

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JUCÉLIA STADINICKI DOS SANTOS

**INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS NÃO PROGRESSORES POR LONGO TEMPO -
LTNP: CARACTERÍSTICAS VIRAIS E DO HOSPEDEIRO**

CURITIBA

2017

JUCÉLIA STADINICKI DOS SANTOS

**INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS NÃO PROGRESSORES POR LONGO TEMPO –
LTNP: CARACTERÍSTICAS VIRAIS E DO HOSPEDEIRO**

Tese de Doutorado apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Interna, no curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dra Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2017

S237 Santos, Jucélia Stadinicki dos
Indivíduos HIV-1 positivos não progressores por longo tempo –
LTNP: características virais e do hospedeiro / Jucélia Stadinicki dos
Santos. – Curitiba, 2017.
171 f.: il.; color; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sonia Mara Raboni
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do
Paraná.

1. Síndrome de Imunodeficiência Adquirida. 2. Sobreviventes de
longo prazo ao HIV. 3. Antígenos HLA. 4. HIV-1. I. Raboni, Sonia Mara.
II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências
da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLMC: WD 308



PARECER

Aos doze dias do mês de maio do ano de dois mil e dezessete, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dr. Sergio Monteiro de Almeida (Depto. de Anatomia Patológica/UFPR), Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon (Serviço de Infectologia do CHC/UFPR), Dr. Luiz Gustavo Morello (IBMP/Pr), Dr. Juliano Bordignon (Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ PR) e Dra. Sonia Mara Raboni (Depto. da Saúde Comunitária/UFPR) - orientadora, exarou o presente parecer sobre a tese de doutorado elaborada por JUCELIA STADINICKI DOS SANTOS, aluna concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna – Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: “INDIVÍDUOS HIV-1 POSITIVOS NÃO PROGRESSORES POR LONGO TEMPO – LTNP: CARACTERÍSTICAS VIRAIS E DO HOSPEDEIRO”. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para tese, e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutora em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Dr. Sergio Monteiro de Almeida

Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Dr. Luiz Gustavo Morello

Dr. Juliano Bordignon

Dra. Sonia Mara Raboni

Ao meu esposo Aliatar pela confiança, dedicação e apoio irrestrito e aos meus filhos Adam e Lana, que cresceram junto com essa tese e que são minha fonte de vida e inspiração.

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, pelo suporte e apoio em todos os momentos.

À minha orientadora, prof^a Dra Sonia Mara Raboni, por ter me aceito como sua orientanda, pelo exemplo de pesquisadora, por toda o aprendizado conquistado nas conversas e reuniões, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas, por terem me aceito com tanto carinho, disponibilidade e pela excelência do serviço que prestam.

Às amigadas conquistadas nessa jornada, queridas Francielli Brusco, Ana Medeiros Bárbara Cavalli, Talita Bessani e em especial à Indianara Rotta, querida amiga, pela convivência harmoniosa, paciência e companheirismo.

Às minhas colegas de pós-graduação, pelo companheirismo, aprendizado e disponibilidade.

Aos médicos e residentes do Ambulatório de Infectologia do Hospital de Clínicas da UFPR, em especial a Dra Clea Elisa Ribeiro pelo apoio, disponibilidade e pela presteza aos seus pacientes e a residente Beatris Martin pelo companheirismo, dedicação e oportunidade de pesquisa em conjunto.

Ao Laboratório de Imunogenética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e ao Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, FIOCRUZ do Rio de Janeiro.

Ao Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ de Curitiba-PR, nas pessoas do Dr Juliano Bordignon e Dr Guilherme Ferreira.

Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e ao LACEN-PR pelo apoio e realização dos sequenciamentos nucleotídicos.

Ao curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, pelo apoio, estrutura e oportunidade de ingresso e à CAPES pelo apoio financeiro.

E finalmente, à todos os demais que de uma forma ou outra contribuíram para a realização desse trabalho.

*"Deus nos concede, a cada dia,
uma página de vida nova no livro
do tempo. Aquilo que colocamos
nela corre por nossa conta".*

Chico Xavier

RESUMO

Indivíduos HIV-1 não progressores por longo tempo (LTNP) apresentam controle natural da infecção viral e permanecem assintomáticos por vários anos, sem uso de terapia antirretroviral (TARV), sendo que fatores virais e próprios do hospedeiro parecem estar associados a este perfil não-progressor. Foram avaliadas características epidemiológicas, clínicas, genéticas e virológicas em pacientes LTNP em acompanhamento no ambulatório de Infectologia do Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) em Curitiba, região Sul do Brasil. Foram identificados 24 indivíduos LTNP, correspondendo a 1,7% dos pacientes em acompanhamento na referida unidade. A distribuição por gênero foi 58% de mulheres, mediana de idade de 45 anos; 17% foram classificados como controladores de elite, 29% como controladores de viremia e 54% como não-progressores virêmicos. A subtipagem HIV-1 mostrou ocorrência do subtipo C em 50% (12/24) dos casos, subtipo B em 29,2% (7/24) e as formas recombinantes BF e BC em 12,5% (3/24) e 8,3% (2 /24), respectivamente. Houve uma associação significativa do subtipo C com a transmissão heterossexual do HIV-1. Nos indivíduos LTNP, 96% dos isolados virais apresentaram tropismo viral R5. As mutações de resistência primárias aos fármacos foram identificadas em 8,7% dos isolados virais. A presença de mutações em isolados virais do subtipo C e perda de potenciais sítios de N-glicosilação, principalmente em amostras LTNP clado C, podem estar contribuindo com o perfil não-progressor desses indivíduos. Quatro dos 24 indivíduos LTNP foram identificados com o genótipo heterozigoto para a deleção de 32 pb no gene *CCR5*. A avaliação do polimorfismo *rs12979860* mostrou a presença do genótipo *C/C* em 21/24 (87,5%) dos indivíduos LTNP. No subgrupo EC/VC, 80% dos indivíduos apresentaram pelo menos um alelo *HLA-B* previamente considerado como potencialmente protetivo para a progressão da aids. Não foi observada associação entre os alelos *HLA-B* e os clados do HIV-1. As dosagens das quimiocinas IL-8 e IP-10 mostraram diferenças entre o grupo LTNP e progressores. A dosagem plasmática da quimiocina IL-8 foi significativamente maior em indivíduos progressores do que no grupo LTNP, mas não houve diferença entre os subgrupos de indivíduos LTNP. Observou-se correlação negativa entre a contagem de células T CD4+ e dosagem plasmática de IL-8 e uma correlação positiva dessa quimiocina com a contagem de células T CD8+. Houve uma associação da concentração da quimiocina IP-10 com a viremia, e o subgrupo de indivíduos EC mostrou praticamente os mesmos valores que os indivíduos saudáveis e progressores com carga viral em supressão. Além disso, a contagem de células T CD4+, % de CD4 e relação CD4/CD8 apresentaram correlação negativa com IP-10, porém não foi observada correlação com a contagem de células T CD8+. Não foi encontrada associação nas dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 e clados HIV-1. Neste grupo LTNP que apresenta diferentes clados HIV-1 observou-se distintos fatores humanos e virais que podem estar contribuindo para o perfil não-progressor nesses indivíduos, e a associação destes fatores com o controle da progressão para aids pode ser importante para aumentar o conhecimento da patogênese desta doença buscando ampliar futuras opções terapêuticas e profiláticas na infecção pelo HIV-1.

Palavras-chave: LTNP, controlador de elite, controlador de viremia, não-progressor virêmico, subtipos, N-glicosilação, *HLA-B*, IL-8, IP-10.

ABSTRACT

Long-term nonprogressors HIV-1 patients (LTNPs) have natural control of viral infection and remain asymptomatic for several years, without antiretroviral therapy (ART), and viral and host factors appear to be associated with this non-progression profile. The epidemiological, clinical, genetic, and virological characteristics of a LTNP cohort were evaluated at Infectious Diseases Division Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) in Curitiba, Southern Brazil. Twenty-four LTNPs were identified, corresponding to 1.7% of patients followed-up at the Infectious Diseases Division. The distribution by gender was 58% of female, median age was 45 years; 17% were classified as elite controllers, 29% as viremic controllers, and 54% as viremic non-progressors. HIV-1 genotyping showed subtype C in 50% (12/24) of patients, subtype B in 29.2% (7/24), and the recombinant forms BF and BC in 12.5% (3/24) and 8.3% (2/24), respectively. There was a significant association of subtype C with the heterosexual HIV-1 transmission. In most of the study patients, the used of coreceptors by viral isolates use was consistent with an R5 tropism. Primary drug resistance mutations were identified in 8.7% of viral isolates. The presence of unusual mutations in viral isolates of clade C and loss of conserved potential N-glycosylation sites, especially in samples of clade C-LTNPs, may be contributing to the non-progressor profile. Four out of 24 patients were heterozygous for the *CCR5*Δ32 genotype. The *rs12979860* C/C genotype was identified in 21/24 (87.5%) of LTNPs. In the EC/VC subgroup, 80% of individuals had at least one *HLA-B* allele previously considered as potentially protective for AIDS progression. No association was observed between the *HLA-B* alleles and HIV-1 clades. The dosages of IL-8 and IP-10 chemokines showed differences between LTNPs group and progressors. The plasma IL-8 chemokine level was significantly higher in progressors subjects than in the LTNP, but there was no difference between the LTNPs subgroups. A negative and positive correlation was observed between CD4+ and CD8+ T cells count and IL-8 dosage, respectively. There was an association of IP-10 chemokine with viremia, and individuals in the EC subgroup showed nearly the same level than healthy individuals and progressors with a suppressive viral load. Furthermore, the CD4+ count, % of CD4 and CD4/CD8 ratio showed a negative correlation with IP-10, but no correlation was observed with the CD8+ T cells count. No association was found in plasma levels of IL-8 and IP-10 chemokines and HIV-1 clades. In this LTNP group presenting different HIV-1 clades, it was observed distinct human and viral factors that may be contributing to non-progressor status, and the association of these factors with progression control for AIDS may be important in increasing knowledge of the pathogenesis of this disease seeking to expand future therapeutic and prophylactic options for HIV-1 infection.

Key words: LTNP, elite controller, viremic controller, viremic nonprogressors, subtypes, N-glycosylation, *HLA-B*, IL-8, IP-10.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ORIGENS E DIVERSIDADE DO HIV	21
FIGURA 2 -	FUNÇÃO DA TETERINA E ANTAGONISMO VIRAL ESPECÍFICO EM DIFERENTES HOSPEDEIROS	23
FIGURA 3 -	DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DOS CLADOS DE HIV-1	24
FIGURA 4 -	ESTIMATIVA DA DINÂMICA DE MIGRAÇÃO DO HIV-1 B NO MUNDO	26
FIGURA 5 -	DISTRIBUIÇÃO DO SUBTIPO C E FORMAS RECOMBINANTES QUE CONTÊM C, NO TERRITÓRIO BRASILEIRO	28
FIGURA 6 -	DISTRIBUIÇÃO DOS CLADOS DE HIV-1, NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, EM INDIVÍDUOS MAIORES DE 13 ANOS (N = 245).....	29
FIGURA 7 -	PROPORÇÃO GLOBAL DE PESSOAS VIVENDO COM HIV E EM TARV, EM 2015.....	32
FIGURA 8 -	PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR HIV NA POPULAÇÃO DE 15 A 49 ANOS, EM 2015	33
FIGURA 9 -	TAXA DE DETECÇÃO DE AIDS SEGUNDO REGIÃO DE RESIDÊNCIA POR ANO DE DIAGNÓSTICO. BRASIL, 2006 A 2015.....	35
FIGURA 10 -	CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS GÊNEROS DA FAMÍLIA <i>RETROVIRIDAE</i> A PARTIR DA ANÁLISE DE REGIÕES CONSERVADAS DO GENE <i>POL</i>	37
FIGURA 11 -	MODELO DA PARTÍCULA VIRAL MADURA DO HIV-1	38
FIGURA 12 -	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV	39
FIGURA 13 -	MAPA GENÉTICO DO HIV-1 E POSIÇÃO GENE <i>ASP</i>	42
FIGURA 14 -	LIGAÇÃO DO HIV-1 COM CÉLULA ALVO.....	44
FIGURA 15 -	ETAPAS DA REPLICAÇÃO VIRAL HIV	45
FIGURA 16 -	CURSO NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1 EM ADULTOS.....	49
FIGURA 17 -	EVOLUÇÃO NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1, EM ADULTOS.....	52
FIGURA 18 -	REPLICAÇÃO VIRAL E ATIVAÇÃO IMUNE EM HIV E SIV.....	54
FIGURA 19 -	PAPEL DOS ALELOS <i>HLA-B</i> NA CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ NA CARGA VIRAL DO HIV-1, AO LOGO DO TEMPO.....	58

FIGURA 20 - CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ NOS INDIVÍDUOS DO GRUPO LTNP	81
FIGURA 21 - PERFIL EVOLUTIVO DE CARGA VIRAL E CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ EM INDIVÍDUOS DOS SUBGRUPOS LTNP	82
FIGURA 22 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS HIV-1, REGIÃO V3-V5 _{GP120} GENE <i>ENV</i> , GRUPO LTNP	84
FIGURA 23 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS HIV-1 REGIÃO PR/RT GENE <i>POL</i> , GRUPO LTNP.....	85
FIGURA 24 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS HIV-1, GENES <i>ENVE</i> <i>POL</i> , GRUPO LTNP.....	86
FIGURA 25 - REGIÃO COROA DA ALÇA V3 _{GP120} , AMOSTRAS GRUPO LTNP HIV-1 SUBTIPO B EM <i>ENV</i>	87
FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NA REGIÃO V3-V5 _{GP120} SUBTIPO C	91
FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE SÍTIOS DE N-GLICOSILAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS DE SEQUÊNCIAS - REGIÃO V3-V5 _{GP120} SUBTIPO C	93
FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE N-GLICOSILAÇÃO NO GRUPO LTNP.....	94
FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DELEÇÃO DE 32 pb GENE <i>CCR5</i> EM AMOSTRAS DO GRUPO LTNP	95
FIGURA 30 - AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>rs12979860</i> NOS INDIVÍDUOS LTNP	96
FIGURA 31 - GRUPOS ALÉLICOS <i>HLA-B</i> E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NO GRUPO LTNP.....	97
FIGURA 32 - DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IL-8 ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS AVALIADOS.....	100
FIGURA 33 - CORRELAÇÃO ENTRE VALORES PLASMÁTICOS DE IL-8 E CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ ENTRE INDIVÍDUOS AVALIADOS COM VIREMIA.....	101
FIGURA 34 - CORRELAÇÃO ENTRE AS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE IL-8 E CONTAGEM DE CÉLULAS T CD8+	101
FIGURA 35 - DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 NOS DIFERENTES GRUPOS AVALIADOS.....	102

FIGURA 36 - CORRELAÇÃO DA DOSAGEM PLASMÁTICA DA QUIMIOCINA IP-10 E CARGA VIRAL _{LOG} GRUPO LTNP.....	103
FIGURA 37 - CORRELAÇÃO DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 E RAZÃO DE CÉLULAS T CD4+/CD8+	104
FIGURA 38 - CORRELAÇÃO DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 E CÉLULAS T CD4+.....	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS DOS INDIVÍDUOS HIV-1 GRUPO LTNP.....	80
TABELA 2 -	SUBTIPOS VIRAIS DAS AMOSTRAS HIV-1 DO GRUPO LTNP PARA REGIÃO V3-V5 _{GP120} E REGIÃO PR/RT.....	83
TABELA 3 -	VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS E SUBTIPOS VIRAIS HIV-1, GRUPO LTNP.....	88
TABELA 4 -	MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA PRIMÁRIA IDENTIFICADAS NO GRUPO LTNP.....	90
TABELA 5 -	AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NA REGIÃO V3-V5 _{GP120} , GENE ENV EM AMOSTRAS HIV-1 SUBTIPO C.....	92
TABELA 6 -	PRESENÇA DE MUTAÇÃO NOS POTENCIAIS SÍTIOS DE N-GLICOSILAÇÃO N289 E N339 EM AMOSTRAS GRUPO LTNP	94
TABELA 7 -	AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO <i>rs12979860</i> NOS INDIVÍDUOS DOS SUBGRUPOS LTNP	97
TABELA 8 -	ALELOS <i>HLA-B</i> E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NO GRUPO LTNP E SUBGRUPOS.....	98
TABELA 9 -	DOSAGENS PLASMÁTICAS DAS QUIMIOCINAS IL-8 E IP-10 NO GRUPO LTNP E SUBGRUPOS	99
TABELA 10 -	DOSAGENS PLASMÁTICAS DAS QUIMIOCINAS IL-8 E IP-10 NO GRUPO DE INDIVÍDUOS HIV-1 PROGRESSORES COMPARANDO COM INDIVÍDUOS RESPONDEDORES OU NÃO À TARV	99
TABELA 11 -	DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IL-8 ENTRE OS DIFERENTES CLADOS HIV-1, GRUPO LTNP	102
TABELA 12 -	DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 ENTRE OS DIFERENTES CLADOS HIV-1, GRUPO LTNP	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Aids	-	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
Asp	-	proteína antisenso do HIV-1 (do inglês <i>HIV-1 antisense protein</i>)
BST2	-	do inglês <i>bone marrow stromal cell antigen 2</i>
CA	-	capsídeo
CCR5	-	correceptor de quimiocina motivo CC tipo 5
CD4	-	<i>cluster of differentiation 4</i>
CRF	-	forma circulante recombinante (do inglês <i>circulating recombinant form</i>)
CTL	-	linfócito T citotóxico (do inglês <i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CXCL8	-	interleucina 8 – IL-8
CXCL10	-	interferon gamma-induced protein 10 – IP-10
CXCR4	-	receptor de quimiocina motivo CXC tipo 4
EC	-	controlador de elite (do inglês <i>elite control</i>)
EDTA	-	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA	-	Estados Unidos da América
Gp	-	glicoproteína
HC-UFPR	-	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HIV-1	-	vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (do inglês <i>human immunodeficiency virus type 1</i>)
HIV-2	-	vírus da imunodeficiência humana tipo 2 (do inglês <i>human immunodeficiency virus type 2</i>)
HLA	-	antígeno leucocitário humano (do inglês <i>human leukocyte antigen</i>)
HSH	-	homens que fazem sexo com homens
HSHM	-	homens que fazem sexo com homens e com mulheres
IN	-	integrase
IIQ	-	intervalo interquartil
LACEN-PR	-	Laboratório Central do Estado do Paraná

LANL	-	<i>Los Alamos National Laboratory</i>
LPS	-	lipopolissacarídeo
LTNP	-	não-progressor por longo tempo (do inglês <i>long-term nonprogressor</i>)
LTR	-	Repetição Terminal Longa (do inglês <i>long terminal repeat</i>)
MA	-	matriz
MHC	-	Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	-	natural <i>killer</i>
NC	-	nucleocapsídeo
Nef	-	do inglês <i>negative regulating factor</i>
NFκB	-	fator de transcrição nuclear kappa-B
ORF	-	do inglês <i>open reading frame</i>
pb	-	pares de base
PBS	-	solução salina fosfatada tamponada
PCR	-	Reação em Cadeia da Polimerase
PVHA	-	peessoas que vivem com HIV/aids
PR	-	protease
Qsp	-	quantidade suficiente para
Rev	-	do inglês <i>regulator of expression of viral proteins</i>
RT	-	transcriptase reversa
SIV	-	Vírus da Imunodeficiência Símia (do inglês <i>simian immunodeficiency virus</i>)
SNP	-	polimorfismo de um único nucleotídeo (do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>)
TARV	-	terapia antirretroviral
Tat	-	Transativador da transcrição
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNAIDS	-	<i>United Nations Joint Programme on HIV/AIDS</i>
URF	-	forma recombinante única (do inglês <i>unique recombinant form</i>)
VC	-	controlador de viremia (do inglês <i>viremic control</i>)

- Vif - Fator de infecciosidade viral
(do inglês *viral infectivity factor*)
- VNP - não-progressor virêmico
(do inglês *viremic non-progressor*)
- Vpr - proteína viral r
(do inglês *viral protein r*)
- Vpu - Proteína viral única
(do inglês *virus protein unique*)
- WHO - World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	HIV - ORIGEM E DIVERSIDADE	20
2.1.1	Epidemiologia molecular do HIV-1 no mundo	22
2.1.2	Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil	27
2.2	IMPLICAÇÕES DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1	29
2.2.1	Diversidade dos clados HIV-1 e progressão para aids.....	29
2.2.2	Diversidade dos clados HIV-1 e resposta ao tratamento antirretroviral....	30
2.2.3	Diversidade dos clados HIV-1 e transmissão viral.....	31
2.3	A EPIDEMIOLOGIA HIV/AIDS	31
2.3.1	A epidemiologia HIV/aids no mundo.....	31
2.3.2	HIV/aids no Brasil.....	34
2.4	O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA – HIV	37
2.4.1	Organização estrutural e genômica do HIV-1.....	38
2.4.1.1	O gene <i>asp</i> do HIV-1.....	41
2.4.2	Tropismo e replicação do HIV-1	43
2.5	TRANSMISSÃO, PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E EVOLUÇÃO PARA AIDS	46
2.5.1	Resposta imune e perfil de ativação imune crônica na infecção pelo HIV-1	49
2.6	OS DIFERENTES PERFIS DE PROGRESSÃO NA INFECÇÃO PELO HIV-1	51
2.6.1	Fatores virais relacionados com controle do HIV-1	55
2.6.2	Fatores do hospedeiro humano relacionados ao controle do HIV-1.....	57
3	OBJETIVOS	64
3.1	OBJETIVO GERAL.....	64
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	64
4	MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1	TIPO DE ESTUDO	66
4.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	66
4.3	CASUÍSTICA.....	66

