as demais, as reações de amplificação de parte do gene do *Envelope* foram realizadas em duas etapas. Na primeira PCR (figura 18) o fragmento esperado era de aproximadamente 1236pb. Das 121 amostras, 116 amplificaram (96,0%) nesta primeira etapa.

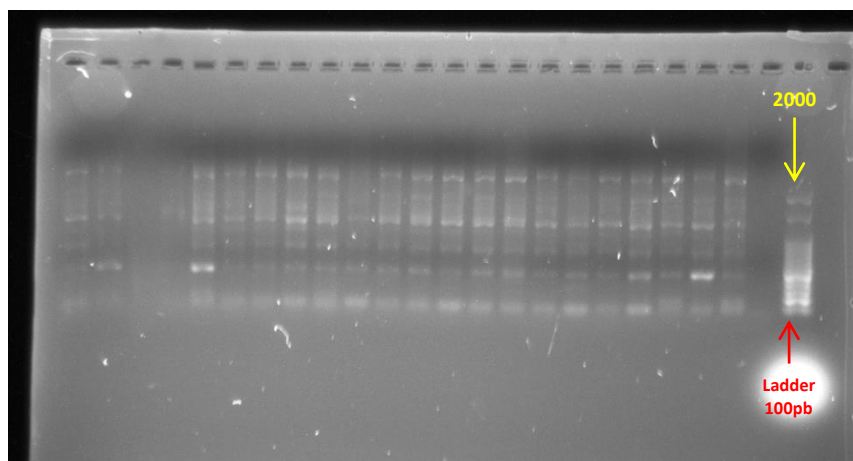


Figura 18 - Resultado de eletroforese da PCR de parte do gene do Envelope.

Na NESTED-PCR (segunda etapa) 83/116 (71,5%) amostras amplificaram gerando cada uma um fragmento de aproximadamente 564pb (figura 19)

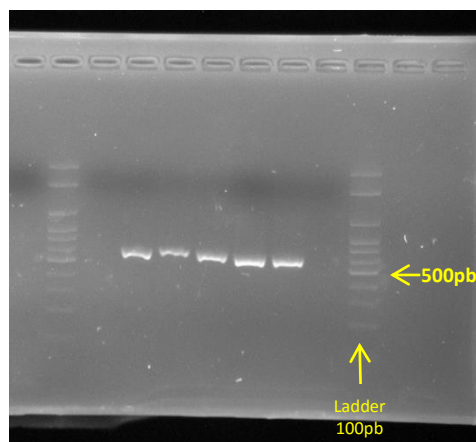


Figura 19 - Resultado de eletroforese da NESTED PCR de parte do gene do Envelope.

Após os processos de purificação, reação de sequenciamento e nova purificação as 83 amostras amplificadas na NESTED-PCR foram sequenciadas. Ao analisar manualmente a qualidade dos eletroferogramas de cada amostra, 20/48 (41,6%) amostras foram selecionadas para a predição do tropismo.

6.6 Diversidade genética do HIV-1 em Roraima

Utilizando o REGA HIV-1 & 2 *Automated Subtyping Tool* (Version 2.0), constatamos que das 52 amostras do gene *Pol* (RT/PR), 42 foram classificadas como sendo do subtipo B. Estas amostras foram selecionadas como “puros” B para posteriormente serem utilizadas na reconstrução filogenética. Dez amostras se mostraram possíveis recombinações, após análise de *bootscanning*, quatro dessas amostras foram classificadas como B e seis foram classificadas como vírus mosaico B/D (figura 20 – a).

Quanto à região da integrase analisada, das 62 amostras analisadas, 56 foram classificadas como subtipo B, duas como subtipo F1, duas como vírus mosaico B/F, uma como forma recombinante B/D e uma como forma recombinante B/C.

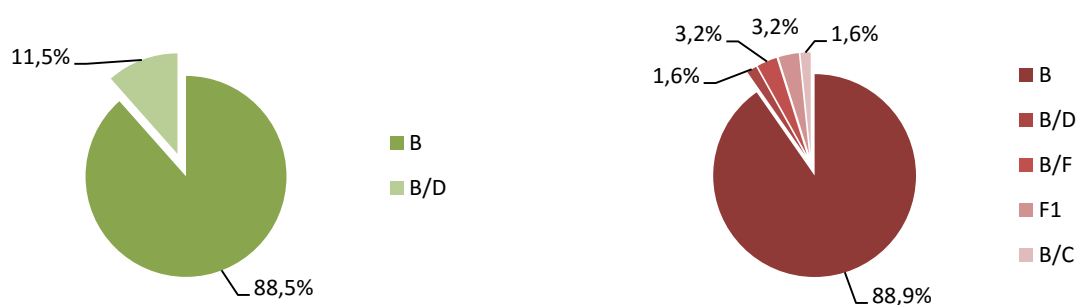


Figura 20 - A) Prevalência do subtipo B em pacientes HIV positivos do estado de Roraima (gene Pol (RT/PR)). B) Prevalência do subtipo B em pacientes HIV positivos do estado de Roraima (gene INT)

6.7 Filogenia do HIV-1 em Roraima

A reconstrução filogenética da região PR/RT das 42 amostras com genótipo B “puro”, pelo método de máxima verossimilhança, mostrou que as mesmas se agrupam em 17 clados diferentes. Um grande clado (azul claro) formado por amostras uruguaias, equatorianas, paraguaias, brasileiras, argentinas, venezuelanas e peruanas incluí as amostras MADM58; JMNG69 e ELA103, as duas primeiras se agrupam isoladas em um

sub-clado isolado, enquanto que a última é agrupada em um outro sub-clado com amostras da Venezuela (2009) e um amostra brasileira (2012) (figura 20, figura 21 e figura 22).

As amostras VADS16; RMDS15; MFBG21 agrupam-se em um grande clado (verde) que contém amostras do Perú (2007), Venezuela (2004 e 2006), Brasil (2001, 2005, 2008), Argentina (2001 e 2005) e Suriname (2000). Dentro deste grande caldo é possível observar a formação de um sub-clado contendo as amostras ION94; JDOG35; LOBM36; FGM31; WSDA407; JCDA80; CTA22; MFO62 e JR418, juntamente a um amostra da Guiana (2000).

As amostras RP403 e FMS425 (laranja) formam um sub-clado dentro de um clado maior contendo amostras do Uruguai (2002); Argentina (2004 e 2005); Venezuela (2009 e 2011) e brasileiras (1997, 1998 e 2011). Outra amostra deste estudo FRD419 forma um sub-clado com uma amostra da Argentina (2005) e Venezuela (2009).

Um outro grande clado (amarelo) formado por amostras da Argentina (2001 e 2007); Venezuela (2006, 2007 e 2009); Colômbia (2001) e Brasil (1999, 2005, 2006 e 2008) agrupa as amostras ICAF18; PWDS63; CDSF64 e KAL411. A amostra RFDS66 forma um pequeno clado com uma amostra do Perú (2007) e Venezuela (2011).

As amostras RLT78; FSDC52 e ECV106 se agrupam em um clado (cinza) com amostras do Paraguai (2002), Argentina (2001 e 2004) e Brasil (1998 e 2010). As amostras MADS7; VFDB50; NADS404; SA79; MRDS37 formam um pequeno clado (azul) com uma amostra brasileira (2006).

As amostras FJF32 e OSDM86 (rosa) formam um clado do Equador (1989), Argentina (2007), Venezuela (2011) e Brasil (1992, 1998, 2006, 2008 e 2009). Um pequeno clado (salmão) agrupa as amostras OVM76 e HODA89, juntamente a uma amostra brasileira (2004).

As amostras ES73; ERP41; MRDS409, ACVF423 e JNDS107 formam um clado (cinza claro) único com outras duas amostras brasileiras (2006 e 2012). Por fim a amostra VD71 é encontrada em um clado (roxo) com amostras brasileiras (2005 e 2010).

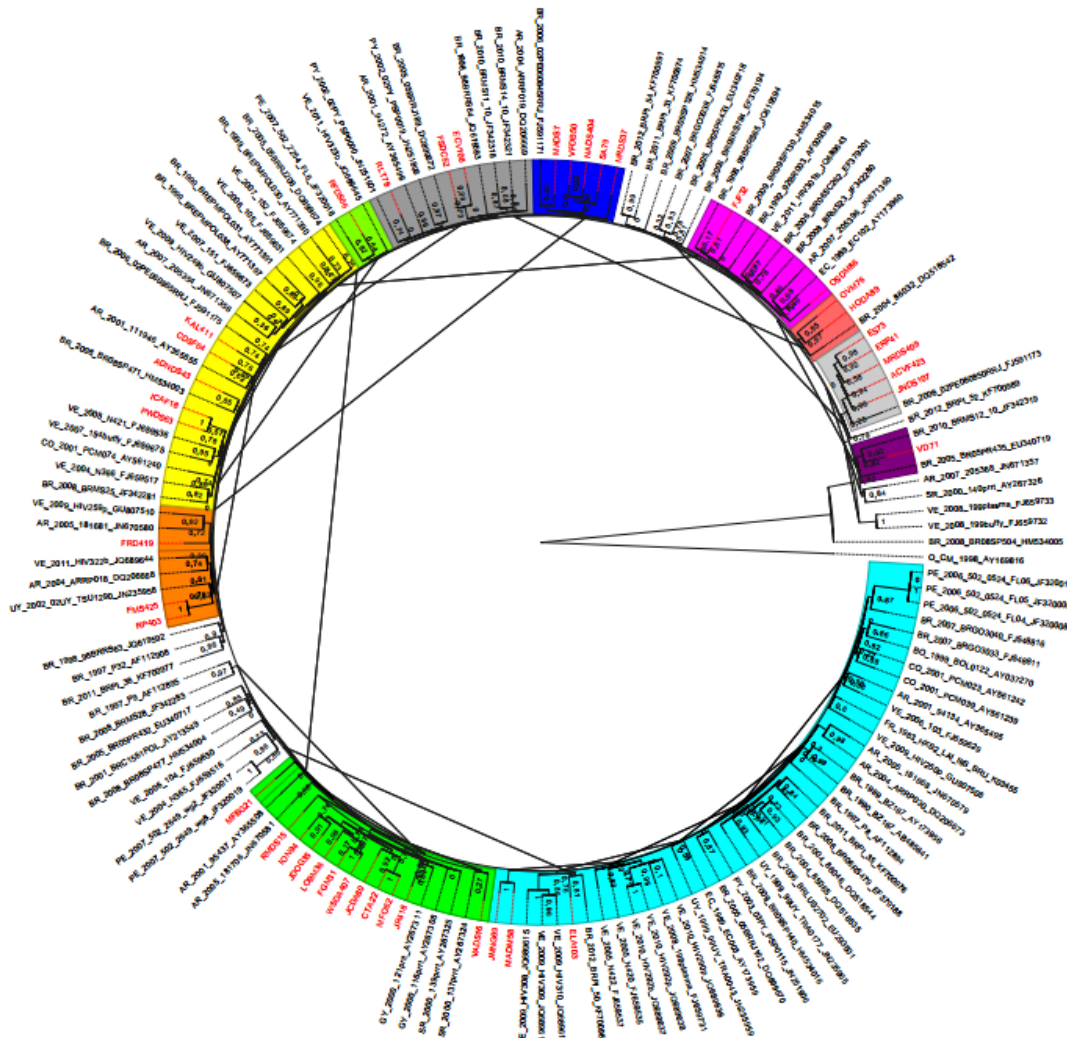


Figura 21 - Reconstrução Filogenética da região PR/RT. Amostras deste estudo em vermelho; amostras de referência nomeadas pelo país, ano de obtenção, código da amostra e número de acesso. Valores dos nós correspondem ao suporte aLRT