4.3.1	Critérios de inclusão grupo indivíduos LTNP	66
4.3.2	Critérios de exclusão	67
4.4	MÉTODOS	67
4.4.1	Processamento das amostras	67
4.4.1.1	Obtenção do concentrado de leucócitos (<i>buffy coat</i>).....	68
4.4.1.2	Extração do DNA.....	68
4.4.2	Amplificação do material genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	68
4.4.2.1	Amplificação de regiões do gene <i>CCR5</i> e avaliação do polimorfismo <i>rs12979860</i>	70
4.4.2.2	Amplificação de regiões dos genes <i>env</i> e <i>pol</i>	70
4.4.3	Visualização dos produtos amplificados nas reações de amplificação.....	71
4.4.4	Purificação do produto amplificado de <i>env</i> e <i>pol</i>	71
4.4.5	Etapas do processo de sequenciamento nucleotídico.....	72
4.4.6	Avaliação das sequências e determinação dos subtipos virais	73
4.4.7	Avaliação e predição in silico do tropismo viral	73
4.4.8	Análise de mutações de resistência primária do HIV-1 em amostras dos indivíduos LTNP	74
4.4.9	Clonagem região V3-V5 _{gp120} , gene <i>env</i> HIV-1.....	74
4.4.9.1	Avaliação das sequências obtidas por meio da clonagem	75
4.4.10	Avaliação dos potenciais sítios de N-glicosilação.....	76
4.4.11	Genotipagem <i>HLA-B</i>	76
4.4.12	Avaliação das dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10	77
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
5	RESULTADOS	79
5.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DOS INDIVÍDUOS LTNP	79
5.2	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VIRAIS NO GRUPO LTNP.....	82
5.2.1	Avaliação da distribuição dos clados HIV-1 no grupo LTNP	82
5.2.1.1	Avaliação das características clínico-epidemiológicas do grupo LTNP e os subtipos virais	88
5.2.2	Tropismo viral.....	89
5.2.3	Avaliação da presença de mutações de resistência primária.....	90
5.2.4	Avaliação de mutações na região V3-V5 _{gp120} , grupo LTNP subtipo C.....	90

5.2.5	Avaliação dos sítios de N-glicosilação região V3-V5 _{gp120} grupo LTNP.....	92
5.3	AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO HOSPEDEIRO NO GRUPO LTNP	95
5.3.1	Avaliação da presença de deleção de 32 pb no gene <i>CCR5</i>	95
5.3.2	Avaliação do polimorfismo <i>rs12979860</i> IL28B	96
5.3.3	Avaliação da genotipagem <i>HLA-B</i> no grupo de indivíduos LTNP	97
5.3.4	Avaliação das quimiocinas CXCL8 (IL-8) e CXCL10 (IP-10).....	98
5.3.4.1	Avaliação das dosagens plasmáticas da quimiocina IL-8.....	100
5.3.4.2	Avaliação das dosagens plasmáticas da quimiocina IP-10	102
6	DISCUSSÃO	106
7	CONCLUSÕES	118
8	PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....	120
9	PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO..	121
	REFERÊNCIAS.....	123
	APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E	
	ESCLARECIDO	145
	APÊNDICE 2 - LISTA DE SEQUÊNCIAS.....	147
	APÊNDICE 3 - ARTIGOS	149
	APÊNDICE 4 - AVALIAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO NUCLEOTÍDICA	
	EM AMOSTRA HIV-1 REGIÃO PR/RT.....	169
	APÊNDICE 5 - DETERMINAÇÃO DO TROPISMO VIRAL PELA	
	FERRAMENTA <i>GENO2PHENO</i>(coreceptor).....	170
	ANEXO 1 - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	171

1 INTRODUÇÃO

Desde os primeiros casos relatados da síndrome da imunodeficiência adquirida - aids - em 1981 (GOTTLIEB et al., 1981; MASUR et al., 1981) e a descoberta do vírus da imunodeficiência humana (HIV) como o agente etiológico dessa infecção (BARRE-SINOSSI et al., 1983; GALLO et al., 1983), mais de 35 milhões de pessoas já foram a óbito em decorrência da infecção pelo HIV. Atualmente, estima-se um total de 36,7 milhões de pessoas infectadas pelo HIV em todo o mundo (*United Nations Joint Programme on HIV/AIDS- UNAIDS*, 2016). Segundo os dados do último Boletim Epidemiológico HIV/Aids do Ministério da Saúde (2016), estima-se que 827 mil pessoas vivem com HIV/aids no Brasil, com registro anual de 41,1 mil novos casos de aids nos últimos cinco anos. Mesmo com todos os avanços terapêuticos e regimes de medicações que podem reduzir e controlar a replicação viral, a infecção pelo HIV e a aids continuam entre os mais importantes problemas de saúde pública.

O HIV pertence à família *Retroviridae*, gênero *Lentivirus*, apresenta ácido ribonucleico (RNA) como material genético e têm a capacidade de transcrevê-lo para ácido desoxirribonucleico (DNA) pela ação da enzima transcriptase reversa (GONDA et al., 1985). Atualmente, dois tipos de HIV circulam no mundo, o HIV-1 e o HIV-2, com mais de 50% de diferença em seus genomas, com o HIV-1 amplamente distribuído no mundo e responsável por mais de 90% das infecções, permanecendo o HIV-2 restrito principalmente a países da África Ocidental e presente em alguns países europeus, como Portugal e França (VISSEAUX et al., 2016).

O HIV-1 pode ser classificado em 4 diferentes grupos: M (*major*), O (*outlier*), N (*non-M, non-O*) e P, que é o grupo mais recentemente identificado (PLANTIER et al., 2009). O grupo M é o responsável por mais de 98% das infecções do HIV-1 em todo o mundo (TEBIT et al., 2007) e pode ser filogeneticamente classificado em 9 subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K), 7 subsubtipos (A1-A5, F1 e F2), 88 formas circulantes recombinantes (*circulating recombinant forms - CRFs*) e múltiplas formas circulantes únicas (*unique recombinant forms – URFs*), segundo a base de dados *Los Alamos National Laboratory HIV Database* (LANL) (disponível em www.hiv.lanl.gov, acesso em abril de 2017). A distribuição global desses subtipos virais é altamente heterogênea e variável geograficamente (HEMELAAR, 2012).

Os distintos subtipos de HIV-1 apresentam muitas diferenças, tanto funcional como estrutural, que podem influenciar na transmissão do vírus, na susceptibilidade ou na resistência à terapia antirretroviral (TARV), no tropismo celular, na neurotoxicidade, na replicação viral, nas medições da carga viral e na progressão da doença (KANTOR, 2006; KIWANUKA, 2008; GERETTI et al., 2009).

Entre os indivíduos infectados pelo HIV-1, cerca de 1 a 5% possui uma marcante progressão mais lenta no curso da evolução para aids, e são denominados como “Não Progressores por Longo Tempo” (do inglês *long-term nonprogressors* - LTNPs) (PANTALEO; FAUCI, 1995; CASADO et al., 2010). Esse grupo diferenciado de indivíduos permanece por um longo período de tempo, sem uso de TARV, com adequadas contagens de células T CD4+ e controle da viremia. Esse perfil diferenciado, tem sido associado a vários fatores virais e do hospedeiro humano (HEMELAAR, 2012; DEEKS et al., 2015).

Diversos estudos com esses indivíduos singulares têm sido conduzidos em diferentes países, com o objetivo de identificar quais fatores relacionados ao hospedeiro, seu ambiente e ao agente infeccioso determinam esse perfil diferenciado de evolução da infecção. A identificação de tais fatores de proteção contra a evolução para aids pode ser importante para esclarecer aspectos da patogênese da infecção e pode para auxiliar futuras abordagens para o tratamento da infecção pelo HIV (POROPATICH; SULLIVAN, 2011).

Esse é o primeiro estudo a identificar e avaliar um grupo de indivíduos LTNP no Estado do Paraná, e os resultados desse estudo poderão contribuir para o conhecimento de quais fatores estão associados com a não progressão para aids nesse grupo de pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HIV - ORIGEM E DIVERSIDADE

As origens do HIV podem ser delineadas por múltiplas infecções zoonóticas com vírus da imunodeficiência símia (*Simian Immunodeficiency Viruses* -SIV) de primatas não-humanos africanos para humanos, tendo possivelmente as primeiras transmissões no início dos anos 1920, na cidade de Kinshasa, atual República Democrática do Congo (FARIA et al., 2014). A transmissão interespecies provavelmente ocorreu devido aos hábitos de caça e predação de primatas, além do comércio e manutenção desses como animais de estimação (HAHN et al., 2000).

Em 1983, dois grupos de pesquisa isolaram o agente causador da aids denominado pelo grupo de Luc Montagnier de *Lymphadenopathy Associated Virus* – LAV (BARRE-SINOUSSE et al., 1983) e pelo grupo de pesquisa americano, liderado por Robert Gallo de *Human T Cell Lymphotropic Virus* – HTLV-III. Em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) unifica as denominações e indica a denominação de HIV para o agente viral causador da aids (CASE, 1986).

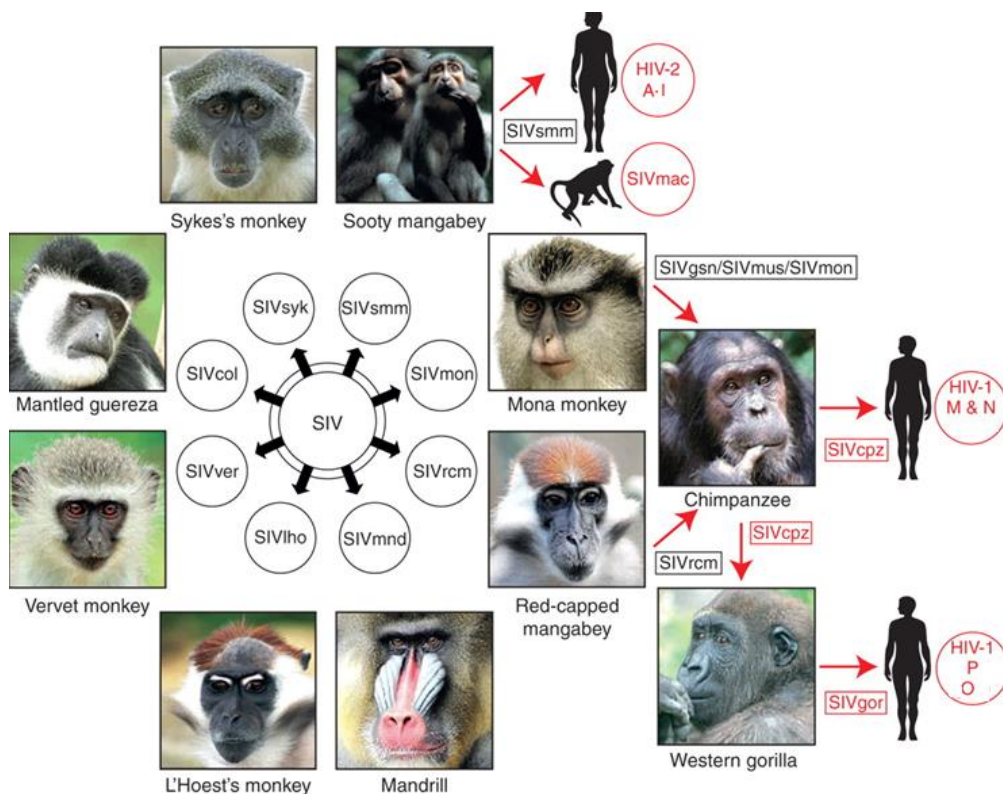
Em 1984 foi isolado o primeiro lentivírus símio (SIVmac) em macacos rhesus (*Macaca mulata*) que apresentaram sintomas semelhantes a aids em humanos, no *New England Primate Research Center*, EUA, originando hipóteses da origem símia do HIV (DANIEL et al., 1985; KANKI et al., 1985).

Em 1985 foi observado um perfil sorológico diferente entre pacientes senegaleses com um padrão menos patogênico da aids, que parecia estar mais relacionado com SIVmac do que com o HIV-1, o que suspeitou-se tratar de outro tipo viral. No ano seguinte, pesquisadores do Instituto Pasteur, França, isolaram pela primeira vez o HIV-2, de dois pacientes portugueses, provenientes do oeste africano (CLAVEL et al, 1986).

Distintos e independentes eventos zoonóticos de transmissão ocorreram de primatas africanos para humanos e resultaram nas diferentes linhagens do HIV. O HIV tipo 1 (HIV-1) é o agente etiológico de mais de 90% das infecções decorrentes desse vírus. Os SIVs de chimpanzés (SIV_{cpz}) e de gorilas (SIV_{gor}) cruzaram a barreira de espécies em pelo menos 4 eventos e resultaram nos diferentes grupos do HIV-1 (FIGURA 1). O HIV-1 é classificado em 4 grupos: M (*major*) responsável

pela pandemia do HIV-1, grupo N (*non-M non-O*) com pouco mais de 20 casos identificados e restritos principalmente a Camarões, grupo O (*outlier*) com aproximadamente 100 mil casos de infecções, principalmente em Camarões, países da África Central e alguns países europeus, como França, Espanha e Bélgica e grupo P, identificado em 2009, com registros de 2 casos em indivíduos camaroneses (PLANTIER et al., 2009; VALLARI et al., 2011; BUSH; TEBIT, 2015).

FIGURA 1 - ORIGENS E DIVERSIDADE DO HIV



FONTE: Adaptado de Sharp e Hahn (2011) e atualizado com dados de Ayouba et al (2013), Peeters et al (2014) e D'arc et al (2015).

NOTA: 45 diferentes SIVs espécies-específicos foram descritos em primatas africanos não-humanos. Em vermelho estão destacados os possíveis eventos de transmissão interespecífica e os vírus resultantes.

O HIV-2 (que diverge em mais de 50% do genoma do HIV-1) compreende 9 distintos grupos (A - I) (AYOUBA et al., 2013), e estão todos relacionados ao SIV de *sooty mangabeys* (*Cercocebus atys*) (SIV_{smm}), sendo que apenas os grupos A e B são endêmicos. Apresenta, até o momento, apenas uma única forma recombinante, CRF01_AB, descrita por Ibe e colaboradores (2010). Aproximadamente 1 a 2 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV-2 em todo o mundo, principalmente

em áreas restritas a África Ocidental, mas com registros de infecções também em alguns países europeus como Portugal e França, explicado pelas suas relações históricas com a África, e em outros países do mundo de maneira mais pontual (VISSEAU et al., 2016).

O HIV-2 tem sido caracterizado como menos patogênico que o HIV-1, com a grande maioria dos casos permanecendo assintomáticos ao longo do curso clínico da infecção. Estudo conduzido por Ekouevi e colaboradores (2015) mostrou que 46% dos indivíduos infectados pelo HIV-2, sem uso de terapia antirretroviral, apresentavam carga viral abaixo de 10 cópias/mL. Outros estudos demonstram que, comparando com indivíduos virêmicos infectados com o HIV-1, os pacientes infectados pelo HIV-2 apresentam carga viral circulante cerca de 30 vezes menor, com menor carga viral nas secreções genitais, 4 a 10 vezes menor taxa de transmissão sexual e 10 a 20 vezes menor taxa de transmissão vertical (POPPER et al., 1999; GOTTLIEB et al., 2006; BURGARD et al., 2010).

2.1.1 Epidemiologia molecular do HIV-1 no mundo

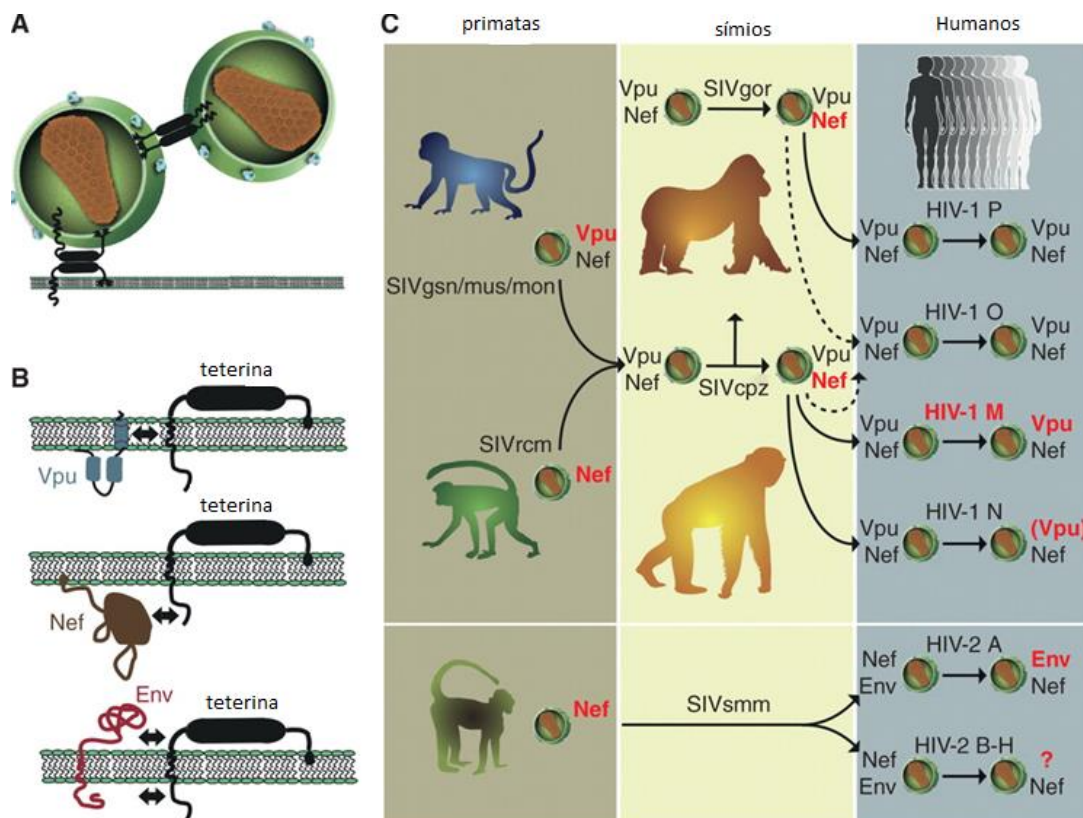
Com a barreira interespecies tendo sido superada, vários fatores biológicos (antagonismo de fatores de restrição viral, capacidade replicativa no hospedeiro), ambientais, demográficos e comportamentais teriam propiciado a propagação da epidemia da aids nas populações humanas (HEMELAAR, 2012).

A capacidade viral de adaptação ao hospedeiro humano, vista principalmente no HIV-1 grupo M, e assim antagonizar diferentes fatores de restrição celular, possibilitou seu sucesso replicativo e domínio na pandemia da aids. Estudos apontam que o efeito neutralizador da ação da teterina (denominada BST2 - *bone marrow stromal cell antigen 2* ou CD317), é um dos fatores que mais contribuíram para o sucesso pandêmico do grupo M. A teterina é uma proteína transmembrana que tem a função de inibir a liberação da progênie viral na célula infectada, principalmente pela ação de degradação conferida pela proteína viral Vpu, por meio da interação dessa com a porção transmembrana da teterina (NEIL; ZANG; BIENIASZ, 2008). Proteínas virais do HIV-1 grupos não-M ou do HIV-2 usam principalmente outras proteínas virais, como Env e Nef para atuar sobre a teterina, porém sua ação antagonista é mais restrita e menos eficaz. A FIGURA 2 demonstra

os possíveis efeitos antagonistas das proteínas virais na interação com a teterina, nos diferentes grupos de HIV-1 e no HIV-2.

O sucesso replicativo e de disseminação em um grande número de indivíduos permitiu ao HIV-1 grupo M ampla diversificação genética, conferido pela elevada taxa replicativa, pelas propriedades que permitem efeitos de recombinação e pela alta taxa mutacional decorrentes da ausência da atividade de correção de erros pela enzima transcriptase reversa, sendo gerada uma taxa de erro de 0,2 a 2 mutações por genoma/ciclo (BONHOEFFER; HOLMES; NOWAK, 1995; PERELSON et al., 1996; SMYTH; NEGRONI, 2016). Como resultado, a população viral intra-hospedeiro apresenta determinado grau de variabilidade, conferindo a presença das denominadas *quasispecies* virais (EIGEN, 1996).

FIGURA 2 - FUNÇÃO DA TETERINA E ANTAGONISMO VIRAL ESPECÍFICO EM DIFERENTES HOSPEDEIROS



FONTE: Adaptado de Sharp e Hahn (2011).