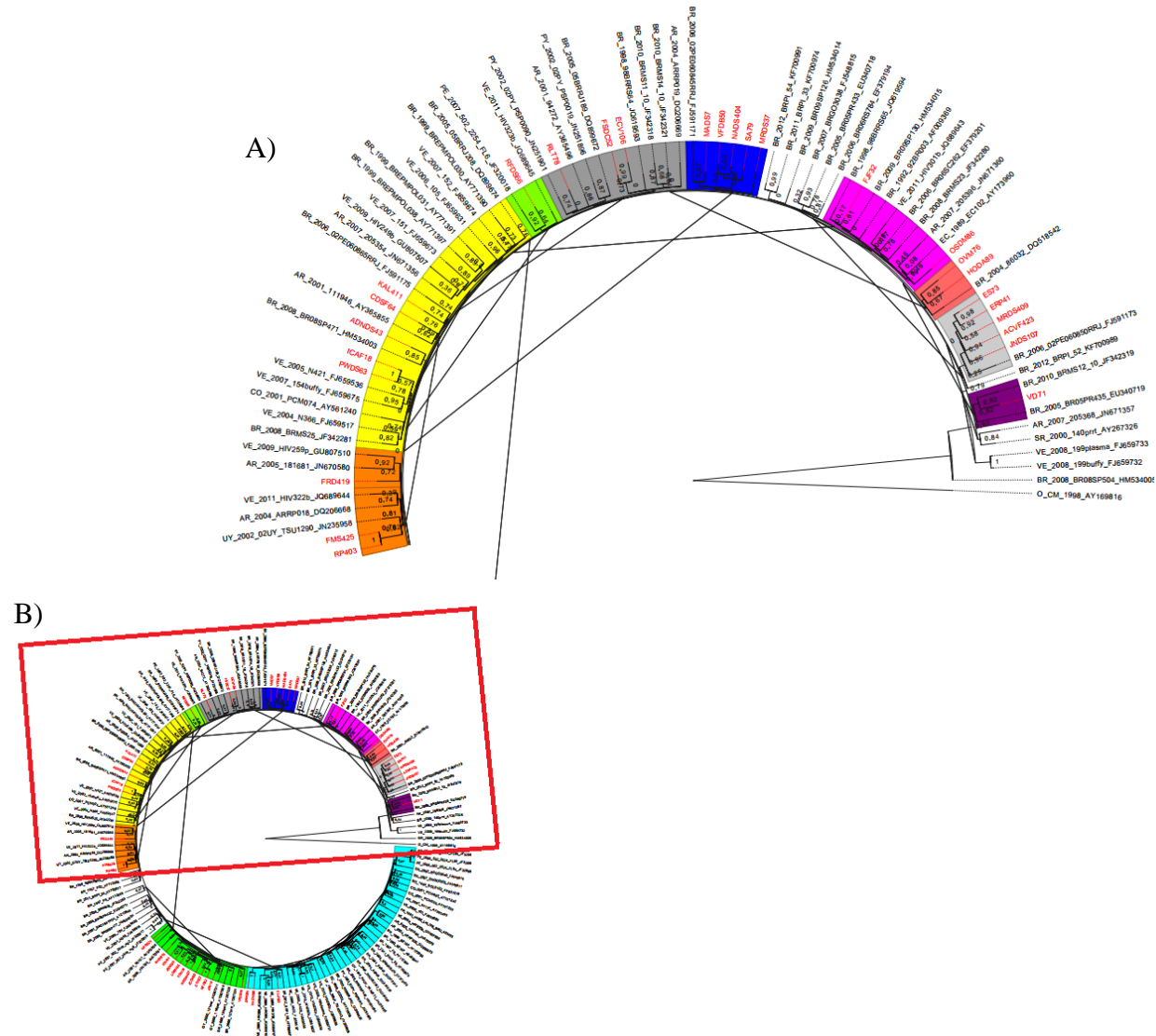


Figura 22 - Reconstrução Filogenética da região PR/RT. Amostras deste estudo em vermelho; amostras de referência nomeadas pelo país, ano de obtenção, código da amostra e número de acesso. Valores nos nós correspondem ao suporte aLRT. A) Fragmento da reconstrução filogenética da região RT/PR em pacientes HIV positivos de Roraima. B) Localização do fragmento.

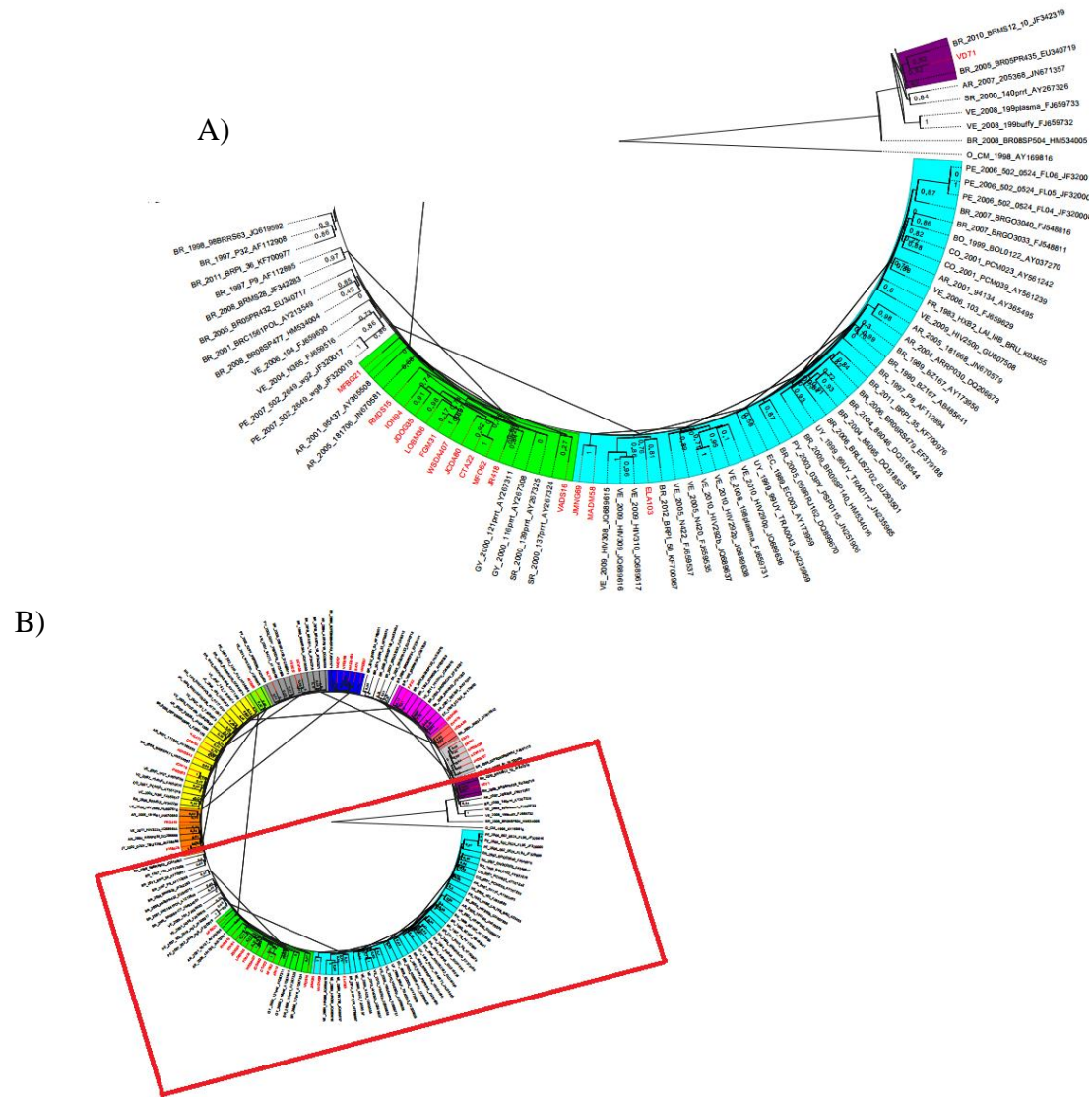


Figura 23 - Reconstrução Filogenética da região PR/RT. Amostras deste estudo em vermelho; amostras de referência nomeadas pelo país, ano de obtenção, código da amostra e número de acesso. Valores nos nós correspondem ao suporte aLRT. A) Localização do fragmento.

6.8 Resistência aos antirretrovirais

A resistência aos medicamentos antirretrovirais INNTR's, INTR's e IP's encontrada nos pacientes HIV-1 positivos em Roraima foi de 32,7% (17/52). Dos 52 pacientes analisados para região da PR/RT, 13 eram *naïves*, recém diagnosticados ou crônicos. Entre os *naïves*, apenas um (7,69%) paciente apresentou uma mutação de resistência e aos inibidores da protease.

Daqueles pacientes que faziam uso de medicamento, 16 (30,7%) apresentaram algum tipo de mutação. A prevalência de mutações aos NRTI's foi de 25% (13/52), 23,1% (12/52) aos NNRTI's e 5,8% (3/52) PI's.

Dos 17 pacientes, dois (11,7%) apresentaram algum tipo de mutação de resistência somente aos INTR's, três pacientes (17,6%) somente aos INNTR's e somente um paciente (5,8%) aos PI's. Nenhum paciente apresentou mutações de resistência às três classes de medicamentos, assim como nenhum paciente apresentou mutações comuns aos INNTR's e PI's. Entretanto, nove pacientes apresentaram mutações de resistência tanto aos INTR's quanto aos INNTR's e dois pacientes INTR's e PI's (tabela 13).

As resistências mais frequentes aos INTR's foram respectivamente: M184V (35,48%), T69N (12,90%), D67N e K219Q (ambas com 9,68%), T69D (6,45%) e por último MD41L, L210W, T215Y, T215F e K219R (cada 3,23%). Múltiplas mutações resistências aos NRTI's foram encontradas em cinco pacientes, sendo que quatro pacientes apresentaram mais que três mutações. Quanto ao perfil dessas resistências, 11 pacientes apresentaram alta resistência, contendo pelo menos duas mutações de resistências observadas. Quatro pacientes apresentaram resistência intermediária e 11 apresentaram baixa resistência.

Dois pacientes, com dois possíveis subtipos recombinantes, um residente no Brasil e outro na Guiana Inglesa apresentaram mutações em todos os perfis de resistência.

O paciente DJSG100 de origem guianense apresenta subtipo recombinante e cinco mutações que conferem alto grau de resistência ao Lamivudina (3TC), Zidovudina (AZT) e Emtricitabina (FTC), médio grau de resistência ao Abacavir (ABC), Estavudina (D4T) e Didanosina (DDI) e baixo grau de resistência ao Tenofovir (TDF).

Além disso, o mesmo ainda possui resistência em alto perfil ao Efavirenz (EFV), Nevirapina (NVP) e a Rilpivirina (RPV) e ainda baixo perfil ao Etravirina (ETR), estes medicamentos relacionados aos INNTR's. O paciente MG29, de origem brasileira também com uma possível cepa recombinante, apresentou mutações que definiram resistência em todos os perfis de resistência relacionados aos INTR's. Assim como o outro paciente que possui cepa recombinante, MG29 apresenta mutações de resistências de alto perfil aos PI's.

As mutações de resistências mais frequentes aos INNTR's foram respectivamente: K103N (39,13%), T69N (12,90%), V108I (13,04%), G190A (8,70%), e com 4,35% cada - V90I, E138A, V179D, G190R, K101H, P225H e K238T. Múltiplas mutações de resistências aos INTR's foram encontradas em seis pacientes, sendo que dois pacientes apresentaram mais que duas mutações. Quanto ao perfil dessas resistências, dez pacientes apresentaram alta resistência aos ARV's desta classe, um paciente apresentou resistência intermediária e seis apresentaram baixa resistência. O único paciente *naive*, KAL411, apresentou uma única mutação G190A que conferiu um alto perfil a Nevirapina (NVP), um perfil intermediário ao Efavirenz (EFV) e um baixo perfil a Rilpivirina (RPV) e Etravirina (ETR).

As mutações de resistências mais frequentes aos PI's foram respectivamente: V82A (28,5%), seguido de M46I, I54V, L90M, V321 E Q58E cada uma com 14,29% (tabela 14).

Múltiplas mutações de resistências aos INTR's foram encontradas em seis pacientes, sendo que dois pacientes apresentaram mais que duas mutações. Quanto ao perfil dessas resistências, dez pacientes apresentaram alta resistência aos ARV's desta classe, um paciente apresentou resistência intermediária e seis apresentaram baixa resistência. O único paciente *naive*, KAL411, apresentou uma única mutação G190A que conferiu um alto perfil a Nevirapina (NVP), um perfil intermediário ao Efavirenz (EFV) e um baixo perfil a Rilpivirina (RPV) e Etravirina (ETR).

RT/PR									
ID	Sub	Mutações INTR				Mutações INNTR			
		DRM INTR	Perfil Alto	Perfil Int.	Perfil Baixo	DRM INNTR	Perfil Alto	Perfil Int.	Perfil Baixo
DJSG100	B/D	D67N, T69N, K70R, M184V, K219Q	3TC, AZT, FTC	ABC, D4TM, DDI	TDF	V90I, K103N, Y188L	EFV, NVP, RPV		ETR
MRDS37	B	T69N			DDI				
VD71	B	MD41L, M184V, L210W, T215Y	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC	TDF		K103N, Y188L	EFV, NVP, RPV		ETR
VFDB 50	B	M184V	3TC, FTC		ABC, DDI	K103N	EFV, NVP		
CDSF 64	B	M184V	3TC, FTC		ABC, FTC	V179D			EFV, ETR, NVP, RPV
ECV 106	B	M184V	3TC, FTC		ABC, DDI	K103N, V108I	EFV, NVP		
FGM 31	B	T69N			DDI				
ION 94	B	D67N, T69D, K70R, M184V, T215F, K219Q	3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC	TDF		K101H, K103N, G190A	EFV, NVP		ETR, RPV
JDOG35	B	T69N, M184V, K219R	3TC, FTC		ABC, DDI	K103N, P225H	EFV, NVP		
LRD88	B	M184V	3TC, FTC		ABC, DDI	K103N	EFV, NVP		
MG29	B/D	D67N, T69D, K70R, M184V, K219Q	3TC, DDI, FTC	ABC, AZT, D4TM	TDF				
OVM76	B	M184V	3TC, FTC,		ABC, DDI	K103N, V108I, K238T	EFV, NVP		
RFDS66	B	M184V	3TC, FTC,		ABC, DDI				
FSDC99						E138A			ETR, RPV
SA79	B								
FSDC 52	B					K103N, G190R	EFV, NVP		
KALL 411*	B					G190A	NVP	EFV	ETR, RPV

ID: identidade; **Sub:** Subtipo; **DRM:** Drug Resistance Mutation; **INTR:** Inibidor nucleosídico da transcriptase reversa; **INNTR:** Inibidor não nucleosídico da transcriptase reversa **Perfil Int.:** Perfil Intermediário **3TC:** Lamivudina; **AZT:** Zidovudina; **FTC:** Emtricitabina; **ABC:** Abacavir; **D4T:** Estavudina; **DDI:** Didanosina; **TDF:** Tenofovir; **EFV:** Efavirenz; **NVP:** Nevirapina; **RPV:** Rilpivirina; **ETR:** Etravirina
*Paciente:Naive

Tabela 13 - Mutações de resistência encontradas na região da RT/PR.

Parte do gene da *Integrase* também foi analisada quanto a resistência. Das 62 amostras analisadas nenhuma apresentou mutações maiores de resistências, apenas foram encontradas mutações acessórias (11/62).

ID	SUBTIPO RT/PR	Protease			
		DRM PI	Perfil Alto	Mutações IP	
			Perfil Intermediário	Perfil Baixo	
MG29	B/F1	M46I, I54V, V82A, L90M	ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r	TPV/r	
RFDS66	B	V32I, V82A		ATV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV,	DRV/r, SQV/r
SA79	B	Q58E			TPV/r

ID: identidade; **Sub:** Subtipo; **DRM:** Drug Resistance Mutation; **IP:** Inibidor da protease; **ATV/R:** Atazanavir/r; **DRV/r:** Darunavir/r; **FPV/r:** Fosamprenavir/r; **IDV/r:** Indinavir/r; **LPV/r:** Lopinavir/r; **NFV:** Nelfinavir; **SQV/r:** Saquinavir/r **TPV/r:** Tipranavir/r.

Tabela 14 - Mutações de resistência aos inibidores da protease.

6.9 Predição do tropismo viral

A predição do tropismo viral do HIV-1 requer uma série de dados dos pacientes para que o resultado seja o mais confiável possível. Dados clínicos dos pacientes que incluíram carga viral, % CD4, contagem de CD8 e contagem de CD4, foram utilizados para aumentar a confiabilidade da predição.

Destaca-se que em caso de predições diferentes entre os modelos clínicos e clonais, adotou-se o que preconiza o *software on lin* para as duas situações: (1) Se o paciente utiliza medicamento antirretroviral o modelo clonal foi adotado e (2) caso o paciente seja *naive* utilizou-se o modelo clínico (figura 20).

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	Only the CCR5-coreceptor can be used.	90.9%	
Clinical	Only the CCR5-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) could work.	99.1%	

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	The CXCR4-coreceptor can be used.	9.6%	
Clinical	Only the CCR5-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) could work.	96.1%	

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	The CXCR4-coreceptor can be used.	3.1%	The 11/25 rule would predict this sequence as an X4-virus.
Clinical	The CXCR4-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) should not be administered!	5%	

Figura 24 – Exemplo de resultado da predição viral para vírus R5 e vírus R4.

ID	FPR clonal	FPR Clínico	Classificação viral
ADS53	28,1	52,10%	X5 vírus
ADSDS13	40,2	21,10%	X5 vírus
AV46	86,5	94,70%	X5 vírus
ERP41	1,7	0,50%	X4 vírus
FMDS8	9,6	93,60%	X5 vírus
HODA89	1,7	84,10%	X4 vírus
JMG26	90,9	97,80%	X5 vírus
JNDAF26	1,7	3,70%	X4 vírus
JS74	48,7	95,30%	X5 vírus
MDLFS44	21	15,10%	X5 vírus
MFBG21	20,4	50,00%	X5 vírus
MFBS424	7,8	10,60%	X5 vírus
ML413	3,1	1,20%	X4 vírus.
NADS404	0,2	7,10%	X4 vírus
NM414	40,4	59,10%	X5 vírus
RDON51	0,2	0,20%	X4 vírus
SA79	38	78,00%	X5 vírus
SDS14	48,9	90,10%	X5 vírus
SNT104	60,9	82,90%	X5 vírus
WSDA407	36,8	86,8%	X5 vírus

As amostras amplificadas da região do envelope viral foram utilizadas para determinar o tropismo do HIV-1. De 48 amostra amplificadas 20 (41,6%) foram selecionadas para a predição do tropismo. Destas 20, 14 (75%) foram consideradas X5 e o restante (25%) foi considerado X4.

7 DISCUSSÃO

A coleta de 121 amostras à época em que o trabalho foi idealizado (final 2011) representava 10% do total de casos de AIDS notificados pelo SINAN em um período que abrange os anos de 1980 até 2011. O objetivo sempre foi ter um n amostral com representatividade e que compreendesse pacientes oriundos de diversos municípios do estado.

Dados referentes à AIDS/HIV em Roraima, quando públicos compreendem os informes do ministério da saúde e consultas ao SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação). Poucas informações são divulgadas pelo governo do estado, dificultando o entendimento da doença em Roraima.

Em um artigo publicado em 2012, LAURINDO e GRANJA analisaram 350 casos confirmados de infecção pelo HIV em Boa Vista no período de janeiro de 2008 a janeiro de 2010. A maioria dos casos confirmados e notificados (84%) eram de pacientes residentes na capital Boa Vista. Em nossa pesquisa também encontramos dados similares, dos 112 pacientes que declararam residir em Roraima 82% residem na capital. Tal fato pode se explicar por duas razões: (1) a capital abriga mais de 60% da população, além disso, é o centro financeiro e turístico do estado, e (2) quando diagnosticado alguns pacientes passam a viver na capital em busca de melhor assistência.

A epidemia brasileira de HIV/AIDS acomete, em sua maioria (64,9%), indivíduos do sexo masculino (BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013a). LAURINDO e GRANJA, encontraram prevalências similares (64,6% masculino e 35,4% feminino) dos casos notificados em Boa Vista. Em nossa pesquisa, a prevalência foi do sexo masculino, entretanto a porcentagem homem (58,68%) vs mulher (41,32%) não teve diferença expressiva. Quanto à opção sexual encontramos maior prevalência em pacientes

heterossexuais, seguido de homossexuais e bissexuais, o que também se verifica na pesquisa de LAURINDO e GRANJA (2012).