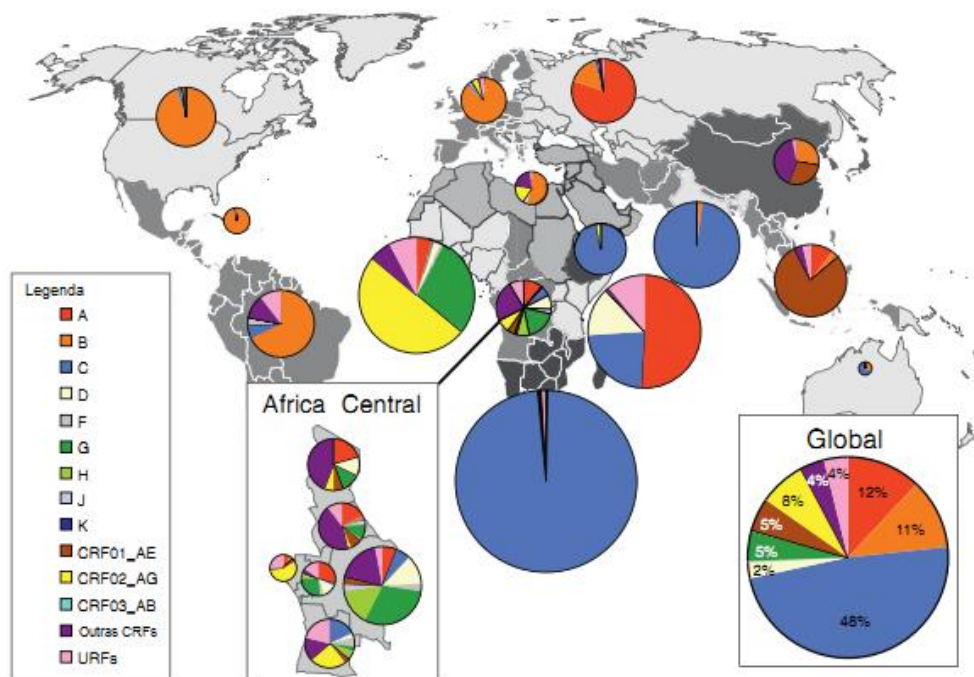
LEGENDA: (A) Mecanismo de restrição da liberação dos *virions* pela teterina. (B) Antagonismo viral sobre a teterina e seus locais de ação (indicados por setas). (C) Função antagonizadora da teterina pelo HIV-1 e HIV-2 e pelos seus precursores símios. Proteínas que são ativas contra a teterina estão destacadas em vermelho.

Essa diversidade genética do HIV-1 grupo M resultou nas classificações em 9 subtipos (A-D, F-H, J e K), que são linhagens virais filogeneticamente relacionadas com aproximadamente a mesma distância genética; 7 subsubtipos (A1-A5, F1, F2) (LIHANA et al., 2012); 88 CRF e diversas URF (LANL, acesso em abril de 2017).

Uma linhagem recombinante é chamada CRF quando é identificada em três ou mais indivíduos sem relação epidemiológica, ou URF quando estão presentes em um único indivíduo ou mais, com vínculo epidemiológico (ROBERTSON et al., 2000).

Os eventos de recombinação no HIV-1 representam um papel muito importante na história evolutiva e na epidemia global e têm sido associados a um dos grandes mecanismos de diversificação do grupo M. Os diferentes clados (subtipos, subsubtipos ou CRF) são filogeneticamente equidistantes um do outro, com variação entre 15 a 30%, dependendo do clado e região genômica avaliada. A distância genética intra-clado, pode variar entre 8-17%, e um mesmo indivíduo pode apresentar até 10% de diversidade genética no gene *env* (HEMELAAR, 2013). Há uma distribuição geográfica global bastante heterogênea dos clados, com a presença de praticamente todos os representantes do grupo M na África (FIGURA 3).

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DOS CLADOS DE HIV-1



FONTE: Adaptado de Hemelaar et al (2012).

NOTA: A representação gráfica é relativa ao número de pessoas que vivem com HIV/aids em cada região (dados dos anos 2000 a 2007).

O subtipo C representa praticamente metade do total de infecções em todo o mundo, sendo predominante nos países do sul e leste africanos e na Índia, porém presente em várias outras regiões como na Europa, China e no Sul do Brasil (HEMELAAR et al., 2012, RABONI et al., 2010; CARVALHO et al., 2015; GRAF et al., 2016). Há estudos indicando que o HIV-1 C parece se disseminar com mais facilidade do que outros subtipos do grupo M, talvez relacionado ao fato de ocorrer uma maior predisposição desse subtipo viral para localização na mucosa genital feminina quando comparado a outros subtipos, que poderia facilitar tanto a transmissão heterossexual como vertical (WALTER et al., 2009; TEBIT; ARTS, 2011; HEMELAAR, 2013). Outra possível explicação é a de que vírus do subtipo C possam apresentar menor aptidão viral, e assim estar relacionado a uma progressão mais lenta da infecção pelo HIV-1 quando comparado a outros subtipos, possibilitando maior chance de transmissão ao longo do tempo (ARIEN et al., 2005; ABRAHA et al., 2009; SANTOS da SILVA et al., 2016).

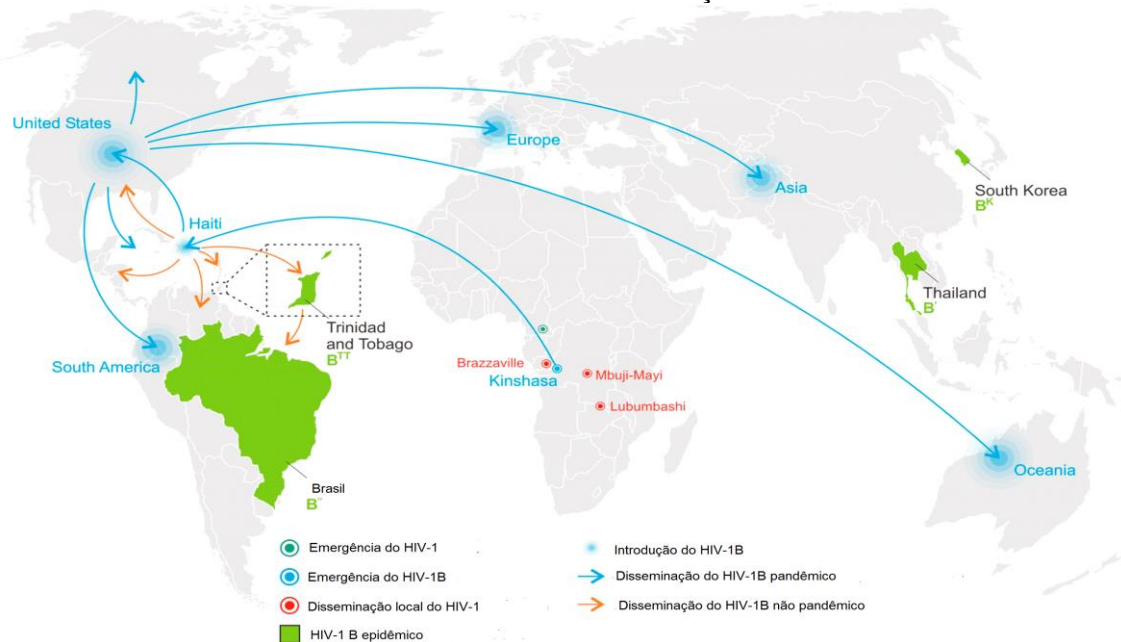
O subtipo A, que foi o subtipo mais comum na região africana no início da pandemia da aids, representa hoje cerca de 12% das infecções no mundo.

As CRF representam cerca de 20% das infecções, sendo que a CRF02_AG é bastante representativa nos países do oeste e norte africano e a CRF01_AE nos países do sudeste Asiático. As URF podem representar até 30% das infecções nos locais onde vários subtipos cocirculam (VUILLEUMIER; BONHOEFFER, 2015). É sabido que os efeitos da recombinação no HIV-1 têm grande importância na história evolutiva e na epidemia global. Entretanto, os pontos ou locais de recombinação não são homogêneos ao longo do genoma do HIV, e a recombinação não ocorre randomicamente. As regiões genômicas mais permissíveis à recombinação genética são denominadas como “*hot spots*” (áreas altamente polimórficas), ao contrário de regiões denominadas “*cold spots*”, que seriam menos propensas a recombinação (SMYTH et al., 2014).

O subtipo B é amplamente distribuído pelo mundo e apresenta maior frequência na Europa, Américas e Austrália, representando cerca de 11% das infecções pelo HIV-1 (LIHANA et al., 2012; HEMELAAR, 2013). O HIV-1 subtipo B foi o primeiro clado a ser identificado, caracterizado e associado à aids (GALLO et al., 1983, MONTAGNIER et al., 1984), tem sido modelo para muitas pesquisas e é o subtipo mais amplamente estudado. Vários estudos procuram demonstrar os padrões de dispersão desse subtipo no mundo. Segundo a revisão de Junqueira e

Almeida (2016), acredita-se que a rota da migração do clado B se deu da África para o Haiti, no início dos anos 1960, com provável transmissão entre homens que fazem sexo com homens (HSH), alterando para um perfil de transmissão heterossexual ao logo do tempo. Do Haiti, os vírus foram introduzidos diretamente nos Estados Unidos, provavelmente em 1969, primeiramente na população HSH, e depois disseminado para Europa, Ásia, América Latina e Austrália. Mesmo mais de 30 anos depois dos primeiros casos confirmados, ainda existe uma evidente associação entre o contato homossexual e a infecção pelo HIV-1 B em muitas subepidemias em todo o mundo, refletindo o efeito fundador do início da pandemia (BEYRER et al., 2012). Além do subtipo B pandêmico (que apresentam o motivo GPGR), até o momento são conhecidas 4 principais variantes de acordo com modificações na coroa da alça V3_{gp120} do gene *env*: o B da Tailândia (motivo GPGQ), o B de Trinidad e Tobago (com deleção da treonina na parte terminal do *loop* da alça V3), o B da Coréia (motivo GPGS) e o B' do Brasil (motivo GWGR) (JUNQUEIRA; ALMEIDA, 2016) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - ESTIMATIVA DA DINÂMICA DE MIGRAÇÃO DO HIV-1 B NO MUNDO



FONTE: Adaptado de Junqueira e Almeida (2016).

A variante brasileira (denominada B', B'-GWGR, B_{BR} ou B do Brasil) já foi relatada em 23 países, porém somente neste país apresenta frequência em valores epidêmicos (17-50%) (JUNQUEIRA et al., 2013; PIMENTEL et al., 2013; LEITE et al., 2017).

2.1.2 Epidemiologia molecular do HIV-1 no Brasil

Estudos e análises de filodinâmica indicam diferentes introduções do subtipo B no Brasil, nos anos 1960, com prováveis múltiplas introduções, entre os quais os Estados Unidos e Caribe, com circulação viral inicialmente entre HSH e usuários de drogas injetáveis, e gradualmente introduzido na população heterossexual. A região sudeste é considerada o epicentro da epidemia desse subtipo no Brasil (BELLO et al., 2007; JUNQUEIRA et al., 2011, CABELLO et al., 2015).

Sugere-se que a introdução do subtipo F1 ocorreu possivelmente no final dos anos 1970 diretamente da República Democrática do Congo (BELLO; AFONSO; MORGADO, 2012a).

Estudos apontam que a introdução do subtipo C no Brasil seria mais recente quando comparada com HIV-1 B, entre os anos 1960-1980. A rota precisa de imigração do HIV-1 C ao Brasil ainda não é totalmente clara, mas estudos filogeográficos indicam possível introdução monofilética da região do leste da África ao Brasil, mais precisamente ao Paraná, com disseminação no eixo norte-sul até o Rio Grande do Sul, tendo a região de Florianópolis um importante papel nessa migração (BELLO et al., 2008; VERAS et al., 2011; BELLO et al., 2012b). O conhecimento da epidemia por HIV-1 C no Brasil foi identificada nos anos 1990, com amostras de Porto Alegre de 1992-1993 (*WHO Network for HIV isolation and characterization*, 1994), e posteriormente vários estudos apontaram a circulação desse subtipo, principalmente nos 3 estados da região Sul do Brasil (GRAF; PINTO, 2013).

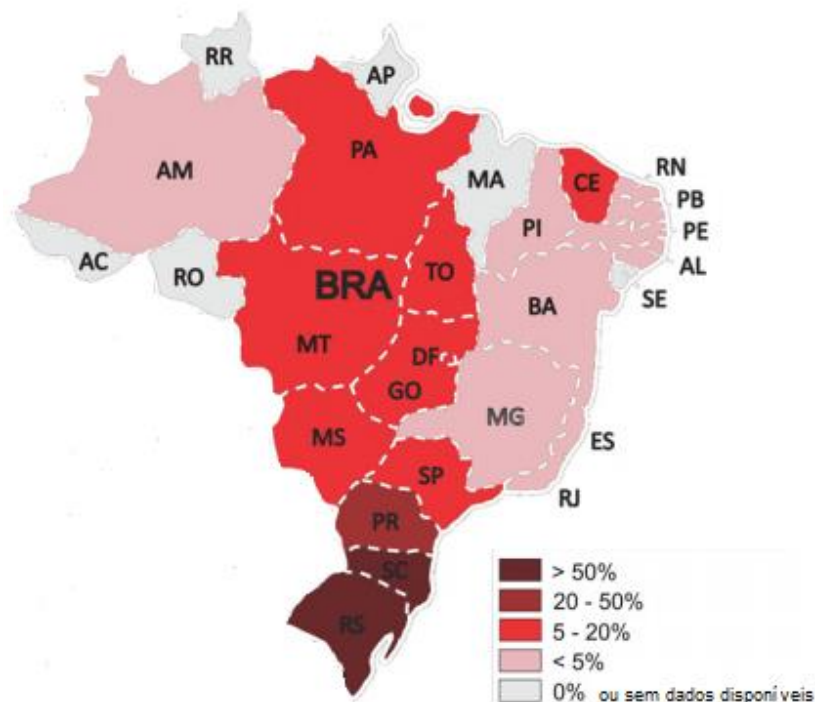
A epidemia de HIV-1 no Brasil é complexa, com importantes variações geográficas na distribuição dos diversos subtipos de HIV-1. A epidemia atual da aids no Brasil é derivada principalmente do HIV-1 B (pandêmico e variante B_{BR}) seguida dos clados F1, C e CRF, embora as frequências desses diferentes clados serem bastante heterogêneas entre as regiões brasileiras. Nas regiões Sudeste, Norte, Nordeste e Centro-Oeste o HIV-1 B representa cerca de 70-90% das infecções, F1 3 - 17%, recombinantes BF1 2 - 24% e C 3 - 7%, com poucos relatos da ocorrência dos subtipos A e D (ALENCAR et al.; 2013; DE MORAES SOARES et al., 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; DA COSTA et al., 2016).

Já no Sul do Brasil o cenário se mostra diferente do restante do Brasil, com o subtipo C e recombinantes BC apresentando as maiores frequências, com

registros de mais de 60% das infecções dependendo da região avaliada (RABONI et al., 2010; SILVA et al., 2010; GRAF et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; GRAF et al., 2016) (FIGURA 5).

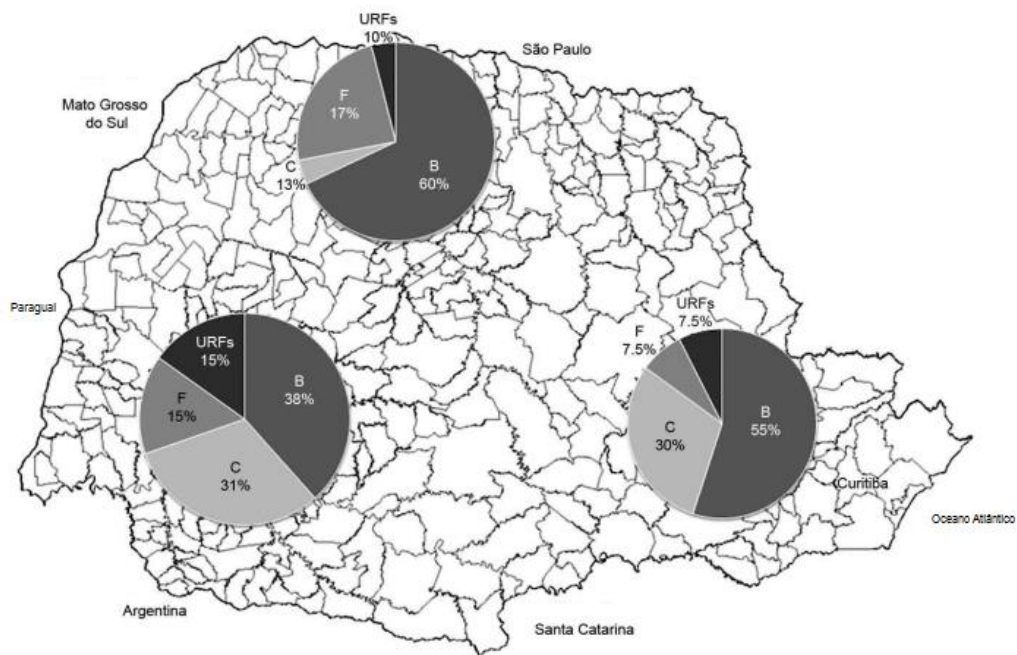
São poucos os estudos que apresentam o perfil molecular do HIV-1 no Estado do Paraná. No estudo conduzido por Raboni e colaboradores (2010) foram analisadas 245 amostras coletadas de 1999 a 2007 de pacientes adultos (≥ 13 anos), e por sequenciamento do gene *pol*, a frequência do subtipo B foi de 55%; do subtipo C 27%, do subtipo F 10% e das URF 8%, observando diferenças de acordo com a região geográfica do Estado (FIGURA 6). Já no grupo dos pacientes pediátricos (<13 anos), foram avaliadas 48 amostras entre as quais o subtipo C foi responsável por 46% das infecções; o subtipo B 29%; e as URF 25%, indicando, possivelmente, uma mudança no perfil das infecções recentes ou um retrato específico para o grupo avaliado.

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DO SUBTIPO C E FORMAS RECOMBINANTES QUE CONTÊM C, NO TERRITÓRIO BRASILEIRO



FONTE: Adaptado de Graf e Pinto (2013).

FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS CLADOS DE HIV-1, NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, EM INDIVÍDUOS MAIORES DE 13 ANOS (N = 245)



FONTE: Raboni e colaboradores (2010).

Outros estudos do Paraná, com amostras de indivíduos adultos, mostram HIV-1 B em 52 - 69% das infecções; subtipo C em 21 - 30%; F1 em 2,5 - 14%; recombinantes BF em 4 - 10,5% e BC em 2,5 - 14% (FERREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2010; TOLEDO et al., 2010).

2.2 IMPLICAÇÕES DA DIVERSIDADE GENÉTICA DO HIV-1

A diversidade genética do HIV-1 tem sido sugerida como possível codeterminante no contexto da progressão da infecção, nas diferenças de transmissão viral, na resposta ao tratamento antirretroviral, no desenvolvimento de resistência e na patogênese da infecção (GERETTI, 2006; HEMELAAR, 2013).

2.2.1 Diversidade dos clados HIV-1 e progressão para aids

O subtipo D tem sido associado com uma progressão mais precoce e grave da infecção, quando comparado com outros subtipos cocirculantes, apresentando

um declínio muito maior na contagem de células T CD4+ (BAETEN et al., 2007; KIWANUKA et al., 2008; EASTERBROOK et al., 2010; KIWANUKA et al., 2010; LEITE et al., 2017). Essa associação poderia ser atribuída, segundo alguns estudos, como decorrente da alta frequência de tropismo viral pelo correceptor CXCR4 para esse subtipo, mesmo nos estágios iniciais da infecção (TSCHERNING et al., 1998; KALEEBU et al., 2007).

A variante B_{BR}, tem sido proposta como menos patogênica que outros isolados HIV-1 B, sendo que nesses estudos os indivíduos infectados com essa variante apresentaram uma progressão mais demorada para a aids, maior contagem de células T CD4+, e menor carga viral se comparados com os infectados pela variante pandêmica (DIAZ et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010). Uma das explicações seria pela possibilidade de maior avidéz dos anticorpos direcionados contra a região V3_{gp120} desses vírus (DE BRITO et al., 2006). No recente estudo publicado por Leite e colaboradores (2017), os pesquisadores avaliaram a progressão da infecção e a possível associação com os subtipos HIV-1 em diferentes grupos de indivíduos, a partir da avaliação de sequências do gene *env* e não encontraram diferenças na evolução para aids entre a variante B_{BR} e pandêmica.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o subtipo C apresenta uma menor capacidade replicativa e menor aptidão viral quando comparado principalmente com os subtipos B e D (ARIEN et al., 2005; ABRAHA et al., 2009), além de maior evidência de tropismo pelo correceptor CCR5, mesmo na fase mais tardia da infecção pelo HIV-1 (POLLAKIS et al., 2004; ESBJORNSSON et al., 2010), mas ainda não há um consenso nesse assunto. No trabalho conduzido por Santos da Silva e colaboradores (2016) demonstrou-se que polimorfismos no domínio citoplasmático da gp41 de vírus HIV-1 C contribui para uma menor capacidade replicativa viral quando comparada com o subtipo B. O domínio citoplasmático da gp41 que auxilia a incorporação dos vírions, no transporte intracelular da proteína Env, além de também contribuir para a infectividade viral uma vez que auxilia em manter a estrutura dessa proteína.