O LACEN/RR atende pacientes oriundos de outros países, principalmente venezuelanos e guianenses. Os mesmos utilizam a mesma estrutura fornecida pelo SUS dos pacientes brasileiros, incluindo acesso à consulta médica, medicamento e exames gratuitos. A maioria dos pacientes estrangeiros residem em cidades fronteiriças (Santa Helena de Uairén e Lethem) e a cada três meses se locomovem até a capital roraimense para sua rotina relacionada ao HIV. Esses pacientes são atendidos no Brasil pela inexistência ou dificuldade das políticas de tratamento em seus respectivos países.

Um dado importante que nossa pesquisa aponta é que 8,2% (10/121) dos pacientes entrevistados brasileiros já residiram fora do Brasil, principalmente na Guiana e Venezuela. A maioria exercendo atividades relacionadas à extração de ouro (conhecido como garimpo). O garimpo é considerado um ambiente de alta vulnerabilidade a infecções pelo HIV devido ao baixo grau de instrução dos garimpeiros (as) motivado pela ausência de ações de saúde educativas e preventivas e/ou assistenciais (FREITAS, 2006). Portanto, os garimpeiros podem ser veículos de transmissão de cepas virais entre países.

As reações de amplificações (PCR e NESTED PCR) para todos os genes tiveram bom aproveitamento (CCR5: PCR – 99,1%, RT/PR: PCR - 76% das amostras amplificadas e NESTED/PCR - 88% das amostras amplificadas, Integrase: PCR: 96% das amostras amplificadas e NESTED/PCR: 70% das amostras amplificadas e Envelope: PCR – 96% das amostras amplificadas e NESTED/PCR – 71,5% das amostras amplificadas), entretanto nos genes do HIV-1 a qualidade dos eletroferogramas gerados não foram suficientes para que algumas amostras fossem aproveitadas nas análises de bioinformática. Das 91 amostras que amplificaram na PCR referente ao gene *Pol*, somente 42 (57%) estavam com qualidade suficiente para as análises de mutação e

genotipagem, principalmente em função do tamanho do fragmento. Na região da integrase, das 80 amostras que amplificaram na primeira reação, 63 (53,4%) eletroferogramas tiveram boa qualidade. O pior rendimento neste aspecto foi relacionado ao gene envelope onde das 116 amostras amplificadas na primeira reação, apenas 20 (17,2%) eletroferogramas foram aproveitados. Foi verificada uma grande quantidade de picos sobrepostos, provavelmente em função da alta variabilidade desta região e da presença de sub-populações virais distintas. Medidas corretivas, que incluem a utilização de diluição limite, serão utilizadas de forma a aumentar a eficiência do experimento. Uma vez que a pesquisa realizada apresenta grande importância, os dados aqui gerados são inéditos em relação a Roraima, portanto, para a publicação do artigo temos certeza da necessidade de melhorar a qualidade das reações de amplificação daquelas amostras que não amplificaram. Temos praticamente uma amostragem de 10% da população de pacientes infectados com HIV/AIDS do estado coletados, e 4% analisados para PR/RT, 5% integrase e 2% para o tropismo, o que demonstra dados robustos para entender e epidemia do HIV em Roraima.

7.1 Rss333 em Roraima

A deleção de 32 pares de bases (pb) do gene CCR5, tem efeito importante na progressão da doença, além disso dados sobre o polimorfismo contribui para a indicação do medicamento Maraviroque que é antagonista de CCR5 e atua impedindo a ligação do vírus a célula (DEAN et al., 1996; HUGHES e NELSON, 2009).

Nossa pesquisa não encontrou nenhum paciente homocigoto recessivo. Entretanto, destacamos a prevalência de 9,17% para CCR5/CCR5 Δ 32 em pacientes HIV positivos de Roraima. Essa prevalência é maior que as encontradas em pacientes HIV positivos; das cidades do sudeste (7,2%) analisados por REICHE et al., (2008), da cidade

de Salvador (8,8%) (GRIMALDI et al., 2002), de Belém do Pará (4%) (GOMES, 2009) e do estado de Pernambuco (8,4%) (MACÊDO, 2003). Entre literatura pesquisadas, prevalência maior que as dos pacientes de Roraima foi encontrada somente em São Paulo (11,5%) (MUNERATO et al., 2003). A prevalência de CCR5/CCR5 Δ 32 encontrada em Roraima é maior também que a encontrada na população brasileira negra saudável (8,0%), porém menor que a população saudável branca e parda (14% e 13% respectivamente) (VARGAS et al., 2006).

A alta prevalência do CCR5/CCR5 Δ 32 em Roraima pode ter como explicação a miscigenação da população roraimense. Roraima por ser um dos estados mais novos da federação e por ter sido na década de 70 e 80 um dos centros do garimpo (atividade econômica que aumenta o fluxo de emigração) no Brasil atrai brasileiros de outras regiões. Para melhor compreensão desta prevalência, seria crucial a análise de ancestralidade dos pacientes participantes desta pesquisa.

7.2 Genotipagem em Roraima

Em Roraima, o subtipo predominante em relação a parte do gene *Pol* (RT/PR) foi o subtipo B (88,5%), seguido da forma recombinante B/D (11,5%) (figura 25).

O subtipo B é o mais prevalente em todas as regiões do Brasil, com exceção da região sul. O subtipo B é predominante no centro-oeste e nordeste nas respectivas cidades; Goiânia (CARDOSO, QUEIROZ e STEFANI, 2009; COSTA et al., 2013), em Palmas (CARVALHO et al., 2011), no Distrito Federal (CERQUEIRA, DANIELA MARRECO et al., 2004; VÉRAS et al., 2007), em Cuiabá (FERREIRA, 2011), em Recife (CAVALCANTI et al., 2012; MEDEIROS, DE et al., 2006), na Bahia (SANTOS et al., 2009).

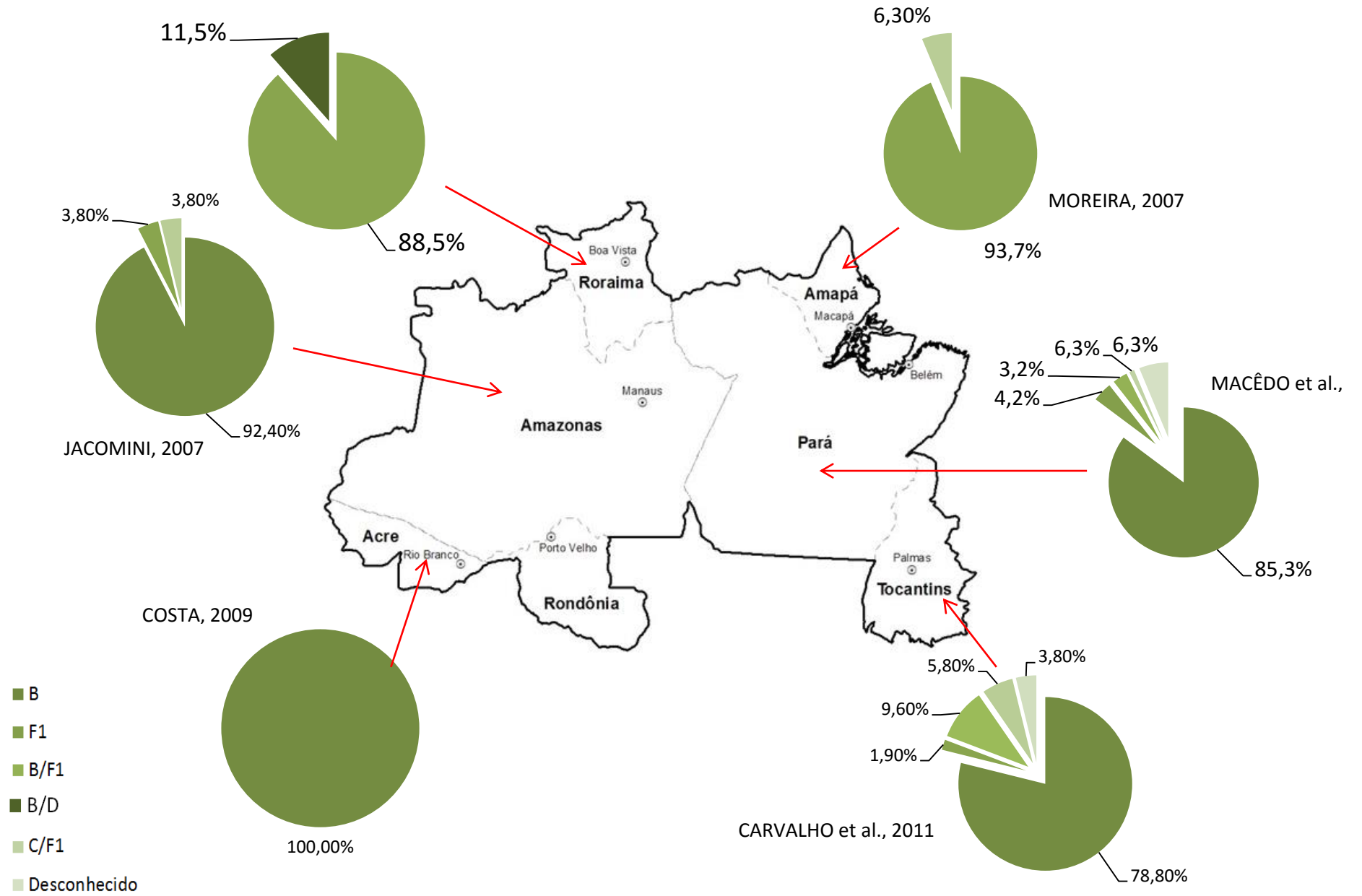


Figura 25 - Prevalência do HIV-1 na região Norte do Brasil.

Na região norte do Brasil, a qual Roraima faz parte, verificou-se que a prevalência (%) do subtipo B é similar aos estudos realizados. O que difere Roraima dos outros estados da região norte é a prevalência de um mosaico B/D. Esta forma já foi encontrada no Brasil por TANURI et al., (1999) em doadores de sangue na cidade do Rio de Janeiro. O subtipo D no segmento da protease foi encontrado em uma amostra do estado do Pará no ano de 2009 por MACHADO et al.,.

Quanto a genotipagem da região da integrase do HIV-1, a prevalência encontrada foi do subtipo B (88,9%), seguido dos subtipo F1 (3,2%) e da forma recombinante B/F (3,2%) e das também formas recombinantes B/D e B/C (1,6%). Não foram encontrados em nossas pesquisas trabalhos na região norte que envolvam a genotipagem da integrase para efeito de comparação. A maioria dos trabalhos que envolvem genotipagem concentram suas análises na protease e transcriptase reversa viral.

7.3 Filogenia em Roraima

Estudos de filogenia das amostras de indivíduos HIV positivos da região norte são escassos, na verdade, em sua grande maioria os estudos apenas genotipam o HIV circulante. Não foi objetivo principal o enfoque filogenético, entretanto procuramos fornecer informações da origem das cepas circulantes em Roraima.

Para estudos filogenéticos utilizamos somente região PR/RT dos pacientes HIV positivos em Roraima. Destaca-se ainda que descartamos quatro amostras que em uma primeira análise de genótipo se mostraram recombinantes, mas que depois, realizando o *bootscanning* do REGA, se mostraram como B. Por somente utilizarmos uma ferramenta de análise de recombinação, decidimos excluir as quatro amostras.

As amostras roraimenses se agruparam em 17 clados diferentes e como já era de ser esperar a maioria em clados com diversas cepas oriundas da Venezuela. Além da

Venezuela, as amostras ION94; JDOG35; LOBM36; FGM31; WSDA407; JCDA80; CTA22; MFO62 e JR418 formaram um subclado com uma amostra originada da Guiana, outro país vizinho a Roraima.

Sequências de outros países do cone sul também formaram clados com as amostras roraimenses, como é o caso das amostras uruguaias, equatorianas, paraguaias, argentinas e peruanas. Além disso, as amostras VADS16; RMDS15; MFBG21 agrupam-se em um grande clado uma sequência do Suriname (2000). O Suriname é um dos países dos quais os brasileiros migram para a exploração do ouro.

Devido ao agrupamento das sequencias roraimenses com as sequências dos países vizinhos (Guiana e Venezuela), podemos sugerir que vírus semelhantes circulam entre os países. Estudos posteriores e com mais ênfase nesta parte filogenética, devem ser feitos para melhor compreensão da a origem e disseminação de cepas similares encontradas nos três países. Todavia os resultados do nosso trabalho sugerem eventos múltiplos de introdução do HIV em Roraima.

7.4 Resistência em Roraima

Mutações que conferem resistência aos antirretrovirais foram encontradas em 32,7% dos pacientes HIV-1 positivos do estado de Roraima. A resistência primária no encontrada no estado foi em um único paciente e conferiu 7,69%. A resistência em indivíduos que utilizam medicamento foi de 30,7%.

Quando comparamos a prevalência de resistência primária em Roraima com outros estados, observa-se que a mesma é maior que a registrada em estados como Pernambuco e Mato Grosso (CAVALCANTI et al., 2012; FERREIRA, 2011; MEDEIROS, DE et al., 2006). Prevalência similar a de Roraima, foi encontrada em 2009 por SPRINZ et al., em um grande estudo envolvendo 13 cidades brasileiras, encontrando

prevalência de 7% e em estudo realizado em duas cidades de São Paulo (Campinas e São Paulo) com prevalência conjunta foi de 7,6% (FERREIRA et al., 2013).

A resistência primária em Roraima é menor que as registradas em Manaus (11,5%) Tocantins (11,5%), em Santa Catarina (11%), no Ceará (9,5%) (ARRUDA et al., 2011; CARVALHO et al., 2011; GRAF, 2011; JACOMINI, 2007). Outra pesquisa realizada em nove estados brasileiros, mas somente com pacientes homossexuais (população vulnerável), aponta para resistência primária de 21,4% (BERMÚDEZ-AZA et al., 2011). Lembramos ainda que um paciente *naive* do presente estudo apresentou uma única mutação, G190A, a qual causa alto nível de resistência ao NNRTI Nevirapina (NVP) e intermediária resistência ao também NNRTI Efavirenz.

Em Roraima, a frequência de mutações de resistência em indivíduos que fazem uso de antirretroviral apresentou similaridade com a frequência encontrada no Rio de Janeiro (33,3%) (EYER-SILVA e MORGADO, 2005), porém supera a prevalência encontrada em São Paulo KALMAR, (2007) (27,7%).

Ao compararmos a prevalência de mutações de resistência de acordo com as classes de medicamentos, Roraima apresenta baixa resistência (NRTI's - 25%, NNRTI's - 23,1% e aos PI's - 5,8%) quando comparada aos estados próximos do Pará (NRTI's - 91,6%, PIs's - 61,1% e NNRTI's - 50,5%) e Amazonas (NRTI - 96,9 %, PI - 62,5% e NNRTI - 56,3%) (MACÊDO, 2010).

A mutação de resistência mais frequente ao INTR foi M184V (35,48%). Esta mutação causa altos níveis de resistência ao Lamivudina (3TC) e baixa resistência a Zidovudina (AZT). Assim como em Roraima, essa mutação de resistência também foi encontrada como a mais prevalente no estado do Pará, Amazonas, Pernambuco (CAVALCANTI et al., 2012; MACÊDO, 2010).

Quanto aos INNRT's, a mutação K103N (39,13%), que causa alta resistência aos INNTR's Efavirenz (EFV) e Nevirapina (NVP), foi a mais frequente em Roraima. Essa mesma mutação foi a mais frequente também em estudo abrangendo 13 cidades brasileiras (SPRINZ et al., 2009), nos estados do Amazonas e Pará (MACÊDO, 2010) e em estudo envolvendo multicêntrico envolvendo homossexuais infectados pelo HIV (BERMÚDEZ-AZA et al., 2011).

A mutação de resistência mais frequente aos PI's em Roraima foi V82A, da mesma forma essa mutação foi a mais prevalente nos estados dos Amazonas e Pará (MACÊDO, 2010).

7.5 Tropismo

A predição do tropismo viral é ferramenta crucial para a aplicabilidade do medicamento Maraviroque em pacientes. Para isso além de realizarmos a amplificação do gene CCR5, obtivemos dados de carga viral, contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8, além da % de CD4 junto ao LACEN/RR. O objetivo de realizar tal procedimento em nossa pesquisa foi de fornecer ao médico subsídio para que o medicamento possa ser recomendado ao paciente.

Em recente artigo publicado, cujo objetivo era identificar a melhor ferramenta para determinar o tropismo do HIV-1, ARRUDA et al.,(2014) compararam um ensaio fenotípico com o *Geno2pheno*[coreceptor]. Como resultado utilizando o *Geno2pheno*[coreceptor], das 99 amostras, 78,5% foram consideradas X5 e o restante (21,4%) foi considerado X4. Neste estudo a concordância entre os dois testes foi de 78,6%.

Em nossa pesquisa, também utilizando o *Geno2pheno*[coreceptor] das 20 amostras analisadas, 75% foram consideradas X5 e o restante (25%) foi considerado X4.

8 CONCLUSÃO

- A prevalência em pacientes HIV positivos atendidos em Roraima foi de 9,17% para CCR5/CCR5 Δ 32, 90,83% em CCR5/CCR5 e não foram encontrados homozigotos recessivos.
- O subtipo predominante circulante no estado de Roraima em relação ao gene da integrase é o subtipo B (88,9%), seguido do subtipo F1 (3,2%) e da forma recombinante B/F (3,2%) e das também formas recombinantes B/D e B/C.
- O subtipo predominante circulante no estado de Roraima em relação a parte do gene *Pol* (RT/PR) foi o subtipo B (88,5%), seguido da forma recombinante B/D (11,5%).
- A resistência primária no encontrada no estudo foi em um único paciente e conferiu 7,69%.
- A resistência em indivíduos que utilizam terapia antirretroviral foi de 30,7%.
- As amostras da região PR/RT dos pacientes HIV positivos em Roraima se agruparam em 17 clados diferentes com amostras de diversos países do cone Sul. Incluindo os países vizinhos, Venezuela e Guiana e o Suriname os quais possuem forte ligação econômica e turística com Roraima.
- Das 20 amostras analisadas, 75% foram consideradas X5 e o restante (25%) foi considerado X4. 15 pacientes podem usar o medicamento Maraviroque.

9 REFERÊNCIAS

- ABRAM, M. E. et al. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 9864–78, doi:10.1128/JVI.00915-10, 2010.
- AFANI S, A. e GALLARDO O, A. M. Resistencia a la terapia antiretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana. **Revista chilena de infectología**, v. 28, n. 5, p. 461–469, doi:10.4067/S0716-10182011000600011, 2011.
- AN, P. e WINKLER, C. a. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. **Trends in genetics : TIG**, v. 26, n. 3, p. 119–31, doi:10.1016/j.tig.2010.01.002, 2010.
- ANASTASSOPOULOU, C. G. Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in HIV Infection. 2012.
- ARELLANO-GALINDO, J. et al. **Point Mutation**. [S.l.]: InTech, 2012.
- ARHEL, N. Revisiting HIV-1 uncoating. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 96, doi:10.1186/1742-4690-7-96, 2010.
- ARRILDT, K. T.; JOSEPH, S. B. e SWANSTROM, R. The HIV-1 env protein: a coat of many colors. **Current HIV/AIDS reports**, v. 9, n. 1, p. 52–63, doi:10.1007/s11904-011-0107-3, 2012.
- ARRUDA, E. et al. Short communication: intermediate prevalence of HIV type 1 primary antiretroviral resistance in Ceará State, Northeast Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 27, n. 2, p. 153–6, doi:10.1089/aid.2010.0028, 2011.
- ARRUDA, L. B. et al. Determination of Viral Tropism By Genotyping and Phenotyping Assays in Brazilian Hiv-1-Infected Patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 287–290, doi:10.1590/S0036-46652014000400003, 2014.
- ARTS, E. J. e HAZUDA, D. J. HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 4, p. a007161, doi:10.1101/cshperspect.a007161, 2012.
- AULICINO, P. C. et al. HIV-1 genetic diversity in Argentina and early diagnosis of perinatal infection. **Medicina**, v. 66, n. 4, p. 319–26, 2006.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science (New York, N.Y.)**, v. 220, n. 4599, p. 868–871, 1983.
- BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary**

genetics in infectious diseases, v. 7, n. 2, p. 263–70, doi:10.1016/j.meegid.2006.11.002, 2007.

BELLO, G. et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS**, v. 22, n. 15, p. 1993–2000, doi:10.1097/QAD.0b013e328315e0aa, 2008.

BELLO, G.;; GUIMARÃES, M. L. e MORGADO, M. G. Evolutionary history of HIV-1 subtype B and F infections in Brazil. **AIDS (London, England)**, v. 20, n. 5, p. 763–768, doi:10.1097/01.aids.0000216377.84313.52, 2006.

BENJELLOUN, F.;; GENIN, C. e PAUL, S. HIV-1 Glycoprotein Immunogenicity. In: TANG, Y.-W. (Ed.). **Recent Translational Research in HIV/AIDS**. Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-translational-research-in-hiv-aids/hiv-1-glycoprotein-immunogenicity>: Digital Edition, 2011. p. —.

BERGER, E. A. et al. A new classification for HIV-1. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 240, doi:10.1038/34571, 1998.

BERMÚDEZ-AZA, E. H. et al. Antiretroviral drug resistance in a respondent-driven sample of HIV-infected men who have sex with men in Brazil. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 57, n. 3, p. S186–92, doi:10.1097/QAI.0b013e31821e9c36, 2011.

BOUCHARD, M. et al. HIV type 1 drug resistance among naive patients from Venezuela. **AIDS research and human retroviruses**, v. 23, n. 3, p. 482–5, doi:10.1089/aid.2006.0219, 2007.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Distrito Federal - Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Adesão ao tratamento antirretroviral no Brasil: Coletânea de estudos do Projeto ATAR**. 1. ed. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2010. p. 405

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico AIDS/DST**. . Brasília: [s.n.], 2011.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Progress Report on the Brazilian Response to HIV / AIDS**. . Brasília: [s.n.], 2012a.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico AIDS/DST**. . Brasília: [s.n.], 2012b.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim Epidemiológico HIV - AIDS**. . Brasília: [s.n.], 2013a.