2.2.2 Diversidade dos clados HIV-1 e resposta ao tratamento antirretroviral

A variabilidade genética do HIV-1 pode influenciar na susceptibilidade à terapia antirretroviral e no aparecimento de mutações de resistência no genoma viral

o que continua sendo um desafio no tratamento dos indivíduos infectados. A maioria das mutações de resistência vistas em HIV-1 B, que é o subtipo em que as medicações antirretrovirais são originalmente desenvolvidas, são também verificadas em clados não-B. Porém há registros de mutações de resistência não identificadas no subtipo B, que seriam próprias desses outros clados (KANTOR et al., 2006; MARTINEZ-CAJAS et al., 2009; HUANG et al., 2016), justificando ainda mais a necessidade de avaliação e conhecimento da epidemiologia molecular na infecção pelo HIV-1.

2.2.3 Diversidade dos clados HIV-1 e transmissão viral

Apesar da ampla diversificação das vias de transmissão de todos os clados de HIV-1, muitos estudos ainda demonstram uma associação do subtipo B com a transmissão entre usuários de drogas injetáveis e entre HSH (HERRING et al., 2003; BLANCO et al., 2015). Por outro lado, vários estudos mostram associação entre o subtipo C e a transmissão entre heterossexuais, inclusive no Sul do Brasil (GRAF et al., 2011; SILVEIRA et al., 2012; GRAF et al., 2016) ou entre usuários de drogas injetáveis (RABONI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012).

2.3 A EPIDEMIOLOGIA HIV/AIDS

2.3.1 A epidemiologia HIV/aids no mundo

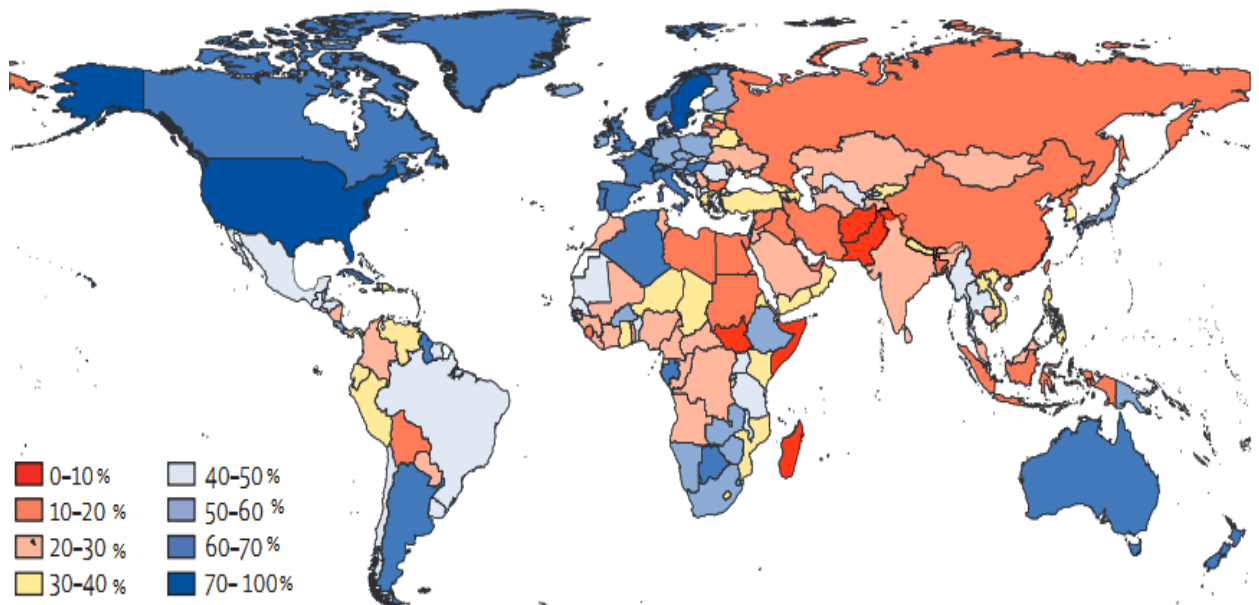
Em 05 de junho de 1981, foi publicado o primeiro comunicado oficial relatando sobre a ocorrência de imunodeficiência em 5 homens que apresentaram pneumonia por *Pneumocystis carinii*, na cidade de Los Angeles, no boletim “*Morbidity and Mortality Weekly Report*” (MMWR) do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos (GOTTLIEB, 1981). No mesmo ano, outros artigos são publicados com registros de outras doenças oportunistas e sarcoma de Kaposi em indivíduos com imunodeficiência, entre HSH, heterossexuais e usuários de drogas, com início dos registros também na Europa. Em 1982, o CDC de Atlanta registra o primeiro caso em hemofílico, são registrados os primeiros casos em mulheres, em adultos e crianças que receberam transfusão sanguínea. No final do 2º semestre desse ano é indicada a denominação da infecção como aids e é proposta a definição

de caso (CDC, 1982), desenhou-se assim os primeiros traços da pandemia global por aids.

Segundo os últimos dados publicados pela Organização Mundial da Saúde e UNAIDS (UNAIDS, 2016), desde o início da pandemia em 1981, já ocorreram mais de 35 milhões de óbitos relacionados à infecção pelo HIV. Dados até 2015 estimam que aproximadamente 36,7 milhões de pessoas vivam com HIV/aids em todo o mundo, com a região da África Subsaariana representando cerca de 70% de todas as infecções.

Globalmente cerca de 46% das pessoas infectadas pelo HIV recebem TARV, porém essas estimativas variam de acordo com a região (FIGURA 7). Estima-se ainda um total de 2,1 milhões de novas infecções e cerca de 1,1 milhão de óbitos relacionados à aids em 2015. Nesse ano ainda, a razão por sexo em adultos (entre 15 a 49 anos), segundo dados globais é de 1,03 (F:M). Todos esses números chegam a ser um pouco maiores na avaliação temporal de 1980-2015, proposta pelo grupo de trabalho *Global Burden of Disease (GBD) Study HIV Collaborators (2016)*.

FIGURA 7 - PROPORÇÃO GLOBAL DE PESSOAS VIVENDO COM HIV E EM TARV, EM 2015



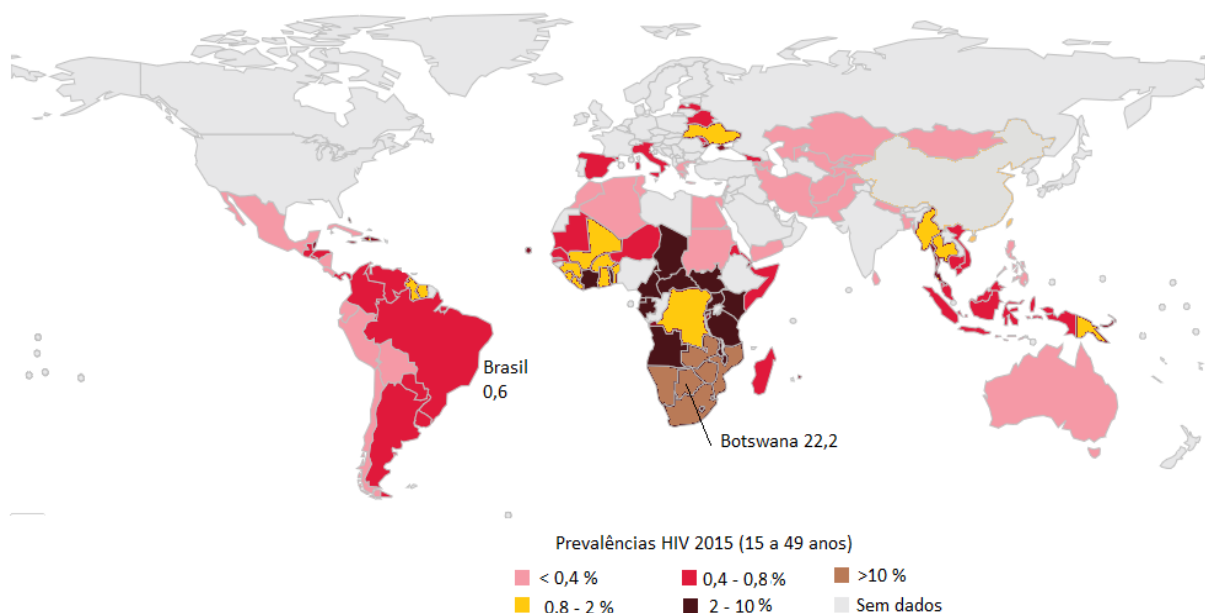
FONTE: GBD 2016 HIV Collaborators

De acordo com os dados mundiais, adolescentes e mulheres jovens, com idade entre 15-24 anos representam um grupo de alto risco para a infecção pelo HIV-1, representando cerca de 20% das novas infecções entre adultos em 2015, sendo esta maior ainda nas regiões geográficas com alta prevalência da infecção,

como visto na África Subsaariana. As relações de desigualdade de gêneros, limitações no acesso à educação sexual e reprodutiva, pobreza e violência são os norteadores do aumento do risco da infecção pelo HIV-1 nas adolescentes e mulheres jovens nessas regiões. É variável a distribuição das novas infecções entre as pessoas de populações-chave para a infecção (trabalhadores do sexo, usuários de drogas injetáveis, transgêneros, pessoas em privação da liberdade, HSH) de acordo com a região geográfica avaliada. Em 2014, aproximadamente 90% das novas infecções pelo HIV que ocorreram nas regiões da Ásia Central, Europa, América do Norte, Oriente Médio e Norte da África foram entre pessoas de populações chave e seus parceiros sexuais. Já em outras regiões da Ásia e Pacífico, América Latina e Caribe as populações-chave e seus parceiros sexuais representaram cerca de 2/3 das novas infecções, e na África Subsaariana 20%, porém aqui, a prevalência nessas populações é extremamente alta. Esses dados só reforçam ainda mais a necessidade de garantir e disponibilizar o acesso aos serviços de saúde e tratamento às populações-chave, uma vez que é visto uma diminuição do número de novas infecções nas regiões livres de discriminação e estigmas (UNAIDS, 2016).

Na FIGURA 8 são apresentadas as prevalências da infecção pelo HIV-1 na população de 15 a 49 anos em 2015, segundo dados da UNAIDS (UNAIDS, 2016).

FIGURA 8 – PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR HIV NA POPULAÇÃO DE 15 A 49 ANOS, EM 2015



FONTE: adaptado de UNAIDS (2016)

Houve um importante progresso na redução da transmissão da infecção do HIV da mãe para a criança, decorrentes ao melhor acesso à TARV e protocolos de atendimento. No ano 2000 foram 490 mil novas infecções em crianças, em 2015 esse número diminuiu para cerca de 150 mil (70% de redução), porém muito ainda precisa ser feito para bloquear a transmissão. Em 2015, cerca de 77% das gestantes vivendo com HIV tiveram acesso à TARV e apenas 54% das crianças expostas ao HIV nos países mais acometidos pela infecção foram testadas para o HIV dentro dos dois primeiros meses, como recomendado. Sem o conhecimento do *status* sorológico HIV, essas crianças ficam sem acesso ao tratamento, e sem tratamento cerca de 50% dessas crianças podem vir a óbito até os dois anos de idade (*Children and HIV Fact sheet* - UNAIDS, 2016). Em julho de 2015, Cuba foi o primeiro país a receber da Organização Mundial da Saúde a validação da eliminação da transmissão do HIV da mãe para a criança. Essa validação o qual é definido pela ocorrência de menos de 50 casos/100.000 nascidos vivos, com taxas de transmissão inferiores a 5% nas populações que amamentam ou menos de 2% nas populações que não amamentam, mantendo esses dados há pelo menos um ano, com 95% das gestantes conhecendo seu *status* HIV e mais de 95% das gestantes em TARV. Em 2016, Belarus e Tailândia também receberam essa mesma certificação (ISHIKAWA et al., 2016).

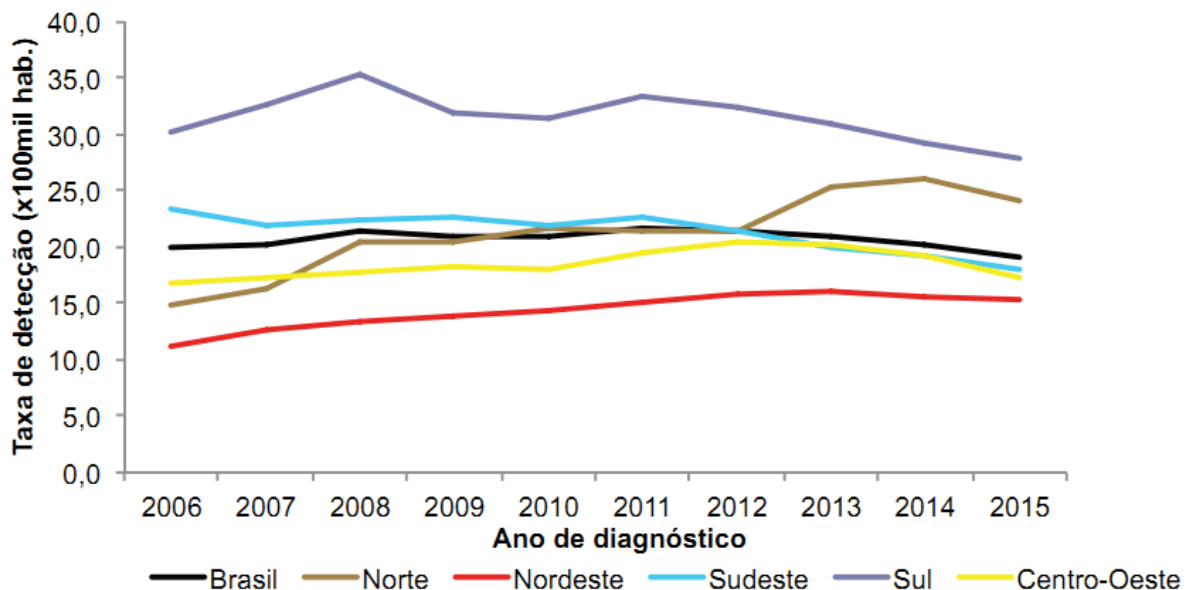
2.3.2 HIV/aids no Brasil

No Brasil, o primeiro caso identificado de aids ocorreu em 1982, em São Paulo, pela médica dermatologista Valéria Petri, em um paciente masculino, homossexual e com Sarcoma de Kaposi, sendo seu relato apresentado no Congresso Brasileiro de Dermatologia, no início de 1983. A primeira publicação em revista científica aconteceu no mesmo ano por Amato Neto e colaboradores (1983), referente a um caso de aids diagnosticado no final de 1982, em um homem homossexual com micobacteriose atípica (TEODORESCU; TEIXEIRA, 2015).

O conjunto de informações referentes a epidemiologia HIV/aids no Brasil se dá com base nas notificações compulsórias desses no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan); de dados obtidos no Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM); no Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (Siscel) e por último, no Sistema de Controle Logístico de Medicamentos (Siclom).

Segundo dados divulgados no Boletim Epidemiológico HIV-Aids, do Ministério da Saúde (2016), com dados nacionais até 30 de junho de 2016, estima-se que 827 mil pessoas vivam com HIV/aids (PVHA) no Brasil, e desde o início da pandemia já foram contabilizados 303.353 casos que tiveram a aids como causa básica do óbito. Registram-se nos últimos anos em torno de 41,1 mil novos casos de aids no país anualmente, com uma taxa de detecção, que tem se mantido estável, de 20,7 casos aids/100 mil habitantes. Ressalta-se que essa taxa de detecção é maior na região Sul do Brasil, tendo entre as unidades da federação que apresentam as maiores taxas de detecção os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com 34,7 e 31,9 casos/100 mil habitantes respectivamente (FIGURA 9). Entre as capitais, Porto Alegre apresentou em 2015 a maior taxa de detecção, 74,0 casos/100 mil habitantes.

FIGURA 9 - TAXA DE DETECÇÃO DE AIDS SEGUNDO REGIÃO DE RESIDÊNCIA POR ANO DE DIAGNÓSTICO. BRASIL, 2006 A 2015



FONTE: Boletim Epidemiológico HIV/Aids (2016)

NOTA: Casos notificados no Sinan e Siscel/Siclom até 30/06/2016 e no SIM de 2000 até 2015.

Quanto a razão de sexo nos casos de aids em nosso país, a partir de 2009 é observada uma alteração no perfil epidemiológico, com redução no número de casos em mulheres e aumento dos casos em homens, sendo que em 2014 esses valores foram de 2,1 (M:F), com diferenças regionais bastante expressivas, onde a região Sul, talvez influenciada pelo perfil diferenciado na epidemiologia molecular do HIV, apresentou a menor razão, 1,7 (M:F). Diferenças também são observadas quanto a

faixa etária, sendo que nos indivíduos entre 20-29 anos é observada a maior razão de sexos, 3,0 (M:F). O maior número de casos de aids é visto entre indivíduos com 25 a 39 anos, de ambos os sexos, ressaltando o crescimento da aids em jovens (15-24 anos) do sexo masculino, com aumento bastante expressivo na taxa de detecção nos últimos anos, sendo que na faixa etária de 15-19 anos a detecção passou de 2,4/100mil habitantes em 2006 para 6,9 casos/100 mil habitantes em 2015, e de 15,9 para 33,1 casos/100 mil hab. nos jovens com idade entre 20-24 anos.

Quanto a categoria de exposição, a principal via de transmissão do HIV no país é a sexual, com uma tendência de aumento na proporção de casos em HSH nos últimos 10 anos. A maioria dos casos novos de infecções pelo HIV também são observados concentrados nas populações-chave, como visto globalmente, direcionando o foco de atenção das autoridades em saúde nessas populações, visando sua redução.

Quanto a taxa de detecção de aids em menores de cinco anos, que infere a taxa de transmissão vertical, é observada uma tendência de queda no Brasil de aproximadamente 42,7% nos últimos 10 anos, onde os valores de 2015 são de 2,5/100 mil habitantes, porém com diferenças regionais, refletindo os avanços na prevenção da transmissão do HIV da mãe para a criança, e almejando, num futuro próximo, a certificação de país livre da transmissão do HIV-1 de mãe para a criança.

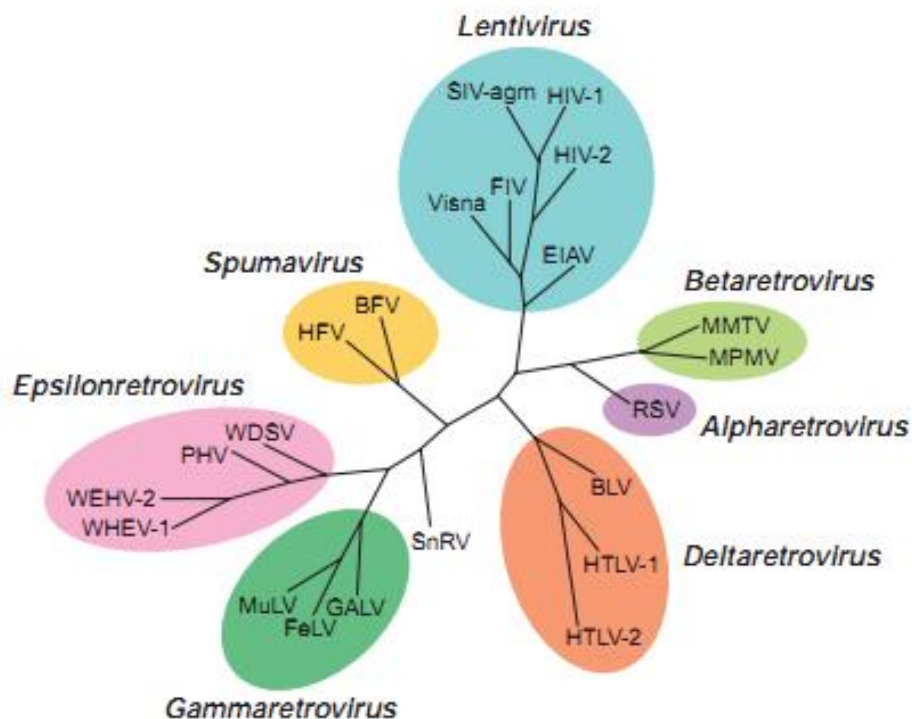
Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para o manejo da infecção pelo HIV em adultos (2013), seguindo as recomendações da Organização Mundial da Saúde, é recomendado o início imediato da TARV para todos as PVHA, independente da contagem de células T CD4+. Segundo dados referentes a cascata de cuidados contínuos, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017) estima-se que aproximadamente 64% das PVHA diagnosticadas no Brasil estão em TARV e que 50% do total de PVHA apresentam supressão da carga viral.