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília: [s.n.], 2013b. p. 197

BRASIL - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo hiv em adultos.** . [S.l: s.n.], 2013c.

BRINDEIRO, R. M. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. **AIDS**, v. 17, n. 7, p. 1063–9, doi:10.1097/01.aids.0000060345.12269.d7, 2003.

BURKE, D. S. Recombination in HIV: an important viral evolutionary strategy. **Emerging infectious diseases**, v. 3, n. 3, p. 253–9, doi:10.3201/eid0303.970301, 1997.

CABRAL, V. P. et al. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 881–5, 2006.

CAO, Y. et al. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. **The New England journal of medicine**, v. 332, n. 4, p. 201–8, doi:10.1056/NEJM199501263320401, 1995.

CARDOSO, L. P. V.;; QUEIROZ, B. B. De e STEFANI, M. M. D. A. HIV-1 pol phylogenetic diversity and antiretroviral resistance mutations in treatment naïve patients from Central West Brazil. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 46, n. 2, p. 134–9, doi:10.1016/j.jcv.2009.07.009, 2009.

CARVALHO, B. C. et al. Moderate prevalence of transmitted drug resistance and interiorization of HIV type 1 subtype C in the inland North State of Tocantins, Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 27, n. 10, p. 1081–1087, doi:10.1089/AID.2010.0334, 2011.

CASTILLO, J. et al. Surveillance of HIV type 1 drug resistance among naïve patients from Venezuela. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 12, p. 1329–33, doi:10.1089/aid.2009.0118, 2009.

CASTRO, E. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Venezuela: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of a B/F recombinant infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 32, n. 3, p. 338–44, 2003.

CASTRO, E. et al. Trends of HIV-1 molecular epidemiology in Venezuela: introduction of subtype C and identification of a novel B/C mosaic genome. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 32, n. 3, p. 257–8, doi:10.1016/j.jcv.2004.11.004, 2005.

CASTRO-NALLAR, E. et al. The evolution of HIV: inferences using phylogenetics. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 62, n. 2, p. 777–92, doi:10.1016/j.ympev.2011.11.019, 2012.

CAVALCANTI, A. M. S. et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 450–7, 2012.

CERQUEIRA, D. M. et al. HIV-1 subtypes and mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from Central Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 187–192, doi:10.1590/S1517-83822004000200003, 2004.

CERQUEIRA, D. M. et al. Antiretroviral resistance and genetic diversity of human immunodeficiency virus type 1 isolates from the Federal District, Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 8, p. 877–82, doi:/S0074-02762004000800016, 2004.

CHUN, T. et al. Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. **The Journal of infectious diseases**, v. 197, n. 5, p. 714–20, doi:10.1086/527324, 2008.

CICHUTEK, K. et al. Development of a quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7365–9, 1992.

CLAPHAM, P. R. e WEISS, R. A. Immunodeficiency viruses. Spoilt for choice of co-receptors. **Nature**, v. 388, n. 6639, p. 230–1, doi:10.1038/40758, 1997.

CLAVEL, F. et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 233, n. 4761, p. 343–346, 1986.

CLAVEL, F. e HANCE, A. J. HIV drug resistance. **The New England journal of medicine**, v. 350, n. 10, p. 1023–1035, doi:10.1056/NEJMra025195, 2004.

COFFIN, J.;; HAASE, A.;; LEVY, J. A.;; et al. What to call the AIDS virus? **Nature**, v. 321, n. 6065, p. 10, 1986.

COFFIN, J.;; HAASE, A.;; LEVY, J.;; et al. Human immunodeficiency viruses. **Science**, v. 232, n. 4751, p. 697–697, doi:10.1126/science.3008335, 1986.

COFFIN, J. e SWANSTROM, R. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 1, p. a012526, doi:10.1101/cshperspect.a012526, 2013.

COHEN, M. S.;; SHAW, G. M.;; et al. Acute HIV-1 Infection. **The New England journal of medicine**, v. 364, n. 20, p. 1943–54, doi:10.1056/NEJMra1011874, 2011.

COHEN, M. S.;; CHEN, Y. Q.;; et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 6, p. 493–505, doi:10.1056/NEJMoal105243, 2011.

COSTA, I. B. **Epidemiologia molecular do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1) em mulheres (mães e grávidas) dos estados do Acre e Tocantins, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes infecciosos e parasitários) - Universidade Federal do Pará - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. 2009.

COSTA, Z. B. et al. Estimated Incidence and Genotypes of HIV-1 among Pregnant Women in Central Brazil. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79189, doi:10.1371/journal.pone.0079189, 2013.

CUNHA, L. K. H. et al. Distribution of human immunodeficiency virus type 1 subtypes in the state of Amazonas, Brazil, and subtype C identification. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 104–112, doi:10.1590/S0100-879X2012007500003, 2012.

DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature methods**, v. 9, n. 8, p. 772, doi:10.1038/nmeth.2109, 2012.

DEAN, A. G. et al. **Epi Info™, a database and statistics program for public health professionals**. CDC, Atlanta, GA, USA: [s.n.], 2011.

DEAN, M. et al. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE . **Science (New York, N.Y.)**, v. 273, n. 5283, p. 1856–62, 1996.

DEEKS, S. G. e WALKER, B. D. Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 406–416, doi:10.1016/j.immuni.2007.08.010, 2007.

DELWART, E. L. et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR methods and applications**, v. 4, n. 5, p. S202–16, 1995.

DÍAZ, F. J. et al. Frequency of CCR5 delta-32 mutation in human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-exposed seronegative individuals and in general population of Medellin, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 237–42, 2000.

DUBÉ, M. et al. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. **Retrovirology**, v. 7, n. 1, p. 114, doi:10.1186/1742-4690-7-114, 2010.

ERICE, A. et al. Brief report: primary infection with zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1. **The New England journal of medicine**, v. 328, n. 16, p. 1163–5, doi:10.1056/NEJM199304223281605, 1993.

EYER-SILVA, W. a e MORGADO, M. G. A genotyping study of human immunodeficiency virus type-1 drug resistance in a small Brazilian municipality. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 869–873, doi:S0074-02762005000800008, 2005.

FARIAS, J. D. De et al. Distribution of the CCR5delta32 allele (gene variant CCR5) in Rondônia, Western Amazonian region, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 27–31, doi:10.1590/S1415-47572012005000003, 2012.

FAUCI, A. S. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 239, n. 4840, p. 617–22, 1988.

FERREIRA, A. S. **Resistência primária aos antirretrovirais e mapeamento genético do HIV-1 no estado do Mato Grosso**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás - Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde. 2011.

FERREIRA, J. L. P. et al. Transmitted Drug Resistance among People Living with HIV/Aids at Major Cities of Sao Paulo State, Brazil. **Advances in virology**, v. 2013, p. 878237, doi:10.1155/2013/878237, 2013.

FRANKEL, A. D. e YOUNG, J. A. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. **Annual review of biochemistry**, v. 67, p. 1–25, doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.1, 1998.

FREITAS, J. L. G. **Mulheres trabalhadoras no garimpo Rio Madeira-RO: Interfaces de vulnerabilidade ao HIV/AIDS**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento regional e meio ambiente) - Fundação Univerisdade Federal de Rondônia - Programa de Pós Graduação em Desenvolvimento regional e meio-ambiente. 2006.

GALLO, R. C. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science (New York, N.Y.)**, v. 220, n. 4599, p. 865–7, 1983.

GALLO, R. C. et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. **Science (New York, N.Y.)**, v. 224, n. 4648, p. 500–3, 1984.

GALLO, R. C. A reflection on HIV/AIDS research after 25 years. **Retrovirology**, v. 3, p. 72, doi:10.1186/1742-4690-3-72, 2006.

GALLO, R. C. e MONTAGNIER, L. The discovery of HIV as the cause of AIDS. **The New England journal of medicine**, v. 349, n. 24, p. 2283–2285, doi:10.1056/NEJMp038194, 2003.

GELDERBLOM, H. R. et al. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. **Virology**, v. 156, n. 1, p. 171–6, 1987.

GOMES, É. R. **Avaliação do polimorfismo no gene CCR5 em portadores do HIV-1**. Trabalho de conclusão de curso (Biomedicina) - [S.l.]. 2009.

GRAF, T. **Epidemiologia molecular do HIV-1 e resistência primária a antiretrovirais em indivíduos soropositivos da região metropolitana de Florianópolis/SC**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. 2011.

GRÄF, T. et al. HIV-1 genetic diversity and drug resistance among treatment naïve patients from Southern Brazil: an association of HIV-1 subtypes with exposure

categories. **Journal of clinical virology**, v. 51, n. 3, p. 186–191, doi:10.1016/j.jcv.2011.04.011, 2011.

GRÄF, T. e PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 170–8, doi:10.1016/j.virol.2012.08.048, 2013.

GRIMALDI, R. et al. Prevalence of the CCR5Delta32 mutation in Brazilian populations and cell susceptibility to HIV-1 infection. **Human genetics**, v. 111, n. 1, p. 102–4, doi:10.1007/s00439-002-0747-x, 2002.

GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307–21, doi:10.1093/sysbio/syq010, 2010.

GÜRTLER, L. G. et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. **Journal of virology**, v. 68, n. 3, p. 1581–5, 1994.

HEMELAAR, J. et al. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. **AIDS (London, England)**, v. 25, n. 5, p. 679–89, doi:10.1097/QAD.0b013e328342ff93, 2011.

HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123–6, doi:10.1038/373123a0, 1995.

HU, W. et al. RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 2–7, doi:10.1073/pnas.1405186111, 2014.

HUGHES, A. e NELSON, M. HIV entry: new insights and implications for patient management. **Current opinion in infectious diseases**, v. 22, n. 1, p. 35–42, doi:10.1097/QCO.0b013e3283213093, 2009.

HUMPHREYS, G. O.; WILLSHAW, G. A. e ANDERSON, E. S. A simple method for the preparation of large quantities of pure plasmid DNA. **Biochimica et biophysica acta**, v. 383, n. 4, p. 457–63, 1975.

JACOMINI, D. L. J. **Caracterização molecular do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-I) em pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas FMT/AM**. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e infecciosas) - Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. 2007.

KALMAR, E. M. do N. **Avaliação da resistência do HIV-1 às drogas anti-retrovirais em 150 pacientes em interrupção terapêutica por mais de seis meses**. Tese (Doutorado em Medicina) - Universidade de São Paulo - Programa de Pós Graduação, Brasil. 2007.