Tais avaliações fazem parte do monitoramento clínico das PVHA, que visa alcançar as 3 metas propostas que fazem parte da cascata de cuidados contínuos e que foram lançadas durante o 1º Forum Latino-Americano e do Caribe sobre o cuidado e atenção ao HIV 2014, e posteriormente reconhecidas e recomendadas pela UNAIDS. As metas são que os países, até o ano de 2020, deveriam ter 90% das PVHA diagnosticadas; 90% das PVHA diagnosticadas em TARV; e 90% das PVHA em TARV com supressão viral (meta 90-90-90).

2.4 O VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA – HIV

A família *Retroviridae* é composta por vírus que apresentam RNA como material genético, mas que após a entrada na célula hospedeira é transcrito em DNA pela ação da enzima transcriptase reversa, com posterior integração desse no DNA cromossomal podendo manter uma infecção persistente no organismo hospedeiro. Essa forma de DNA viral integrado (proviral) atua como molde para a formação do RNA viral e proteínas que formarão a progênie desses vírus. Os retrovírus podem ser classificados em sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*. O gênero *Lentivirus* é formado por vírus que apresentam um longo período de incubação e estão relacionados com várias doenças incluindo imunodeficiências, desordens neurológicas e artrite. Os critérios que demarcam as diferentes linhagens de *Lentivirus*, os quais incluem o HIV-1 e HIV-2, são baseados nas diferenças no genoma, nas propriedades antigênicas, nos diferentes hospedeiros e na patogenicidade (GOFF, 2013) (FIGURA 10).

FIGURA 10 - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DOS GÊNEROS DA FAMÍLIA *RETROVIRIDAE* A PARTIR DA ANÁLISE DE REGIÕES CONSERVADAS DO GENE *POL*

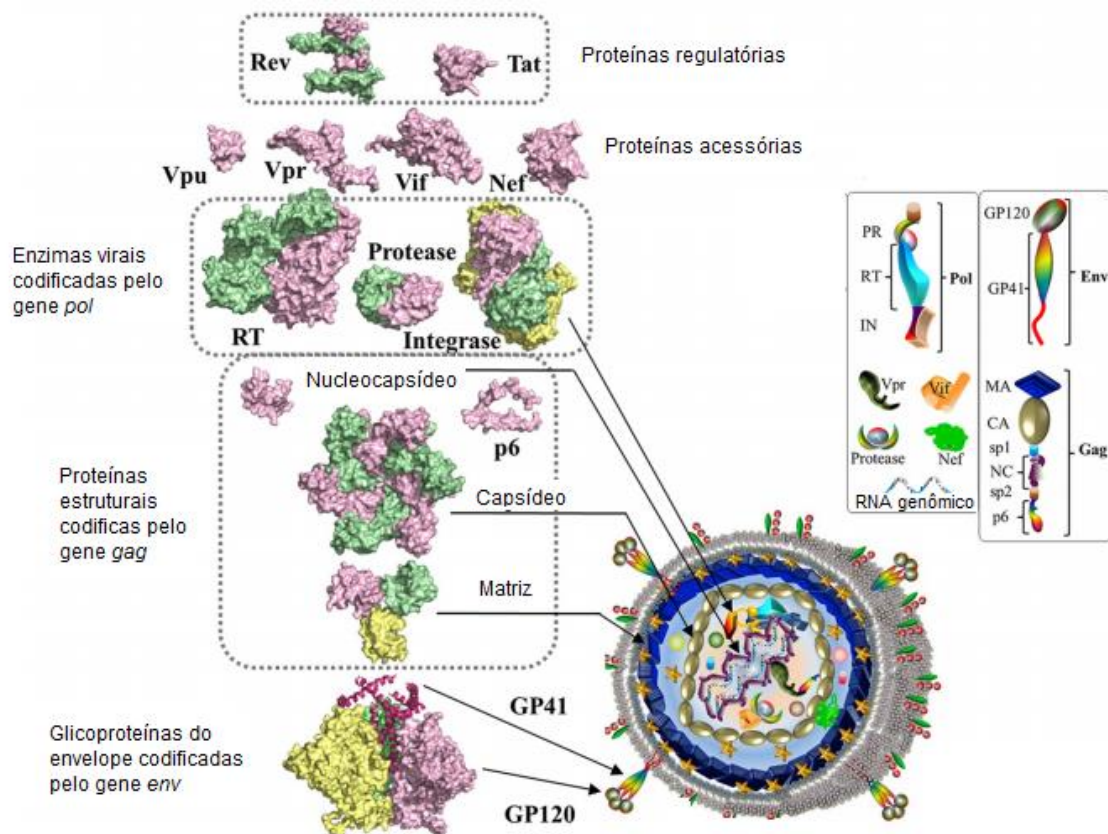


FONTE: King et al (2012).

2.4.1 Organização estrutural e genômica do HIV-1

Na partícula viral madura, o genoma do HIV é constituído por duas fitas simples de RNA, idênticas, de polaridade positiva, com aproximadamente 9 kilobases (kb). O material genético encontra-se delimitado pelas glicoproteínas (gp) do nucleocapsídeo (NC), no interior de um capsídeo viral glicoproteico (CA) e envolto pela matriz de proteína (MA). Mais externamente está o envelope viral composto por uma bicamada lipídica de origem celular e trómeros de glicoproteínas virais (CHINEN; SHEARER, 2002; LI; CLERCQ, 2016) (FIGURA 11).

FIGURA 11- MODELO DA PARTÍCULA VIRAL MADURA DO HIV-1



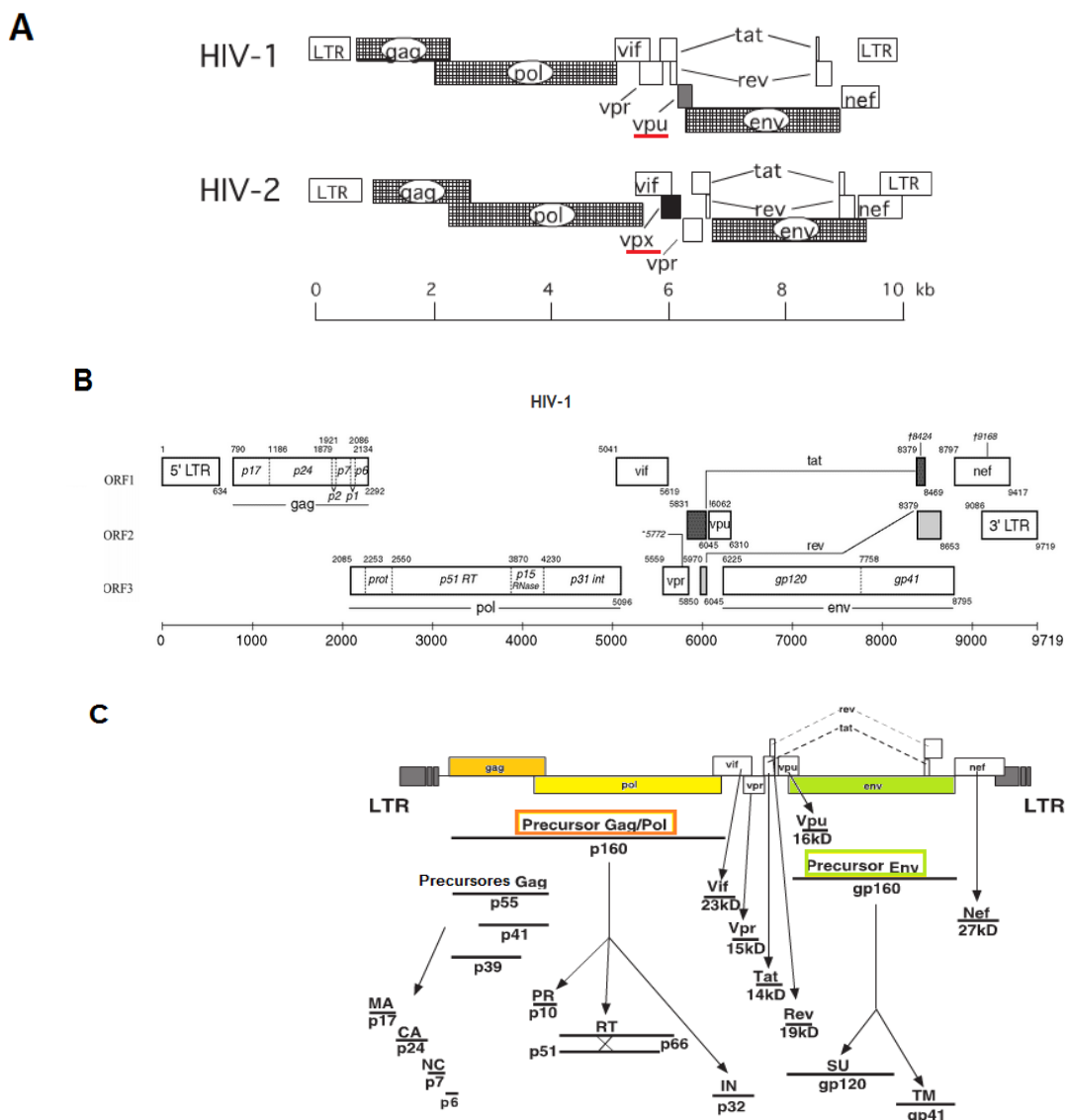
FONTE: Adaptado de Li e Clercq (2016)

NOTA: Representação das estruturas protéicas e da partícula viral do HIV-1. RT: transcriptase reversa; PR: protease; IN: integrase; MA: matriz; CA: capsídeo; NC nucleocapsídeo.

O genoma proviral do HIV-1 apresenta três genes principais: *env* que codifica as glicoproteínas do envelope gp120 e gp41; *pol* que codifica as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease; e *gag* que codifica as proteínas estruturais internas da matriz, capsídeo, nucleocapsídeo e p6. Apresenta ainda dois

genes reguladores *rev* e *tat* e genes acessórios *vif*, *vpu*, *vpr*, e *nef* que estão relacionados desde a promoção da transcrição do DNA proviral e transporte do RNAm para o citoplasma, até evasão de mecanismos de resposta imune inata e adaptativa. As regiões codificadoras são flanqueadas por repetições terminais longas (*long terminal repeats* – LTRs). O gene *vpu* está presente exclusivamente no HIV-1 e *vpx* no HIV-2 (MALIM; ERMEMAN, 2008; LI; CLERCQ, 2016) (FIGURA 12).

FIGURA 12 - ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HIV



FONTE: Adaptado de Freed e Martin, em *Fields Virology* (2013) e *Los Alamos HIV Database* (2016).

LEGENDA: A: Organização genômica do HIV-1 e HIV-2. B: Mapa genético do HIV-1, em HXB2 (K03455) demonstrando os genes virais e a região LTR. C: Proteínas codificadas pelos genes do HIV-1 (precursoras e processadas). MA: proteína da matriz; CA: proteína do capsídeo; NC: proteína do nucleocapsídeo; PR: protease; RT: transcriptase reversa; IN: integrase; SU: glicoproteína de superfície; TM: glicoproteína transmembrana.

As proteínas do envelope são primeiramente codificadas pelo gene *env* como uma poliproteína precursora gp160, que posteriormente é processada em heterodímeros de unidades da gp120 e gp41, que no vírion apresentam-se em arranjos trímeros (FIGURA 11 e FIGURA 12). A gp120 (de superfície) promove o reconhecimento de receptores e correceptores celulares e permite a fixação na célula, e as unidades da gp41 (transmembrana), induzem a fusão entre o envelope viral e a membrana celular e permitem a internalização da partícula viral (FREED; MARTIN, 2013).

A poliproteína precursora Gag p55, codificada pelo gene *gag*, contém os domínios da matriz (MA p17), do capsídeo (CA p24), do nucleocapsídeo (NC p7), p6 e dois peptídeos espaçadores SP1 e SP2. O domínio MA promove a incorporação de Env na membrana lipídica na formação do envelope viral dos novos vírions; domínio CA direciona a multimerização de Gag durante o processo de montagem dos vírions; NC recruta o RNA viral genômico para os vírions e facilita o processo de formação da montagem; e o domínio p6 recruta o aparato necessário para catalisar o processo de fissão da membrana celular para completar o processo de brotamento da progênie viral (GOTTLINGER, 2001; FREED et al., 2015).

Quanto aos produtos codificados pelo gene *pol*, a protease viral (PR) tem papel fundamental no processo de maturação dos vírions após o processo de brotamento e liberação da progênie viral. Após a ação da protease viral sobre a Gag p55 e sobre a GagPol p160, mudanças estruturais são observadas nas partículas virais e ocorre o processo de maturação viral. O mecanismo exato de ativação da protease viral não é totalmente conhecido, porém sabe-se que sua liberação da poliproteína GagPol ocorre por autoprocessamento (FUN et al., 2012). A proteína p51 – transcriptase reversa (RT) e a p32 – integrase (IN), ambas codificadas também pelo gene *pol* têm como funções promover a transcrição do RNA viral do HIV em DNA proviral e integrar esse no genoma celular, respectivamente.

Quanto aos genes reguladores, *rev* (*regulator of expression of viral proteins*) codifica a proteína Rev que atua no processamento (remoção de íntrons e junção dos éxons) do mRNA viral e regula o transporte dos mRNAs não processados (Gag/Pol) e parcialmente processados (Vif, Vpr, Vpu e Env) para a tradução no citoplasma. Na ausência de Rev ou na presença de mutações gênicas deletérias, a replicação viral torna-se incompetente. O gene *tat*, codifica a p14, proteína nuclear, que ativa a transcrição de genes provirais do HIV, sendo uma proteína indispensável

para o ciclo viral. No que se refere aos genes acessórios, o gene *nef* (*negative regulating factor*) codifica a p27, que influencia na replicação e infectividade das partículas virais, por inibir a expressão (regulação negativa) de moléculas de superfície, como CD4, CD8 e moléculas HLA (*human leukocyte antigen*). O gene *vpu* (*virus protein unique*) codifica a p16, proteína que se mantém ancorada na membrana plasmática celular que tem importante papel na liberação da progênie viral por antagonizar o efeito da proteína teterina além de controlar a degradação da molécula CD4 no retículo endoplasmático. O gene *vpr* (*virus protein r*) codifica a p15 (proteína “R”), que é incorporada em altas concentrações nas partículas virais e tem efeito sobre o ciclo celular e a infectividade viral. O fator de infectividade viral (gene *vif*) codifica a p23, proteína citoplasmática, que promove a infectividade das partículas virais por antagonizar o efeito antiviral da APOBEC3G por induzir a degradação dessa proteína. Na ausência de *vif*, as partículas virais são defectivas (FREED; MARTIN, 2013).

Até o momento, foram descritas pelo menos 34 interações físicas e 16 associações funcionais entre as proteínas do HIV-1 durante o ciclo viral, promovendo eficiência na replicação e infectividade das partículas virais (LI; CLERCQ, 2016).

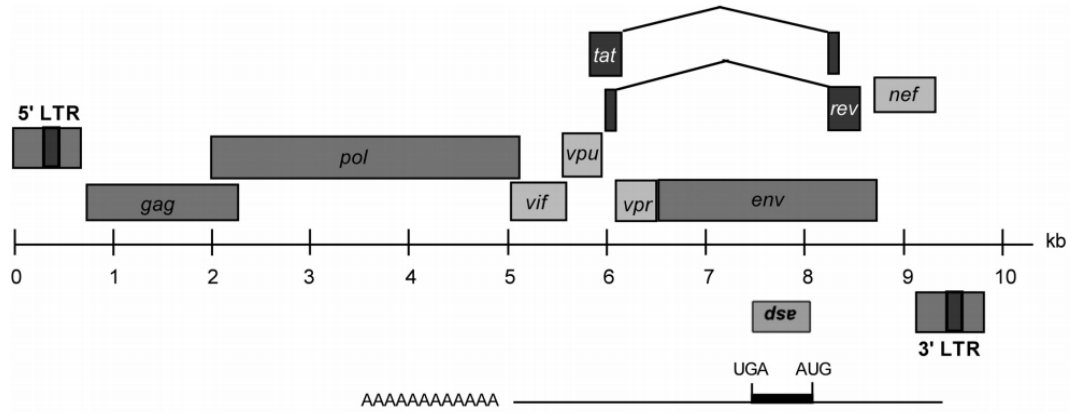
2.4.1.1 O gene *asp* do HIV-1

Em 1988 o estudo de Miller e colaboradores sugeriu a presença de uma fase de leitura aberta - ORF (*open reading frame*) na fita complementar ao gene *env* que codificaria uma proteína de cerca de 179 aminoácidos denominada de proteína antisenso do HIV-1 (HIV-1 *antisense protein* – ASP), codificada pelo respectivo gene *asp*. Por muito tempo a existência dessa proteína foi questionada, porém estudos atuais têm demonstrado a presença e atividade dessa proteína ASP em processos de autofagia e replicação do HIV-1, sendo que a ORF1 do gene *asp* parece ser altamente conservada entre os diferentes isolados virais e poderia estar relacionada com a dispersão do grupo M (CASSAN et al., 2016). A proteína ASP estaria associada com autofagossomos e indução da autofagia o que consequentemente poderia modular positivamente a replicação do HIV-1 em macrófagos, sendo que a proteína Nef bloquearia a degradação de proteínas virais e vírions (TORRESILLA;

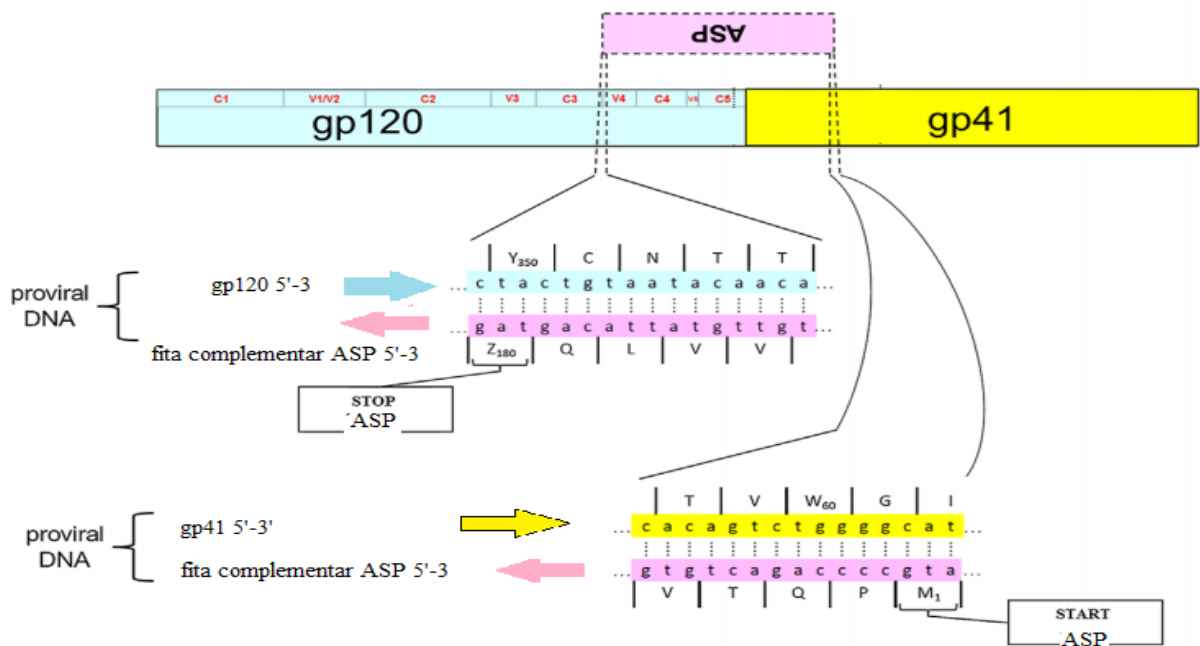
MESNARD; BARBEAU, 2015). A FIGURA 13 mostra a posição esquemática do gene *asp* no mapa genético do HIV-1.

FIGURA 13 - MAPA GENÉTICO DO HIV-1 E POSIÇÃO GENE *asp*

A



B



. FONTE: adaptado de Torresilla; Mesnard, Barbeau (2015) e Dimonte (2017).
 LEGENDA: A-Posicionamento do gene *asp* no mapa genético do HIV-1, conforme coordenadas na sequência referência HXB2 (K03455); B- Representação esquemática que mostra região inicial e final da proteína ASP.

2.4.2 Tropismo e replicação do HIV-1

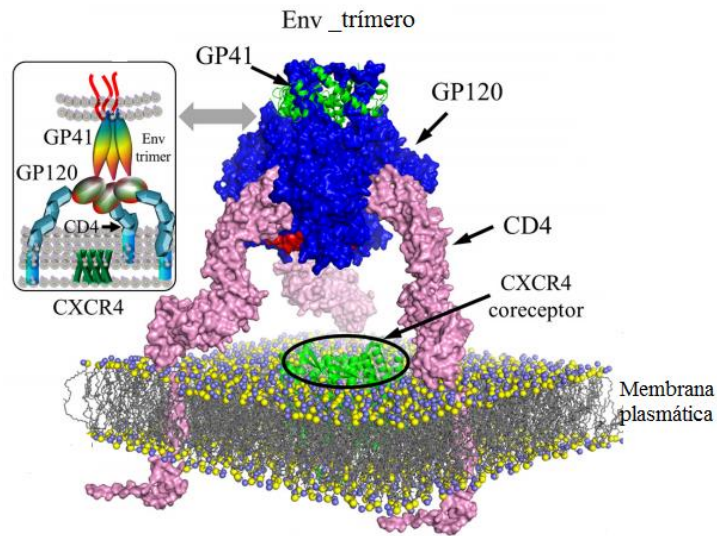
No indivíduo infectado, os principais alvos celulares das partículas virais do HIV-1 são as células que expressam na sua superfície a molécula CD4 (*cluster of differentiation 4*), como linfócitos e macrófagos. Na superfície da partícula do HIV, a gp120 e a gp41 interagem fisicamente para formar as projeções triméricas de Env, via ligações não-covalentes. O evento da entrada do vírus na célula alvo ocorre cerca de 1 a 3 horas após a exposição das células ao HIV (HOLMES et al., 2015). O primeiro passo da infecção viral envolve interação entre os trómeros de gp120 (mais precisamente os domínios C3 e C4) e o receptor CD4, o que induz alterações estruturais na gp120, promovendo a exposição e ligação da região da alça V3_{gp120} com um correceptor celular específico, principalmente o correceptor de quimiocina motivo CC tipo 5 (CCR5) ou CXC tipo 4 (CXCR4), que determina o tropismo viral.

O uso do correceptor CCR5, tem sido usado para classificar os vírus como R5 ou M-trópicos, hábeis para replicar em macrófagos derivados de monócitos (MDMs). Esses vírus que apresentam um fenótipo de replicação um pouco mais lento, não-formadores de sincícios, estariam associados a uma fase mais inicial da infecção pelo HIV-1. Já o tropismo viral pelo correceptor CXCR4, (vírus X4) designa os vírus como T-trópicos, formadores de sincícios, apresentam um fenótipo de replicação em linhagens de células T CD4+ *naive* ou de memória, com alta taxa replicativa, maior citopatogenicidade e estariam associados a uma fase mais tardia e sintomática da infecção pelo HIV-1 (BRUMME et al., 2005; MOYLE et al., 2005). O estudo de Dimonte (2017) avaliou várias sequências do gene *env* do HIV-1 subtipo B depositadas no *GenBank* e sugere a presença de mutações específicas no gene *asp* associadas com assinaturas típicas na região V3_{gp120} relacionadas aos vírus R5 ou X4, mas pondera que mais estudos precisam ser realizados para confirmar o quanto essas mutações em *asp* contribuem direta ou indiretamente no tropismo viral.

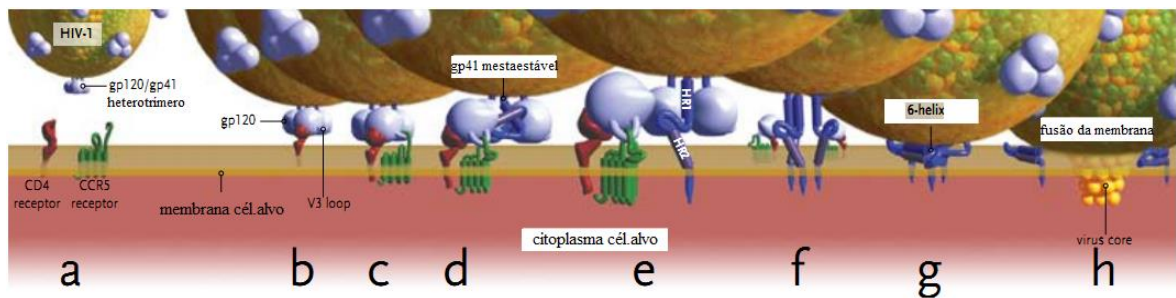
Após a interação da gp120 com o respectivo correceptor, ocorrem alterações conformacionais na gp41, expondo o domínio de fusão, composto pelas regiões HR1 e HR2 (*heptad repeat*) e peptídeo de fusão (região hidrofóbica na porção N-terminal da gp41) que se rearranjam e permitem maior aproximação com a membrana da célula alvo e fusão (ECKERT; KIM, 2001; FREED; MARTIN, 2013) (FIGURA 14).

FIGURA 14 - LIGAÇÃO DO HIV-1 COM CÉLULA ALVO

A



B



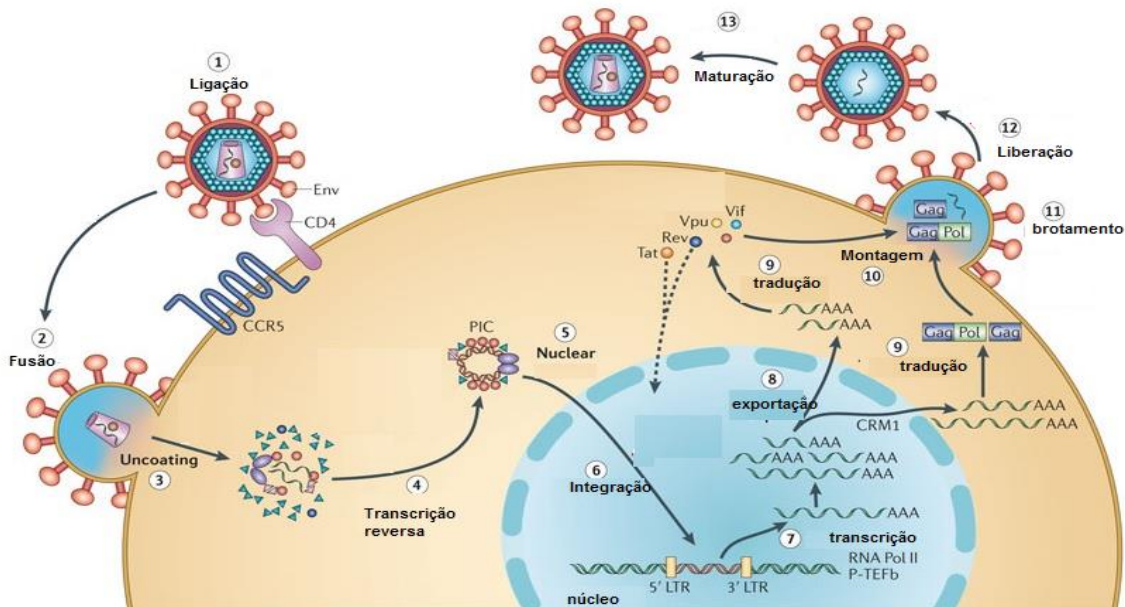
FONTE: Adaptado de Tsibris (2007) e Li e Clercq (2016)

LEGENDA: A - Visão tridimensional da ligação entre receptor e coreceptor da célula alvo com a gp120 e gp41 do HIV-1. B- Fases da interação do HIV-1 com a célula alvo; a: Presença do receptor CD4, coreceptor CCR5 e trimeros de gp 120/gp41 são requeridos para a entrada do HIV-1 na célula alvo; b e c: Após ligação inicial da gp120 com receptor CD4, ocorrem mudanças conformacionais com exposição da alça V3_{gp120} (*V3 loop*) e ligação com o coreceptor; d-h: alterações na gp41 propiciam a aproximação e fusão das membranas.

Após a entrada na célula, inicia-se o processo de descapsidação da partícula viral, sendo que partículas parcialmente descapsidadas liberam o complexo de transcrição reversa, composto pelo RNA viral, RT, CA, NC, IN e Vpr. Inicia-se o processo de transcrição do RNA, pela ação da enzima RT e a migração desses transcritos para o núcleo, onde o DNA proviral é incorporado ao genoma celular pela ação da HIV-integrase, originando o provírus. Esse estado pode ser mantido de forma latente, porém em células ativadas, o DNA proviral serve como molde para ação da enzima RNA polimerase II para síntese do RNA viral. Ações coordenadas entre proteínas virais como Tat e o aparato celular de transativação transcrricional

resulta em alta produção de mRNA viral. Esses transcritos virais são transportados e exportados ao citoplasma, mediados pela proteína Rev. A tradução do precursor Env gp160 ocorre no retículo endoplasmático onde posteriormente sofre ação proteolítica de enzimas celulares e resulta na forma madura de Env nas subunidades gp120 e gp41. A tradução de Gag e Gag-Pol ocorre em ribossomos livres na célula, e assim, independentemente, as proteínas virais são transportadas para a membrana plasmática. Gag e a poliproteína Gag-Pol, em associação com dímeros de RNA viral genômico se condensam na membrana plasmática dando origem a partícula viral imatura, juntamente com as proteínas do envelope. Por brotamento, ocorre a liberação das partículas virais imaturas, que durante esse processo ou imediatamente após a liberação, por ação da enzima HIV-protease sobre a poliproteína Gag-Pol gera o característico aspecto cônico do capsídeo viral, passando para estado de vírions potencialmente infectivos (FREED; MARTIN, 2013) (FIGURA 15). Todo o processo e etapas de formação de novos vírions é completado em cerca de 24 horas, dependendo do tipo celular (MOHAMMADI et al., 2013).

FIGURA 15 - ETAPAS DA REPLICAÇÃO VIRAL HIV



FONTE: Adaptado de Engelman e Cherepanov (2012).

LEGENDA: Etapas da replicação viral - 1: Ligação da partícula do HIV-1 com receptor celular CD4 e com o correceptor CCR5; 2: Fusão e entrada da partícula viral na célula alvo; 3: Processo de descapsidação; 4: Processo de transcrição reversa do material genômico viral, formando o complexo de pré-integração; 5 e 6: Importação para o núcleo celular e integração do genoma proviral; 7: Transcrição do genoma proviral; 8: Exportação dos mRNAs para o citoplasma; 9: Tradução dos mRNAs para produção das proteínas virais; 10: Incorporação do RNA viral e proteínas na partícula viral; 11 e 12: Brotamento e liberação da partícula viral; 13: Maturação da partícula viral por ação da enzima protease.

2.5 TRANSMISSÃO, PATOGÊNESE DA INFECÇÃO PELO HIV-1 E EVOLUÇÃO PARA AIDS

A transmissão do HIV-1 resulta da exposição ao vírus em superfícies mucosas ou inoculações percutâneas, tendo assim risco para infecção a via sexual, a via materno-infantil e a parenteral. O maior risco de contaminação se dá por meio da transfusão com sangue contaminado (95 em 100), o que atualmente é bastante raro, visto as rotinas de controle na transfusão sanguínea (LUZURIAGA; MOFENSON, 2016) A transmissão do HIV-1 de mãe para a criança pode ocorrer durante a gestação, parto ou amamentação, sendo a carga viral materna o principal preditor de risco para a infecção (LUZURIAGA; MOFENSON, 2016). A taxa de transmissão do HIV-1 é dependente não só da quantidade viral do inóculo, mas também de mecanismos locais de defesa da mucosa, que podem modular a infecção, facilitando ou inibindo a infecção. Outros fatores que podem amplificar o risco de transmissão do HIV-1 incluem coinfeções com tuberculose, malária e doenças sexualmente transmissíveis (KURITZKES; KOUP, 2013).

O curso da infecção pelo HIV-1 é variável entre as pessoas infectadas, mas pode ser classificada em 4 estágios: infecção primária ou aguda, assintomática ou latente, sintomática inicial e aids.

A descrição a seguir é baseada, na sua grande maioria, em estudos conduzidos na população adulta. Um a dois dias após a infecção o HIV-1 pode ser detectado em tecido linfático, em 5-6 dias em linfonodos, e após 10-14 dias pode estar amplamente disseminado pelo organismo, inclusive no sistema nervoso, ressaltando que a taxa de disseminação do HIV-1 pode ser variável dependendo das primeiras células alvo infectadas (*German Advisory Committee Blood*, 2016).

Avaliando a fase primária ou aguda da infecção pelo HIV-1, nos primeiros dias pós infecção (aproximadamente 10 dias) ocorre a fase denominada eclipse, período entre a infecção pela primeira célula alvo e o aparecimento do RNA viral no plasma. Durante essa fase assintomática, ocorre propagação viral em células T CD4+ da mucosa, submucosa, e em menor proporção em tecidos linfoides sistêmicos e tecido linfoide associado ao intestino (*gut-associated lymphoid tissue-GALT*) (HAASE, 2010; PERREAU; LEVY; PANTANELO, 2013). Após o aparecimento do RNA viral no plasma ocorre aumento exponencial da carga viral, devido à alta taxa replicativa em GALT e tecido linfoide periférico, atingindo um pico

de replicação viral que decresce até atingir a manutenção da carga viral em determinado valor (*set point* viral) característico de cada infecção. Estudos indicam que eventos que ocorrem precocemente na fase aguda, durante a expansão viral antes do nível máximo de replicação, são importantes para definição dos reservatórios virais, do padrão de replicação viral que a infecção vai apresentar e do perfil de ativação imune (HAASE, 2010; RIBEIRO et al., 2010).

No pico da viremia ocorre depleção massiva de células T CD4+ da mucosa, ocasionando uma fase sintomática transitória em 50-70% dos casos, característica da fase aguda da infecção pelo HIV-1. Esses sintomas inespecíficos, que iniciam aproximadamente 15 dias após a infecção, podem incluir febre, faringite, cefaleia, mialgia, perda de peso, *rash* maculopapular não pruriginoso, linfadenopatia, meningoencefalite linfocitária, sendo que, na grande maioria dos casos ocorre resolução desses sintomas em 3-4 semanas após a infecção. A maioria das células T CD4+ da mucosa intestinal que são depletadas durante essa fase aguda da infecção são células Th17, que são essenciais para a integridade da barreira da mucosa, sendo que sua depleção leva a perda da integridade epitelial, propiciando a translocação microbiana para o sistema circulatório. Esses produtos translocados atuam na ativação imune sistêmica (KURITZKES; KOUP, 2013).

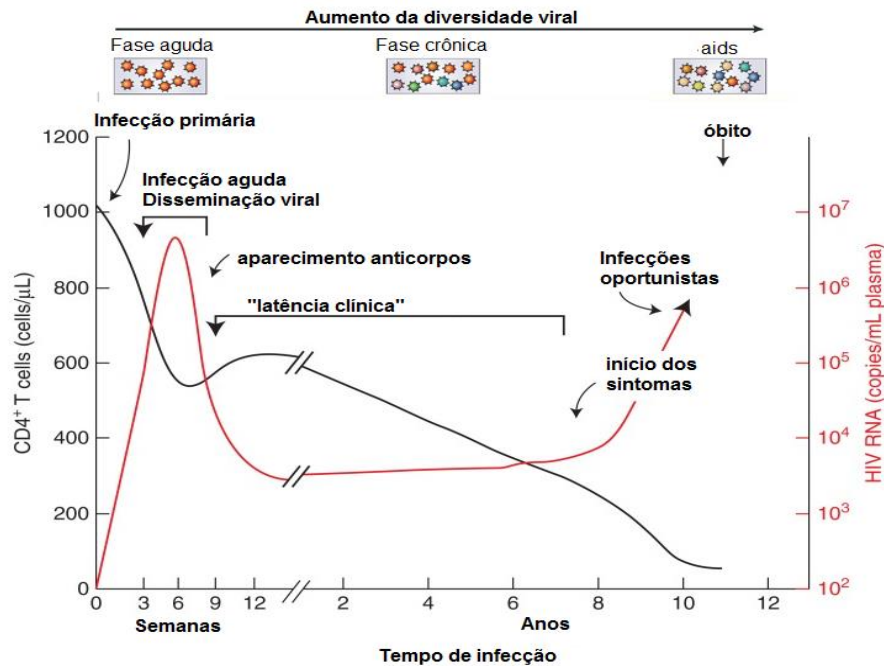
Ao passo que a viremia aumenta, também se elevam as dosagens plasmáticas de algumas citocinas e quimiocinas, como interleucina 15 (IL-15), interferon alfa (IFN α) e CXCL-10 (IP-10) que aumentam rapidamente, porém de forma transitória. Outras como IL-18, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-22 se mantêm altas. Algumas dessas citocinas, como a IFN α , têm ação antiviral direta inibindo a replicação viral, outras atuam aumentando as respostas imune inata e adaptativa e podem promover a replicação viral e mediar a imunopatologia dessa infecção, promovendo um estado de ativação imune crônica. A resposta imune celular pelos linfócitos T CD8+ tem papel importante para a modulação e manutenção do perfil de replicação viral, sendo que a presença de determinados alelos *HLA-B* como o *HLA-B*27*, *HLA-B*57:01*, *HLA-B*57:03* ou *HLA-B*58:01* contribuem para um reconhecimento mais robusto de determinados epítopos virais conservados, com conseqüente resposta celular mais eficaz (McMICHEL et al., 2010).

Após o estabelecimento do perfil de replicação viral quase que “estacionário” (*quasi-steady state*), a infecção pelo HIV-1 apresenta um período assintomático, que

pode ser variável em duração, dependendo de características tanto virais como do hospedeiro. Geralmente ocorre uma depleção gradual de células T CD4+ (30-60 cels/mL/ano), porém a evolução pode apresentar um rápido declínio na contagem após um longo período de estabilidade. Durante essa fase crônica da infecção, vários eventos clínicos sistêmicos podem se apresentar, como manifestações neurológicas, leucoplasia pilosa, candidíase oral e vaginal, herpes zoster e podem ser sinais precoces de progressão para aids. Complicações não definidoras de aids, que normalmente estariam relacionadas com o aumento da idade, podem se apresentar nos indivíduos infectados pelo fato da infecção acelerar esses processos, incluindo aumento do risco de doenças cardiovasculares, disfunções neurológicas, doenças malignas não relacionadas à aids, perda da densidade mineral óssea. Na evolução da infecção, com a queda na contagem de células T CD4+ por evolução natural da doença, na ausência de tratamento ou falha terapêutica, e consequente perda da competência imune, pode ocorrer o aparecimento de infecções oportunistas (pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, encefalite por toxoplasma, meningite por criptococos, infecção disseminada pelo complexo *Mycobacterium avium*, reativação de citomegalovírus) e neoplasias (sarcoma de Kaposi, linfoma não-Hodgkin, neoplasias intraepiteliais cervicais) que definem a progressão da infecção para a aids (KURITZKES; KOUP, 2013). A FIGURA 16 apresenta o curso natural da infecção pelo HIV-1 em adultos.

A evolução da infecção em pacientes pediátricos é bastante distinta do adulto, com possibilidade de evolução rápida da doença. Na ausência de TARV pode ocorrer a evolução para aids no período de um a dois anos após a infecção e chegar a 60% de mortalidade até os dois anos e meio de vida, ou pode ocorrer uma progressão intermediária ou lenta para aids, mesmo na presença de alta carga viral (GOETGHEBUER et al., 2009; MUENCHHOFF et al., 2016).

FIGURA 16 - CURSO NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1 EM ADULTOS



FONTE: Adaptado de Coffin e Swanstrom (2013).

2.5.1 Resposta imune e perfil de ativação imune crônica na infecção pelo HIV-1

O início da resposta imune contra o HIV-1 envolve o sistema imune inato e a ativação de células dendríticas, resultando em alta produção de várias citocinas, como interferon alfa ($IFN\alpha$), interleucina-12 ($IL-12$), fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e interleucina 6 ($IL-6$) os quais atuam na ativação no sistema imune. Células *natural killer* (NK) também são essenciais na resposta da imunidade inata na infecção pelo HIV-1 e atuam no declínio da viremia durante a infecção aguda. As células dendríticas podem ser infectadas pelo HIV-1 e serem estimuladas a secretarem altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias e não desempenharem com eficiência o papel de células apresentadoras de antígenos, contribuindo para o estado de ativação imune crônica (IMRAN et al., 2016).

Os linfócitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocytes* – CTLs) são na maioria células T $CD8+$ efetoras e são essenciais na resposta imune adaptativa na infecção pelo HIV-1, por reconhecerem antígenos virais apresentadas por moléculas HLA na superfície de células infectadas. O reconhecimento desses antígenos virais (peptídeos com 8-10 aminoácidos) direciona os efeitos líticos pelos CTL. De acordo

com a cinética da produção viral, de como ocorre a apresentação de peptídeos por meio das moléculas HLA, do reconhecimento efetivo pelas células T CD8+ e do estado de ativação dessas células, a resposta por CTL pode ser altamente eficaz no controle da progênie viral. A exposição antigênica contínua que ocorre na infecção pelo HIV-1 pode levar ao esgotamento dessas células T CD8+, quer seja por perda do repertório de células de memória ou por regulação positiva da expressão de moléculas coregulatórias que podem afetar adversamente a função e longevidade dessas células, bem com de células T CD4+ (KURITZKES; KOUP, 2013, IMRAN et al., 2016).

A infecção pelo HIV-1 leva a produção de um amplo repertório de anticorpos com potencial neutralizante, porém essa ação específica dos anticorpos não é muito eficaz pela ocorrência de variantes de escape, com a ocorrência de mutações em epítomos virais específicos, sendo que a produção dessas variantes é muito maior que a produção de anticorpos neutralizadores. A presença de alta glicosilação da gp120 também atua para mascarar os principais epítomos da ação da resposta imune adaptativa, além da exposição apenas transitória da gp41 somente no momento da fusão viral com a célula alvo (KURITZKES; KOUP, 2013; IMRAN et al., 2016).