- KATO, Y. et al. A component of the ARC/Mediator complex required for TGF beta/Nodal signalling. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 641–6, doi:10.1038/nature00969, 2002.
- KLATZMANN, D. et al. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 225, n. 4657, p. 59–63, 1984.
- KOGAN, M. e RAPPAPORT, J. HIV-1 accessory protein Vpr: relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. **Retrovirology**, v. 8, n. 1, p. 25, doi:10.1186/1742-4690-8-25, 2011.
- LAURINDO, I. e GRANJA, F. Análise epidemiológica dos novos casos de HIV-positivos no estado de Roraima no período de Janeiro de 2008 a Janeiro de 2010. **Norte Científico**, v. 7, 2012.
- LEITNER, T. et al. **HIV Sequence Compendium 2013 Editors**. Los Alamos ed. Los Alamos - New Mexico: Theoretical Biology and Biophysics Group, 2013. p. 1–416
- LIU, R. et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 367–77, 1996.
- LIU, S. et al. Effect of CCR5-Δ32 heterozygosity on HIV-1 susceptibility: a meta-analysis. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e35020, doi:10.1371/journal.pone.0035020, 2012.
- MACÊDO, A. K. V. **Determinação de Δccr5 e comparação com a distribuição de frequências encontradas em indivíduos infectados pelo HIV-1 na população de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Genética) - [S.l.]. 2003.
- MACÊDO, O. **Caracterização molecular da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com AIDS e prevalência de subtipos do HIV-1 nos estados do Pará e Amazonas, Brasil: 2002 a 2006**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes infecciosos e parasitários) - Universidade Federal do Pará - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. 2010.
- MACÊDO, O. et al. Distribution of HIV-1 subtypes in patients with HAART therapeutic failure in the States of Pará and Amazonas, Brazil: 2002 to 2006. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p. 11–16, doi:10.5123/S2176-62232012000200002, 2012.
- MACHADO, L. F. a et al. Molecular epidemiology of HIV type 1 in northern Brazil: identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02_AG in the Amazon region of Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 10, p. 961–6, doi:10.1089/aid.2009.0027, 2009.
- MARTÍNEZ, A. M. B. DE et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Rio Grande, RS, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 471–6, 2002.

- MASUR, H. et al. An Outbreak of Community-Acquired *Pneumocystis carinii* Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 305, n. 24, p. 1431–1438, doi:10.1056/NEJM198112103052402, 1981.
- MEDEIROS, L. B. DE et al. Primary resistance of human immunodeficiency virus type 1 in a reference center in Recife, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 845–9, 2006.
- MONTEIRO, J. P. et al. Genetic variability of human immunodeficiency virus-1 in Bahia state, Northeast, Brazil: high diversity of HIV genotypes. **Journal of medical virology**, v. 81, n. 3, p. 391–9, doi:10.1002/jmv.21414, 2009.
- MOREIRA, M. R. C. **Epidemiologia molecular do vírus da imunodeficiência humana do tipo (HIV-1) no município de Macapá (Amapá), Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes infecciosos e parasitários) - Universidade Federal do Pará - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários. 2007.
- MUDD, P. a et al. Vaccine-induced CD8+ T cells control AIDS virus replication. **Nature**, v. 491, n. 7422, p. 129–33, doi:10.1038/nature11443, 2012.
- MUNERATO, P. et al. Frequency of polymorphisms of genes coding for HIV-1 co-receptors CCR5 and CCR2 in a Brazilian population. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 7, n. 4, p. 236–40, 2003.
- NISOLE, S. e SAÏB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, v. 1, p. 9, doi:10.1186/1742-4690-1-9, 2004.
- OLIVEIRA, T. DE et al. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 21, n. 19, p. 3797–800, doi:10.1093/bioinformatics/bti607, 2005.
- PAREDES, R. e CLOTET, B. Clinical management of HIV-1 resistance. **Antiviral research**, v. 85, n. 1, p. 245–265, doi:10.1016/j.antiviral.2009.09.015, 2010.
- PEETERS, M.; D'ARC, M. e DELAPORTE, E. Origin and diversity of human retroviruses. **AIDS reviews**, v. 16, n. 1, p. 23–34, 2014.
- PERELSON, A. S. et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 271, n. 5255, p. 1582–6, 1996.
- PLANTIER, J.-C. et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 871–2, doi:10.1038/nm.2016, 2009.
- PRESTON, B. D.; POIESZ, B. J. e LOEB, L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 242, n. 4882, p. 1168–71, 1988.

- PROIETTI, A. B. de F. C. et al. Genetic variability of HIV-1 isolates from Minas Gerais, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 141–143, doi:10.1590/S0001-37141999000200010, 1999.
- QADIR, M. I. e MALIK, S. A. HIV fusion inhibitors. **Reviews in medical virology**, v. 20, n. 1, p. 23–33, doi:10.1002/rmv.631, 2010.
- QUINN, T. C. et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. **The New England journal of medicine**, v. 342, n. 13, p. 921–929, doi:10.1056/NEJM200003303421303, 2000.
- RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 1, p. 52–61, doi:10.1038/nrg1246, 2004.
- RATNER, L. et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. **Nature**, v. 313, n. 6000, p. 277–84, doi:10.1038/313277a0, 1985.
- RAY, M. et al. The effect of combined antiretroviral therapy on the overall mortality of HIV-infected individuals. **AIDS (London, England)**, v. 24, n. 1, p. 123–37, doi:10.1097/QAD.0b013e3283324283, 2010.
- REICHE, E. M. V. et al. Frequency of CCR5-Delta32 deletion in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in healthy blood donors, HIV-1-exposed seronegative and HIV-1-seropositive individuals of southern Brazilian population. **International journal of molecular medicine**, v. 22, n. 5, p. 669–75, doi:10.3892/ijmm, 2008.
- RICHMAN, D. D. Antiviral therapy of HIV infection. **Annual review of medicine**, v. 42, p. 69–90, doi:10.1146/annurev.me.42.020191.000441, 1991.
- RIZZUTO, C. D. A Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding. **Science**, v. 280, n. 5371, p. 1949–1953, doi:10.1126/science.280.5371.1949, 1998.
- ROBERTS, J. D.; BEBENEK, K. e KUNKEL, T. a. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. **Science**, v. 242, n. 4882, p. 1171–1173, 1988.
- ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5463, p. 55–6, 2000.
- ROMANI, B.; ENGELBRECHT, S. e GLASHOFF, R. H. Functions of Tat : the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. p. 1–12, doi:10.1099/vir.0.016303-0, 2010.
- ROSE, K. M. et al. The viral infectivity factor (Vif) of HIV-1 unveiled. **Trends in molecular medicine**, v. 10, n. 6, p. 291–7, doi:10.1016/j.molmed.2004.04.008, 2004.
- SABATTÉ, J. et al. The role of semen in sexual transmission of HIV: beyond a carrier for virus particles. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 13, n. 12-13, p. 977–82, doi:10.1016/j.micinf.2011.06.005, 2011.

SA-FILHO, D. J. DE et al. HIV type 1 diversity from newly diagnosed patients in Santos metropolitan area/Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 9, p. 925–9, doi:10.1089/aid.2009.0073, 2009.

SANTOS, E. de S. et al. Diversidade genética do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em mulheres infectadas de uma cidade do nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 12, p. 609–614, doi:10.1590/S0100-72032009001200006, 2009.

SHAFER, R. W. Genotypic Testing for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 247–277, doi:10.1128/CMR.15.2.247-277.2002, 2002.

SILVEIRA, J. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 54, n. 1, p. 36–41, doi:10.1016/j.jcv.2012.01.017, 2012.

SIMON, D. et al. Prevalência de subtipos do HIV-1 em amostra de pacientes de um centro urbano no sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p. 1094–1101, doi:10.1590/S0034-89102010005000039, 2010.

SIMON, F. et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. **Nature medicine**, v. 4, n. 9, p. 1032–7, doi:10.1038/2017, 1998.

SMYTH, R. P.; DAVENPORT, M. P. e MAK, J. The origin of genetic diversity in HIV-1. **Virus research**, v. 169, n. 2, p. 415–29, doi:10.1016/j.virusres.2012.06.015, 2012.

SPRINZ, E. et al. Primary antiretroviral drug resistance among HIV type 1-infected individuals in Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 9, p. 861–7, doi:10.1089/aid.2009.0012, 2009.

SUNDQUIST, W. I. e KRÄUSSLICH, H.-G. HIV-1 assembly, budding, and maturation. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 7, p. a006924, doi:10.1101/cshperspect.a006924, 2012.

TAN, Q. et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. **Science (New York, N.Y.)**, v. 341, n. 6152, p. 1387–90, doi:10.1126/science.1241475, 2013.

TANURI, A. et al. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association**, v. 20, n. 1, p. 60–6, 1999.

TOMARAS, G. D. et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial

viremia. **Journal of virology**, v. 82, n. 24, p. 12449–63, doi:10.1128/JVI.01708-08, 2008.

TRIQUES, K. et al. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. **Virology**, v. 259, n. 1, p. 99–109, doi:10.1006/viro.1999.9720, 1999.

TURNER, B. G. e SUMMERS, M. F. Structural biology of HIV. **Journal of molecular biology**, v. 285, n. 1, p. 1–32, doi:10.1006/jmbi.1998.2354, 1999.

UNAIDS. **The gap report**. . [S.l: s.n.], 2014.

VARGAS, A. E. et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 3, p. 321–325, doi:10.1590/S0100-879X2006000300002, 2006.

VÉRAS, N. M. C. et al. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1481–90, doi:10.1089/aid.2007.0145, 2007.

VICENTE, A. C. et al. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 23, n. 4, p. 327–31, 2000.

WAINBERG, M. a;; ZAHARATOS, G. J. e BRENNER, B. G. Development of antiretroviral drug resistance. **The New England journal of medicine**, v. 365, n. 7, p. 637–46, doi:10.1056/NEJMra1004180, 2011.

WAIN-HOBSON, S. et al. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. **Cell**, v. 40, n. 1, p. 9–17, 1985.

WATTS, J. M. et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 711–6, doi:10.1038/nature08237, 2009.

ZHUANG, J. et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Recombination: Rate, Fidelity, and Putative Hot Spots. **Journal of Virology**, v. 76, n. 22, p. 11273–11282, doi:10.1128/JVI.76.22.11273-11282.2002, 2002.