A depleção progressiva de células T CD4+ decorrentes de sua destruição direta ou redução na sua produção é marcante na progressão da infecção pelo HIV-1. A diminuição massiva de células T CD4+ ativadas do trato gastrointestinal, principalmente as células Th17, com início já na fase aguda da infecção, juntamente com processos de apoptose de enterócitos promovem aumento da permeabilidade gastrointestinal e ocasionam aumento das concentrações plasmáticas de produtos microbianos como lipopolissacarídeos (LPS). O LPS se liga ao CD14 solúvel (marcador de ativação de monócitos - sCD14) ou de membrana, que culmina com ativação do fator de transcrição nuclear kappa-B (NFκB) e com a produção de citocinas pró-inflamatórias que contribuem para o estado de ativação imune persistente visto na infecção crônica pelo HIV-1 e na progressão para aids (MILLER et al., 2005; DOUEK; ROEDERER; KOUP, 2009). Os marcadores plasmáticos de translocação microbiana, como o LPS e sCD14, contribuem diretamente para a patogênese da infecção, por estimularem continuamente células da imunidade inata e têm sido usados como preditores da evolução da infecção ou de mortalidade em PVHA, mesmo naqueles indivíduos com carga viral indetectável (BRENCHLEY et al.,

2006; DOUEK; ROEDERER; KOUP, 2009; SANDLER et al., 2011; KLATT et al., 2013). O estado de ativação imune crônica também ocasiona imunossenescência nos indivíduos infectados pelo HIV-1, levando ao aparecimento de complicações como dislipidemias, doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, alterações ósseas, infecções e cânceres não relacionados à aids que aparecem precocemente nesta população, devido a manutenção do *status* inflamatório mesmo na vigência de supressão viral (NASI et al., 2017).

Assim o estado de ativação imune persistente visto na infecção pelo HIV-1 pode ser diretamente influenciado pela replicação viral ativa, ou mesmo nas condições de supressão viral em vigência da TARV, ser decorrente da manutenção da replicação em baixos níveis nos reservatórios celulares (tecido gastrointestinal, tecido linfóide, sistema nervoso central) que são mantidos mesmo com um tratamento antiviral adequado. Outra explicação para a manutenção da translocação microbiana e constante ativação imune poderia ser decorrente de coinfeções virais, do envelhecimento ou da depleção de células T regulatórias (T_{reg}) (KLATT et al., 2013; NASI et al., 2017).

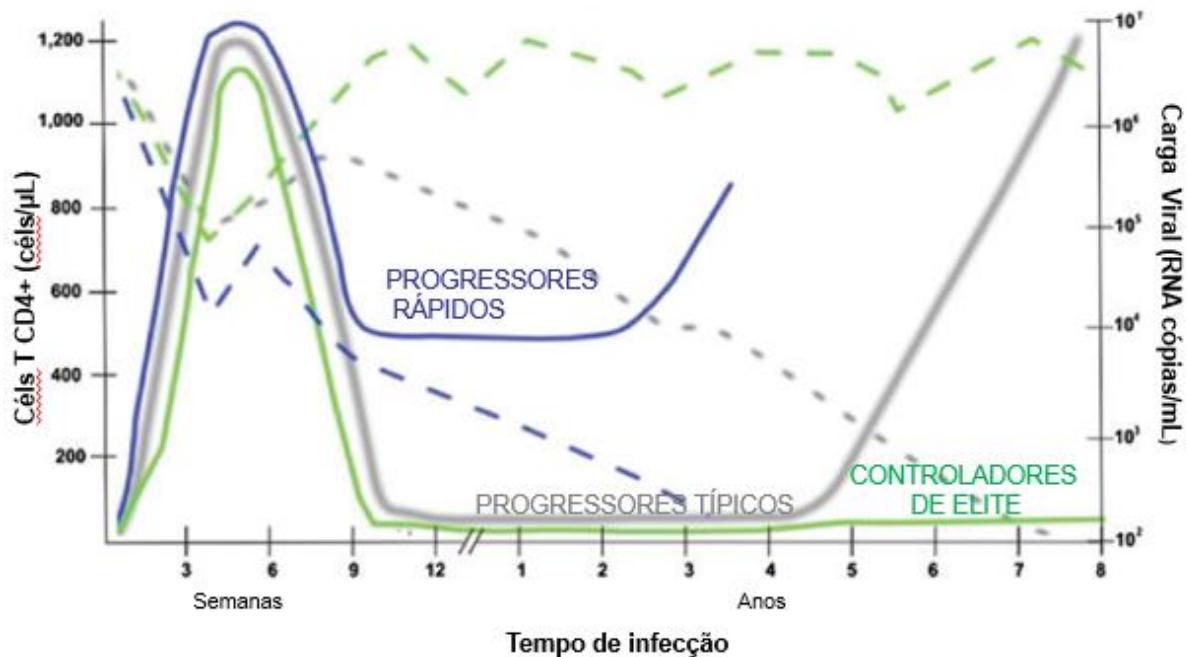
O estabelecimento dos reservatórios virais latentes do HIV-1, que se mantêm sem replicação viral, se dá durante a fase aguda da infecção e são constituídos por células T CD4+ não ativadas do sangue periférico e intestinais, além de monócitos, macrófagos e astrócitos. Os fatores que restringem a transcrição e permitem esse estado latente do provírus integrado nas células T CD4+ não ativadas inclui uma localização subnuclear do provírus, ausência de fatores transcripcionais, presença de repressores de transcrição e baixas concentrações da proteína Tat. Essas células ainda podem sofrer estímulos de proliferação homeostática, por ação da interleucina 7 (IL-7), o que pode influenciar na duração da meia-vida dessas células e persistência. Muitas pesquisas atualmente têm foco na busca de estratégias terapêuticas que visam a cura funcional e a cura esterilizante da infecção pelo HIV-1, por meio de intensificação da TARV, adequação da resposta imune e reversão da latência viral (MAARTENS; CELUM, LEWIN, 2014).

2.6 OS DIFERENTES PERFIS DE PROGRESSÃO NA INFECÇÃO PELO HIV-1

O curso natural da infecção pelo HIV-1, na ausência de terapia antirretroviral, permite a classificação dos indivíduos infectados em diferentes

grupos, de acordo com o padrão da evolução para a aids: a) progressores típicos; b) progressores rápidos, c) não progressores por longo tempo (do inglês *Long-Term Non-Progressors* - LTNPs), que podem incluir os indivíduos controladores de elite e controladores de viremia, dependendo dos critérios de classificação usados nos diferentes estudos, ou esses serem tratados como grupos distintos (FIGURA 17).

FIGURA 17 - EVOLUÇÃO NATURAL DA INFECÇÃO PELO HIV-1, EM ADULTOS



FONTE: adaptado de Poropatich et al (2010).

NOTA: Linhas pontilhadas e linhas cheias indicam, respectivamente, a contagem de células T CD4+ e carga viral ao longo do tempo nos três grupos indicados: em azul progressores rápidos; em cinza progressores típicos e em verde indivíduos LTNP controladores de elite

Em adultos, o grupo de indivíduos denominados progressores típicos evoluem para imunodeficiência severa num período médio de 8 anos após a infecção pelo HIV-1, representando cerca de 50 a 70% dos casos, nesse cenário de evolução natural. Nesse mesmo contexto, o grupo classificado como progressores rápidos, que representa aproximadamente 5-15% dos casos, apresenta uma evolução bastante precoce para aids, cerca de 2 - 3 anos após a infecção inicial. Essa evolução bastante rápida para aids tem sido associada em diversos estudos principalmente com HIV-1 subtipo D, que utiliza preferencialmente o correceptor CXCR4 nos estágios iniciais da infecção, explicando o rápido declínio das células T CD4+ e a progressão acelerada da doença (TSCHERNING et al., 1998; KALEEBU et al., 2007; LEITE et al., 2017).

Mais diferenciado ainda é o grupo denominado LTNP (1 a 5% do total de casos) que apresenta uma progressão bastante lenta para aids, permanecendo os indivíduos infectados pelo HIV-1 assintomáticos por mais de 10 anos. Esses grupos de indivíduos LTNP apresentam critérios de inclusão diferenciados de acordo com grupos de pesquisa distintos (SABIN; LUNDGREN, 2013). A proposta sumarizada no estudo de Casado e colaboradores (2010) classifica o grupo LTNP como sendo composto por indivíduos que apresentam no mínimo 10 anos de infecção pelo HIV-1, assintomáticos, com manutenção da contagem de células T CD4+ acima de 500 cels/uL, sem uso e indicação de TARV e subdivide esses indivíduos em: a) controladores de elite (*elite controllers* – EC) com carga viral indetectável na grande maioria das mensurações); b) controladores de viremia (*viremic controllers* – VC), com carga viral de até 2000 cópias de RNA/mL na maioria das mensurações) e não controladores de viremia, também chamados de não-progressores virêmicos (*viremic nonprogressors* - VNP), com carga viral variável.

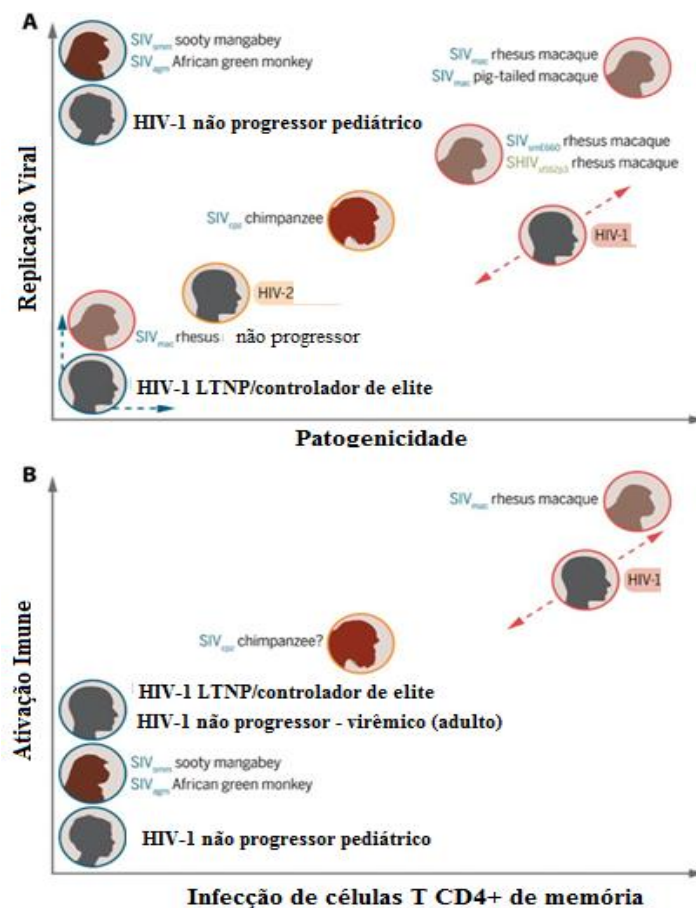
O *French HIV controller group* define como controladores de elite indivíduos com carga viral abaixo do limite de detecção em mais de 90% das mensurações, num período superior a 10 anos de infecção (LAMBOTTE et al., 2005). Já outros estudos reportam o perfil de controladores de elite ou controladores de viremia por períodos variáveis de tempo (superiores a 1 ano de infecção) em razão do controle da carga viral, assumindo a possibilidade de até variação na contagem de células T CD4+ (OKULICZ et al., 2009; SAJADI et al., 2009; SABIN; LUNDGREN, 2013). Independentemente das diferentes classificações, todos estes indivíduos apresentam uma evolução bastante diferenciada na progressão da infecção pelo HIV-1, sendo consenso que tanto fatores virais como fatores intrínsecos do hospedeiro parecem estar associadas com essa condição diferenciada na evolução padrão da infecção e controle da infecção viral.

Altos títulos de anticorpos com atividade neutralizante têm sido descritos em coortes de indivíduos LTNP, bem como uma resposta imune celular mais eficaz (PERREAU; LEVY; PANTALEO, 2013). Alguns alelos *HLA-B*, bem como a expressão e dosagens plasmáticas de fatores celulares antivirais como APOBEC3G, SAMDH1, TRIM5 α , BST-2 e de determinadas quimiocinas, além da presença de heterozigose para a deleção de 32 pares de base no gene *CCR5*, são alguns dos fatores do hospedeiro identificados em grupos de indivíduos LTNP. Deleções ou mutações deletérias no genoma viral presente nesses indivíduos também tem sido

associada ao perfil diferenciado de progressão (LIFSON et al., 1991; SANDONIS et al., 2009; CASADO et al., 2010; CASADO et al., 2013).

Nesse mesmo contexto de evolução natural da infecção pelo HIV-1, os mecanismos que contribuem para a progressão mais lenta para aids em pacientes pediátricos (*pediatric nonprogressors* - PNPs) não são claramente conhecidos. Os estudos mostram que possivelmente não são os mesmos mecanismos presentes na infecção em adultos, sendo que a presença de alelos *HLA-B* protetivos parecem não influenciar no perfil de progressão dessas crianças (ADLAND et al., 2015). Esse grupo de indivíduos PNP apresenta altas contagens de células T CD4+, menor ativação do sistema imune, e alta viremia por tempo prolongado (SSEWANYANA et al., 2007; ANANWORANICH et al., 2010) (FIGURA 18).

FIGURA 18 - REPLICAÇÃO VIRAL E ATIVAÇÃO IMUNE EM HIV E SIV



FONTE: Adaptado de Chahroudi e Silvestri (2016).

LEGENDA: A: Relação entre replicação viral e patogenicidade em grupos infectados pelo HIV e SIV- hospedeiros naturais (*sooty mangabey* e macaco verde africano) e não naturais (macaco *rhesus* e *pig-tailed macaque*). B – Relação entre ativação imune e infecção de células T CD4+ de memória em HIV-1 e SIV- hospedeiros naturais (*sooty mangabey* e macaco verde africano) e não naturais (macaco *rhesus*).

O estudo de Muenchhoff e colaboradores (2016), avaliou um grupo 170 crianças PNP maiores de 5 anos de idade provenientes do sul da África, infectadas pelo HIV-1 subtipo C por transmissão materna. Esses indivíduos apresentavam contagem de células T CD4+ >750 cels/ μ L, com um perfil de replicação viral de 20-30 mil cópias RNA/mL e não apresentavam os critérios para início de TARV, com a maioria dessas crianças em acompanhamento desde o nascimento. Nesse estudo os pesquisadores constataram que essas crianças apresentaram alta viremia com menor ativação imune e baixa expressão de CCR5 em células T CD4+ de memória, dessa forma mostrando preservação dessa linhagem celular. Além disso, apresentavam uma geração específica de anticorpos neutralizantes que diferem dos que são produzidos nas infecções em adultos, sugerindo algumas similaridades com os mecanismos não patogênicos observados em infecções por SIV em seus hospedeiros naturais, como *sooty mangabey* (*Cercocebus atys*) e o macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

2.6.1 Fatores virais relacionados com controle do HIV-1

Estudos têm avaliado a ocorrência de mutações e deleções importantes de determinados genes virais em indivíduos LTNP, que podem estar associadas a uma diminuição da aptidão replicativa viral e consequente progressão mais lenta para aids (LIFSON et al., 1991; CASADO et al., 2010; CASADO et al., 2013). Outros estudos têm demonstrado que eventos que ocorrem durante a fase aguda da infecção pelo HIV-1 podem influenciar no estabelecimento do perfil de replicação viral e no perfil de ativação imune do indivíduo contribuindo para os diferentes padrões de progressão da infecção, inclusive se a infecção ocorrer com linhagens virais defectivas (HAASE et al., 2010; MIURA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010). Na fase crônica da infecção, outros fatores como a presença de determinados alelos *HLA-B* estariam em parte contribuindo para a ocorrência de mutações de escape viral originando linhagens com menor aptidão (MIURA et al., 2010). O estudo descrito por Sandonis e colaboradores (2009), mostrou a ocorrência de linhagens virais defectivas com grandes deleções na região 5'LTR-*gag* e na região do gene *pol*, além de mutações em *nef*, que podem ser favoráveis ao controle da replicação viral em indivíduos do grupo LTNP. Outro estudo que avaliou o polimorfismo da proteína viral Vpr do HIV-1 em indivíduos LTNP e progressores rápidos, indicou que

variantes nesse gene podem contribuir para diferenças na progressão da infecção viral (HADI et al., 2014). Já no estudo de Casado e colaboradores (2013), foi identificado um grupo de indivíduos LTNP infectados com vírus pouco replicativos, que apresentavam variadas combinações de fatores protetivos do hospedeiro, mas que compartilhavam mutações específicas no gene *env* indicando a importância do fator viral no controle replicativo nesses indivíduos. Uma limitação da maioria desses estudos é o fato de serem restritos ao HIV-1 subtipo B. O estudo conduzido por Paolucci e colaboradores (2011) encontrou a presença de linhagens virais defectivas, em um paciente LTNP clado CRF02-AG, com múltiplos códons de parada no gene da transcriptase reversa, representando na evolução do acompanhamento quase que 100% da progênie viral desse indivíduo.

O estudo de Nonnemacher e colaboradores (2016), associou a presença de polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism* – SNP) na região LTR do genoma do HIV-1 (vSNP) posição A108G, (local de ligação de fatores de transcrição celular) com evolução para aids. Esse estudo também considerou apenas indivíduos infectados com o subtipo B do HIV-1.

Fatores associados aos potenciais sítios de N-glicosilação da proteína Env do HIV-1 também podem contribuir para diferenças na progressão para aids. A proteína Env do HIV-1 é densamente glicosilada a partir da maquinaria de glicosilação celular. A glicosilação tem início no retículo endoplasmático pela adição de $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ para a asparagina de motivos asparagina-X-serina/treonina (NXS/T), sendo que o X representa qualquer aminoácido, menos a prolina. Na sequência ocorrem alterações na molécula com a formação de estruturas de glicanos diferenciadas das glicosilações celulares. A gp120 apresenta cerca de 25 potenciais sítios de N-glicosilação, chegando a 30 sítios dependendo do isolado viral, e a gp41 apresenta em média 4 sítios (WANG et al., 2013; DOORES et al., 2015). Essa formação e a alta densidade de glicanos formam um “escudo” de proteção contra anticorpos neutralizadores durante a infecção, por mascarar epítomos conservados de Env, possibilitando a evasão viral do sistema imune (WEI et al., 2003; BEHRENS et al., 2016). A presença de mutações em determinados sítios de N-glicosilação altamente conservados entre os diferentes clados virais, como mutação no sítio N262 que ocasiona desestruturação do agrupamento de glicanos podem resultar em vírus menos infectivos (FRANÇOIS; BALZARINI, 2011; WANG et al., 2013). O estudo de Townsley e colaboradores (2015) mostrou que a

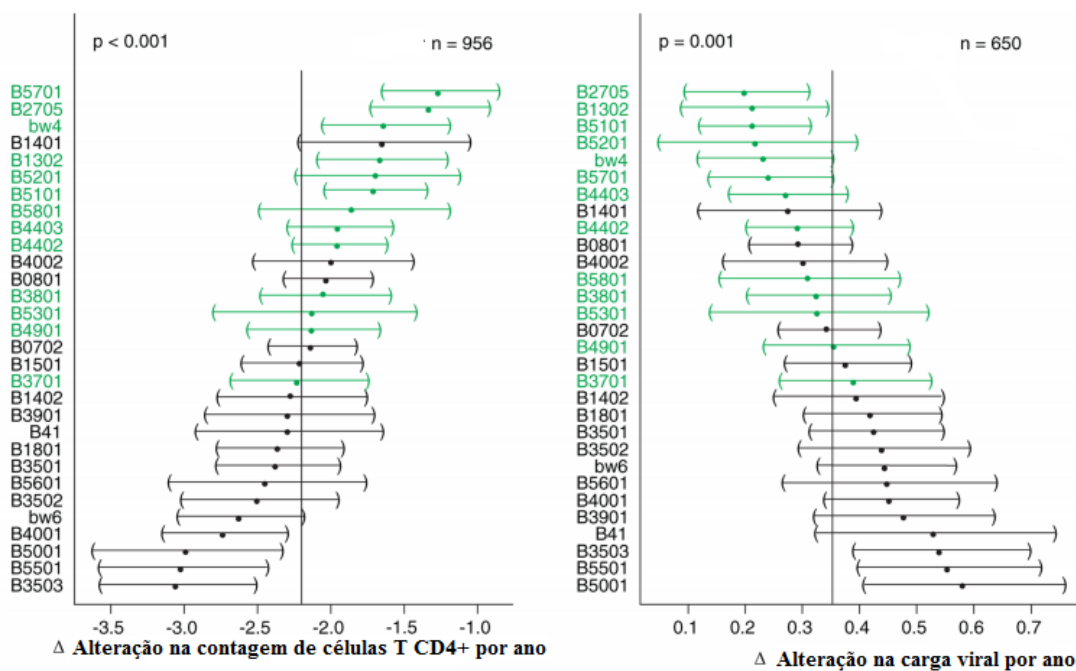
deleção do glicano do sítio N197 da gp120 em isolados virais de HIV-1 de diversos clados aumenta a sensibilidade para anticorpos neutralizantes por aumentar a acessibilidade a epítomos virais conservados. Outros estudos têm mostrado um menor número de sítios de glicosilação em vírus do início da infecção quando comparados com vírus de infecções crônicas, além de alterações nos padrões das glicosilações durante o curso da infecção (SAGAR et al., 2006; ANTONI et al., 2007; CASADO et al., 2013). Num outro contexto, pesquisas têm apontado que outros anticorpos neutralizadores formados na infecção pelo HIV-1 podem reconhecer epítomos formados por esse escudo pela interação com a região de glicanos e proteica de determinados pontos de N-glicosilação (DOORES et al., 2015). Vários estudos têm avaliado a produção de anticorpos neutralizadores específicos para determinados sítios de N-glicosilação e seus potenciais efeitos para desenhos de vacinas contra o HIV-1 (COHEN et al., 2015; DOORES et al., 2015; RADEMEYER et al., 2016).