10 APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo I no Estado de Roraima.

Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido pelo pesquisador André de Lima Guerra Corado, em relação a minha participação no projeto de pesquisa intitulado: Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo I no Estado de Roraima, cujo objetivo é identificar os subtipos do HIV-1 circulante, avaliar a resistência primária nos pacientes portadores de HIV no estado de Roraima, e descrever a frequência dos polimorfismos rs2395029 e rs9264942 nos genes HCP5 e HLA-C, em pacientes atendidos no Laboratório Central do Estado de Roraima/Laboratório de HIV. Os dados para esta pesquisa serão coletados via: 1) Aplicação de questionário de maneira individual e confidencial sobre fatores de exposição ao HIV e utilização de medicamentos antirretrovirais. 2) Acesso a contagem de linfócitos TCD4/TCD8 e da carga viral, buscando correlacionar estes fatores com o vírus circulante e com a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). 3) Recolhimento do excedente do sangue do participante, ou seja, o participante/Sr/Sra. não precisará se deslocar de sua residência somente para participar da pesquisa, será recolhido o sangue que sobrar após a realização dos exames de carga viral e contagem de linfócitos TCD4/TCD8 de responsabilidade do LACEN/RR e que conseqüentemente iria para o descarte. 4) Pelo sequenciamento nucleotídico de regiões específicas do vírus e de regiões específicas do paciente envolvidos com os polimorfismos rs2395029 e rs333. A participação nesta pesquisa é voluntária e não irá além da permissão para que o pesquisador recolha o sangue excedente do participante, ou seja, o sangue remanescente aos exames regulares e que iria ser descartado pelo LACEN/RR, e a permissão e aplicação de um questionário, não havendo, portanto, nenhum tipo de risco à sua saúde e danos físicos, não cabendo, pois, qualquer tipo de indenização por danos, pois estes não existem. De maneira alguma, o participante será prejudicado em seu tratamento, pois a pesquisa não visa teste de medicamentos ou novas terapias. A realização da pesquisa, além de possibilitar a obtenção de informações ligadas à capacidade desse vírus de resistir aos medicamentos antiretrovirais disponíveis, também poderá contribuir nas ações de combate à AIDS. A sua identidade jamais será mostrada ou revelada e mesmo na divulgação dos resultados nenhum participante será identificado. Uma cópia deste termo ficará com o participante e a outra com o pesquisador. Tudo que soubermos sobre o tipo de HIV-1 que causou a sua infecção e se este vírus sofreu modificação e pode não responder ao tratamento será enviado ao LACEN/RR onde o participante/Sr./Sra. faz seus exames de carga viral e contagem de CD4. Estaremos disponíveis para esclarecer as suas dúvidas relacionadas ao estudo, neste momento ou durante a pesquisa. Estou ciente e autorizo a realização dos procedimentos acima citados e a utilização dos dados originados destes procedimentos para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras contanto que seja mantido em sigilo informações relacionado à minha privacidade, bem como garantido meu direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de

dúvidas acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, além de que se cumpra a legislação em caso de dano. Caso haja algum efeito inesperado que possa prejudicar meu estado de saúde físico e/ou mental, poderei entrar em contato com o pesquisador responsável e/ou com demais pesquisadores. É possível retirar o meu consentimento a qualquer hora e deixar de participar do estudo sem que isso traga qualquer prejuízo à minha pessoa. Declaro que recebo uma cópia deste termo assinado e ainda uma cópia de um documento intitulado: Informações sobre a pesquisa o qual contém todas as informações que me foram explicadas de forma verbal. Desta forma, concordo voluntariamente e dou meu consentimento, sem ter sido submetido a qualquer tipo de pressão ou coação.

Eu, _____, após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com o Professor _____, **CONCORDO** **VOLUNTARIAMENTE**,
_____ participe do mesmo.

Local _____, data ____/____/____

Nome e assinatura ou impressão datiloscópica

Eu, **André de Lima Guerra Corado**, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao paciente.

Para maiores esclarecimentos, entrar em contato com os pesquisadores nos endereços abaixo relacionados:

Nome: André de Lima Guerra Corado
 Endereço: Rua Teresina, 476
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69057-070
 Cidade: Manaus UF: AM
 Fones: (95) 9961-7014 ou (95) 3623-7728 e-mail: andrecorado@gmail.com

Nome: Fabiana Granja
 Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, no Bloco do Centro de Estudos da Biodiversidade (Cbio), Campus Paricarana/UFRR
 Bairro: Aeroporto
 Cidade: Boa Vista UF: RR
 Fones: (95) 3621-3451 e-mail: fabi.granja@yahoo.com.br

Nome: Felipe Gomes Naveca
 Endereço: Rua Terezina, 476
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69057-070
 Cidade: Manaus UF: AM
 Fones: (92) 3621-2323 e-mail: fnaveca@amazonia.fiocruz.br

11 APÊNDICE 2 – QUESTIONÁRIO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
 EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



QUESTIONÁRIO - Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana I
 no estado de Roraima, Brasil.

Data: ____/____/____

Id: _____

Idade: _____ Sexo: F() M()

Município: _____ Telefone para contato: _____

Local de residência nos últimos dez anos _____

Código da amostra: _____

- =====
- 1) A respeito de sua opção sexual, se declaras:
 - a) Homossexual
 - b) Heterossexual
 - c) Bissexual

 - 2) Utilizas medicamento antirretroviral?
 - a) Não
 - b) Sim.

 - 3) Já fez uso de medicamento antirretroviral?
 - a) Sim. Quanto tempo? _____
 - b) Não

 - 4) Ano e local de diagnóstico da infecção pelo HIV: _____

 - 5) Sobre o tipo de exposição ao HIV, marque a alternativa ao qual você pode ter sido exposto de alguma forma:
 - () Parceiro sexual HIV+.
 - () Transfusão sanguínea.
 - () Transmissão vertical (mãe/filho).
 - () Usuário de drogas injetáveis.

 - 6) Nos últimos 20 anos, você morou ou esteve em outros países nos quais tenha passado por alguma situação de risco para o HIV?
 - a) Não.

b) Sim. Em qual país? () Venezuela () Guiana Inglesa ()
Outro: _____

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Epidemiologia Molecular do Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo I no estado de Roraima

Pesquisador: André de Lima Guerra Corado

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 15629013.8.0000.5302

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 474.028

Data da Relatoria: 27/11/2013

Apresentação do Projeto:

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que leva um quadro de imunossupressão ao portador da doença. O HIV-1 pode ser dividido filogeneticamente em grupos/tipos (M, O, N e P), (A-H, J e K), subtipos (ex: F1 e F2), sub-subtipos ou sub-clados e ainda em CRFs (Formas Recombinantes Circulantes) ou em URFs (Única Forma Recombinante). Devido a esta grande variabilidade genética proporcionada pela transcriptase reversa do viral, que é conhecidamente propensa a erro e na alta frequência de recombinação aliada a um rápido turnover viral, casos de resistências a medicamentos antiretrovirais (ARVs) podem acontecer. Indivíduos que fazem uso de ARVs conseguem por longos anos ter uma melhora na sua qualidade de vida, entretanto alguns portadores da AIDS apresentam uma boa contagem de linfócitos TCD4+ e carga viral mesmo sem se utilizar de ARVs, fatores imunogenéticos podem ser o responsável por tal ação. Um dos fatores imunogenéticos do hospedeiro ligados a AIDS mais conhecido, é um alelo mutante oriundo da deleção de 32 pares de bases (pb) do gene CCR5, que codifica o co-receptor de quimiocina CCR5 ao qual o HIV-1 se liga para invadir a célula. Homozigotos para o alelo o alelo CCR5-32 (rs333) estão protegidos contra o HIV-1 de modo que o vírus não entra na célula, já que

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº2413

Bairro: Aeroporto

CEP: 69.304-000

UF: RR

Município: BOA VISTA

Telefone: (95)3621-3112

Fax: (95)3621-3112

E-mail: coep@prpppg.ufr.br

Continuação do Parecer: 474.028

as proteínas que formam o CCR5 são truncadas, impossibilitando qualquer tipo de ligação, célula x vírus. Todavia, indivíduos heterozigotos (CCR5- Δ 32/+) apresentam uma progressão mais lenta da doença, pois as proteínas que formam o CCR5 ainda apresentam alguma interação com o vírus. Outro fator imunogenético relacionado com a baixa carga viral e progressão mais lenta da doença é um polimorfismo de base única (SNP), o rs2395029, localizado no gene HCP5, proporciona a troca de apenas um nucleotídeo (T>G) e está linkage disequilibrium com o HLA -B*5701. Roraima quando comparada nacionalmente figura entre os três estados com maior incidência de casos de AIDS registrados, liderando a mesma estatística entre os estados que formam a região amazônica. Não foram encontrados pesquisa/estudos na literatura com dados epidemiológicos moleculares referente a pacientes com AIDS que incluem estudos de caracterização genética do vírus causador da imunodeficiência para determinação e mapeamento dos subtipos circulantes no estado, nem de estudos relacionados a resistência primária a ARVs. Assim como, não foram encontrados na literatura dados que descrevem a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) relacionados à resposta imune ao HIV no estado de Roraima. Este trabalho visa justamente identificar os subtipos do HIV-1 circulante, avaliar a resistência primária, e descrever a frequência dos polimorfismos rs2395029 no gene HCP5, e o polimorfismo rs333 no gene CCR5, em pacientes atendidos no Laboratório Central do Estado de Roraima/Laboratório de HIV.

Objetivo da Pesquisa:

1. Identificar, utilizando técnicas moleculares, os subtipos do HIV-1 que circulam no estado de Roraima em pacientes recém-diagnosticados ou crônicos, que ainda não utilizam terapia de antiretrovirais;
2. Investigar mutações (resistência primária), nos vírus de portadores de HIV/Síndrome da imunodeficiência adquirida.
3. Investigar possível associação entre os genótipos com a carga viral, contagem de linfócitos TCD4+/ CD8+ e o estágio clínico dos pacientes.
4. Descrever a frequência de polimorfismos de nucleotídeo único rs2395029 no gene HCP5 e rs333 no gene CCR5 relacionado à resposta imune ao HIV nos pacientes estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não tem riscos pois será utilizada na pesquisa o sangue excedente dos procedimentos realizados

Endereço:	Av. Cap. Ene Garcez, nº2413		
Bairro:	Aeroporto	CEP:	69.304-000
UF:	RR	Município:	BOA VISTA
Telefone:	(95)3621-3112	Fax:	(95)3621-3112
		E-mail:	coep@prpppg.ufrr.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
RORAIMA - UFRR



Continuação do Parecer: 474.028

pelo LACEN/RR, logo, será recolhido o sangue que sobrar após a realização dos exames de carga viral e contagem de linfócitos TCD4/TCD8 e que consequentemente iriam para o descarte.

Benefícios: A pesquisa pode contribuir para uma melhora na qualidade de vida do paciente, pois visa identificar mutações no material genético do vírus que podem prejudicar a eficácia do tratamento,

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é pertinente para a área na qual está vinculada e relevante para o sistema de Saúde, pois vai obter informação sobre os subtipos do HIV-1 que circulam no estado de Roraima, resposta imune e resistência às terapias antirretrovirais etc.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados estão de acordo com as exigências necessárias para o desenvolvimento da pesquisa.

Recomendações:

Recomenda-se aprovação pelo Colegiado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa é pertinente para a área na qual está vinculada e relevante para o sistema de Saúde

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BOA VISTA, 29 de Novembro de 2013

Assinador por:
Ijanilio Gabriel de Araújo
(Coordenador)

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº2413
 Bairro: Aeroporto CEP: 69.304-000
 UF: RR Município: BOA VISTA
 Telefone: (95)3621-3112 Fax: (95)3621-3112 E-mail: coep@prpppg.ufr.br