2.6.2 Fatores do hospedeiro humano relacionados ao controle do HIV-1

Na infecção pelo HIV-1, a apresentação de peptídeos antigênicos derivados do vírus pode ser mais ou menos eficaz dependendo dos alelos *HLA* do hospedeiro, que são altamente variáveis entre as diferentes populações. O *HLA-B* é o *locus* mais polimórfico entre os diferentes *loci HLA*, e seu papel no controle da replicação do HIV-1 tem sido apontado em inúmeros estudos. Os grupos alélicos *HLA-B*57* e outros, como *HLA-B*27* e *HLA-B*58* são correlacionados a efeitos protetivos, enquanto o *HLA-B*35:03* parece estar associado com progressão para aids. A apresentação de três ou quatro epítomos imunodominantes de regiões conservadas do antígeno Gag pelo *HLA-B*57* aos linfócitos T CD8+ controla a replicação viral do HIV-1, pois direciona a produção de variantes de escape com menor aptidão replicativa. A resposta das células T CD8+ contra epítomos destas variantes de escape também parece ser fundamental no bloqueio da atividade replicativa do HIV-1 (BASHIROVA et al 2011). O *HLA-B*27* também oferece proteção em termos de controle da replicação viral e progressão para aids. O mecanismo de proteção do *HLA-B*27* acontece de maneira semelhante ao *B*57*, porém envolve a indução de resposta dos linfócitos T CD8+ contra um epítomo Gag altamente conservado, denominado KK10. Sob a pressão dos linfócitos T CD8+ restritos ao *HLA-B*27*, o

HIV passa por um complexo padrão de mutações que, eventualmente, pode resultar em linhagens virais com capacidade replicativa deficiente. O grau de eficiência da resposta específica desses alelos *HLA* pode sofrer variação de acordo com o subtipo viral do HIV-1 (KLOVERPRIS; LESLIE; GOULDER, 2015). A FIGURA 19 demonstra alelos *HLA-B* e sua relação com a alteração de células T CD4+ e carga viral ao longo do tempo.

FIGURA 19 - PAPEL DOS ALELOS *HLA-B* NA CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ NA CARGA VIRAL DO HIV-1, AO LOGO DO TEMPO



FONTE: Martin e Carrington (2013).

NOTA: Valores da raiz quadrada, usando modelo de regressão mista linear. Alelos *HLA-B* são ordenados do mais protetivo (topo) para o menos protetivo (base). Alelos *HLA-B Bw4* estão em verde.

Os receptores com domínio tipo imunoglobulina (*killer Ig-like receptor- KIR*) são glicoproteínas encontradas na superfície de células *NK* e de algumas células T e possuem função inibitória e de ativação dessas células, dependendo da variabilidade genética individual. Esses receptores são codificados pelos genes *KIR*, que são altamente polimórficos na população, e interagem diretamente com determinadas moléculas *HLA* classe I na superfície de células alvo. Estudos sugerem que indivíduos HIV-1 que apresentam o alelo de ativação *KIR3DS1* em combinação com alelos *HLA-B Bw4* apresentam uma associação com menor depleção de células TCD4+ e progressão mais lenta para aids (MARTIN et al., 2002; JIANG et al., 2013).

O polimorfismo *rs12979860*, localizado próximo ao gene que codifica para a interleucina 28B (IL28B), também chamada de interferon lambda tipo III (IFN λ 3), influencia a expressão e atividade antiviral do IFN λ 3, sendo que a presença do genótipo C/C tem sido amplamente associado com clareamento viral e melhor resposta ao tratamento em infecções com vírus da hepatite C (VHC) (GE et al., 2009; THOMAS et al., 2009). Nas infecções com o HIV-1 a presença do genótipo C/C também tem sido relatada como independentemente associada com o controle espontâneo da replicação viral em grupo de indivíduos controladores de elite (MACHMACH et al., 2013), porém o mesmo não tem sido observado em outros estudos com indivíduos americanos de origem africana controladores de elite ou supressores de viremia (SALGADO et al., 2011; SAJADI et al., 2011).

O organismo humano tem uma ampla variedade de respostas antivirais ao HIV-1, incluindo proteínas que atuam como fatores de restrição em fases distintas do ciclo viral, além de citocinas, quimiocinas e seus receptores celulares que podem estar relacionados com a progressão para aids. Vários estudos procuram associar a presença de SNP, expressão e dosagens plasmáticas de diferentes fatores celulares anti- e pró-virais com a evolução da infecção do HIV-1, procurando compreender a alta variabilidade individual nessas respostas e como esses conhecimentos podem auxiliar na terapia ou profilaxia da infecção (PLATTEN et al., 2016). As citocinas desempenham importante papel na modulação do sistema imune inato e adaptativo, e a presença de SNP em genes que codificam diferentes citocinas pró ou anti-inflamatórias têm sido associados com diferentes perfis de progressão da infecção pelo HIV-1 (MAHAJAN et al., 2010), sendo que as diferenças na distribuição genotípica desses alelos podem ser características de distintos grupos étnicos.

O trabalho de Freitas et al (2015) avaliou a presença de SNP em 216 indivíduos infectados pelo HIV-1, provenientes da região Norte do Brasil, e encontrou que o genótipo para interferon gama IFN γ +874 T/T, que é associado com alta produção IFN γ , estava relacionado, nesse grupo de indivíduos, com maiores contagens de células T CD4+, quando comparado aos genótipos A/A ou A/T, como também visto em outros estudos (KANG et al., 2006; SOBTI et al., 2010). Ainda nesse estudo, foi encontrada associação no fator de crescimento transformante beta (TGF β) genótipo TGF β -509 T/T, que é relacionada a maior produção desse fator, em indivíduos com maior carga viral. O TGF β pode aumentar a expressão dos principais correceptores do HIV-1, CCR5 e CXCR4 e aumentar a expressão de CTLA-4

(linfócito T citotóxico associado ao antígeno 4 – CD152) que é associado como um marcador de progressão da infecção (KAUFMANN et al., 2007).

Vários receptores de quimiocinas têm sido relacionados como mediadores de entrada do HIV-1, como o CCR2, CXCR6, CX3CR1, mas o CCR5 e CXCR4 são relacionados como os mais importantes clinicamente. A deleção de 32 pares de bases no gene *CCR5* confere alterações nos padrões de infecção e progressão para aids. Indivíduos homozigotos para essa deleção apresentam uma resistência natural para infecções por linhagens virais que usem esse correceptor, já os indivíduos heterozigotos para esse polimorfismo têm sido relacionados como uma progressão mais lenta para aids, com menor declínio de células T CD4+ e menor carga viral (IOANNIDIS et al., 2001; BORINSKAYA et al., 2012).

O correceptor CCR5 é ligante para as quimiocinas MIP-1 α (CCL3), MIP-1- β (CCL4) e RANTES (CCL5), produzidas por células T CD8+, e é expresso em células B, monócitos, macrófagos e linfócitos T CD4+. Estudos demonstram que as dosagens destas quimiocinas podem influenciar na progressão da infecção, uma vez que interferem diretamente na disponibilidade e regulação negativa desse correceptor para o HIV-1 (SAHA et al., 1998; LIU et al., 1999; PIACENTINI et al., 2009). O correceptor CXCR4 do HIV-1 é ligante natural da quimiocina CXCL12 (SDF1) sendo expresso em vários tipos celulares incluindo linfócitos T CD4+ e monócitos, variantes no gene que expressa essa quimiocina bem como os níveis de expressão podem influenciar a progressão da infecção viral (WINKLER et al., 1998; MAHAJAN et al., 2010).

Dosagens de outras quimiocinas como CCL2 (*monocyte chemoattractant protein-1* MCP-1), CXCL8 (interleucina 8 - IL8) e CXCL10 (*interferon gamma-induced protein 10* – IP-10) têm sido correlacionadas com viremia e perfil de progressão da infecção pelo HIV-1. A MCP-1 é uma quimiocina pró-inflamatória induzida durante a fase aguda e crônica da infecção pelo HIV-1, é um potente quimioatratador de monócitos, células T CD4+ de memória e células *NK*, fazendo esse recrutamento para o sítio da infecção, devido a alta expressão do seu receptor CCR2 nessas células. Além disso, promove, direta ou indiretamente, aumento da expressão do correceptor CXCR4 em células T CD4+ não ativadas, contribuindo para o aparecimento de células suscetíveis ao tropismo viral X4. As proteínas virais como gp120, Tat, e p17 promovem aumento na expressão e liberação da MCP-1. Indivíduos homozigotos para alelos mutantes na posição CCL2-2518 do gene que

codifica para essa quimiocina apresentam menor expressão e menores dosagens plasmáticas de MCP-1, com melhor controle da replicação viral e melhor resposta a tratamento com inibidores de protease (ANSARI et al., 2011). A IL-8 é uma quimiocina pró-inflamatória, fator quimioatraente envolvida na ativação de neutrófilos, basófilos e algumas populações de linfócitos, com importante papel no recrutamento de células T CD4+ para os linfonodos. A estimulação da replicação viral por ação da IL-8 via mecanismos dependentes de NF- κ B, aumentando a atividade da região LTR do genoma viral, tem sido reportada em macrófagos, linfócitos T e micróglia (LANE et al., 2001; MAMIK; GHORPADE, 2014). O estudo de Pananghat e colaboradores (2016) propõe que a dosagem de IL-8, juntamente com as contagens de células T CD4+ pode ser um importante marcador de progressão da infecção pelo HIV-1, bem como de resposta a TARV em pacientes pediátricos. Nesse estudo os pesquisadores encontraram menor expressão e dosagem plasmática de IL-8 em pacientes pediátricos não progressores quando comparados ao grupo de progressores sem TARV ou ao grupo de não respondedores ao tratamento antiviral.

Avaliação da dosagem plasmática de IP-10 também tem sido proposta como um importante biomarcador de progressão da infecção pelo HIV-1 e de ativação imune (LANE et al., 2003; KAMAT et al., 2012; LIOVAT et al., 2012). A quimiocina IP-10 é um ligante natural do receptor CXCR3, que é expresso em células T ativadas, células Th1, monócitos, células dendríticas e células *natural killer*, e está implicada no recrutamento destas células CXCR3+ para os gânglios linfáticos e nos processos de ativação imune crônica (NOEL et al., 2014). A quimiocina IP-10 é secretada por muitos tipos celulares em resposta ao IFN- γ secretado por células dendríticas plasmocitóides que tiveram contato com HIV-1, induzidas pela presença das proteínas virais gp120 e Tat (ASENSIO et al., 2001; WILLIAMS et al., 2009; LIU et al., 2011). O estudo de Liovat e colaboradores (2012) que avaliou indivíduos adultos progressores rápidos, típicos e progressores lentos, sugere que diferenças nas dosagens plasmáticas de IP-10 encontradas na fase aguda da infecção pelo HIV-1 pode ser um preditor de progressão da infecção.

O grupo APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like*), que compreende 7 proteínas em humanos, tem demonstrado seu papel em promover hipermutações no genoma viral, principalmente para APOBEC A3G (uma das primeiras proteínas relacionadas à ação anti-HIV-1), A3B, A3D, A3F e

A3H. A ação antiviral tem efeito no próximo ciclo infectivo, uma vez que a APOBEC3 tenha sido incorporada às partículas virais durante o processo de replicação viral. A ação antiviral da APOBEC3 se dá pela indução de mutações por meio de desaminação, convertendo citosina em uracila na cadeia negativa do cDNA, gerando hipermutações de guanina para adenina no genoma proviral. Dependendo da intensidade da desaminação, o DNA proviral mutado pode ser degradado por enzimas reparadoras, ou ter a integração ao DNA humano comprometida, além de poder ocorrer produção de proteínas virais não funcionais, inviabilizando ou diminuindo a replicação viral (MANGEAT et al., 2003; YU et al., 2004). A proteína viral *vif* do HIV-1 é essencial para a replicação viral em células não permissivas, e atua principalmente na neutralização da APOBEC3 intracelular, antes que essa seja incorporada às novas partículas virais formadas, promovendo a poli-ubiquitinação e assim possibilitando posterior degradação proteossomal da APOBEC3 (HARRIS; LIDDAMENT, 2004). Muitos estudos têm procurado avaliar o polimorfismo e expressão de APOBEC3, bem como a correlação entre a hipermutação e contagem de células T CD4+ e a progressão da infecção em pacientes HIV-1+, com alguns resultados conflitantes (SANTA-MARTA et al., 2013). Estudos com grupos de indivíduos HIV-1+ LTNP têm demonstrado uma relação entre o controle da infecção viral e uma maior expressão de APOBEC3 (KOURTEVA et al., 2012; de PASQUALE et al., 2013).

A TRIM5 α é uma proteína celular de primatas, espécie-específica, que atua como fator de restrição da infecção viral ao HIV-1, uma vez que tem ação direta e precoce sobre as partículas virais que recém entraram na célula hospedeira, por meio da interação da região C-terminal da TRIM5 α com as proteínas do capsídeo viral, promovendo um desmonte precoce dessas partículas, antes que ocorram os processos iniciais de replicação viral (STREMLAU et al., 2004). O mecanismo exato da atividade antiviral promovida pela TRIM5 α ainda não é totalmente conhecido (DUTRIEUX et al., 2015), mas vários estudos relacionam a ocorrência de polimorfismos em huTRIM5 α e progressão para aids em infecções pelo HIV-1 (GOLDSCHMIDT et al., 2006; SAWYER et al., 2006; NAKAYAMA et al., 2007) ou a associação da expressão dessa sendo inversamente relacionada com os valores de carga viral (MOUS et al., 2012).

A BST-2 ou teterina, é uma proteína celular transmembrana tipo-2, sua expressão é induzida por interferon sendo constitutivamente expressa em vários

tipos celulares, incluindo células B maduras e linfócitos T (GOTO et al., 1994; FUJITA et al., 2012). A ação antiviral da BST-2 já está estabelecida contra muitos tipos de vírus, incluindo o HIV-1, e se dá por meio da retenção dos novos virions à membrana plasmática impedindo a liberação destes, além de atuar como um sensor de infecção viral estimulando respostas pró-inflamatórias. A proteína viral Vpu do HIV-1 antagoniza a ação da BST-2, promovendo degradação proteossomal e viabilizando a liberação das partículas virais recém formadas (VAN DAMME et al., 2008; NEIL; ZANG; BIENIASZ, 2008). Estudos tem avaliado a expressão de BST-2 em indivíduos infectados pelo HIV-1 e a progressão para doença (HOMANN et al., 2011; MOUS et al., 2012).

A proteína celular SAMDH1, expressa em células mielóides e linfócitos T CD4+ não ativados, tem ação antiviral atuando na redução de deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) intracelulares, bloqueando a replicação do HIV-1 nesses tipos celulares (HRECKA et al., 2011; BALDAUF et al., 2012; DESCOURS et al., 2012). A ligação entre as variantes de SAMHD1 e a progressão da infecção viral pelo HIV-1 ainda não está totalmente estabelecida. O estudo de Coon e colaboradores (2012), que avaliou 2945 indivíduos HIV-1 controladores de viremia e progressores de coortes Europeia e Afro-Americana, não demonstrou uma associação direta entre diferentes polimorfismos em SAMHD1 e seus valores de expressão com o curso da infecção viral. Por outro lado, Riveira-Munoz e colaboradores (2014) demonstra em seu estudo um aumento da expressão de SAMDH1 em grupo de pacientes HIV-1 controladores de elite, quando comparados a progressores ou indivíduos não infectados.

A identificação e avaliação de possíveis fatores protetivos, tanto virais como do hospedeiro, e a associação destes fatores com o controle da progressão para aids pode ser importante para aumentar o conhecimento da patogênese desta doença buscando ampliar futuras opções terapêuticas e profiláticas na infecção pelo HIV-1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar indivíduos HIV-1+ não progressores por longo tempo - LTNP, em acompanhamento no Complexo Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná, quanto ao perfil de variabilidade genética do HIV-1 e presença de fatores do hospedeiro relacionados à evolução lenta para aids.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar e avaliar o perfil clínico e epidemiológico dos indivíduos LTNP incluídos no estudo e, a partir de suas amostras clínicas, ser capaz de:

- Realizar a subtipagem viral do HIV-1 e avaliar dados resultantes da subtipagem;
- Determinar e avaliar o tropismo viral do HIV-1;
- Identificar nos isolados HIV-1 se há a presença de mutações de resistência primária a fármacos;
- Procurar por mutações específicas na região V3-V5_{gp120} do gene *env* do HIV-1 subtipo C de amostras clonadas e comparar com diferentes grupos de sequências;
- Identificar, avaliar e comparar os potenciais sítios de N-glicosilação na região V3-V5_{gp120} do gene *env*;
- Verificar a existência de heterozigose para a deleção de 32 pares de base no gene *CCR5*;
- Identificar a presença do polimorfismo *rs12979860* localizado próximo ao gene *IL28B*;
- Verificar a presença e avaliar a frequência de alelos *HLA-B* relacionados como fatores de proteção na progressão para aids;

- Avaliar os valores das dosagens plasmáticas das quimiocinas pró-inflamatórias CXCL8 (IL-8) e CXCL10 (IP-10) no grupo LTNP e comparar com as dosagens encontradas em indivíduos HIV-1 progressores.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Esse estudo apresentou um caráter observacional, analítico, de corte transversal e acompanhamento longitudinal.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CEP-HC-UFPR), sob registro CAAE: 03004912.7.0000.0096 (ANEXO 1).

4.3 CASUÍSTICA

A seleção dos integrantes desse estudo foi realizada por meio de revisão dos prontuários dos pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Infectologia do HC-UFPR ou por meio de indicação direta desses pelos seus médicos assistentes, no período compreendido entre os anos 2012-2016. Foi realizado preenchimento de questionário para coleta de dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais iniciais e evolutivos. Para os indivíduos que preencheram os critérios de inclusão da pesquisa, foi realizada entrevista e foram convidados a participar do estudo, sendo solicitada assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1) e coleta de amostras de sangue total em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), que foram prontamente encaminhados ao laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas, Curitiba para processamento imediato. Oportunamente, durante os retornos desses indivíduos aos seus atendimentos de consulta, quando viável, foram realizadas novas coletas de sangue.

4.3.1 Critérios de inclusão grupo indivíduos LTNP

Indivíduos com diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV-1 a tempo igual ou superior a 8 anos, assintomáticos, sem uso e indicação de TARV, conforme os

critérios definidores para indivíduos LTNP proposto por Casado e colaboradores (2010) e que tenham os mesmos ou os responsáveis legais assinado o TCLE.

4.3.2 Critérios de exclusão

Indivíduos com diagnóstico confirmado de infecção por HIV-1 e que apresentavam um dos critérios:

- tempo de diagnóstico inferior a 8 anos;
- sintomáticos com relação à infecção pelo HIV-1;
- em uso de TARV;
- recusaram-se a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para fins de comparação na análise das dosagens de quimiocinas, foram incluídas no estudo amostras de plasma de indivíduos HIV-1 progressores (N=38), definidos como pacientes com confirmação diagnóstica de infecção pelo HIV-1, com indicação e início da TARV no período inferior a oito anos da data de diagnóstico. Todos tinham registro em prontuário de estarem sob TARV no momento da coleta. Os pacientes foram subdivididos em TARV respondedores (N=28) (em supressão viral na data da coleta, com carga viral abaixo do limite de detecção) e em TARV não respondedores (N=10), (com carga viral variável há pelo menos 3 meses anteriores a data da coleta) pareados com o grupo LTNP por sexo, idade e tempo de infecção. Todos os indivíduos estavam em acompanhamento no Ambulatório de Infectologia do HC-UFPR. Essas amostras foram selecionadas entre as amostras que foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do HC-UFPR para a realização do exame de carga viral, nos anos 2013-2014.

4.4 MÉTODOS

4.4.1 Processamento das amostras

As amostras de sangue colhidas em tubos com anticoagulante EDTA dos indivíduos LTNP foram previamente centrifugadas para separação do plasma, que permaneceu armazenado a -80°C até a realização dos testes de dosagem das

quimiocinas. O restante do material foi processado para a obtenção do concentrado de leucócitos (*buffy coat*).

4.4.1.1 Obtenção do concentrado de leucócitos (*buffy coat*)

A obtenção do concentrado de leucócitos foi realizada por meio da técnica de gradiente de densidade utilizando o reagente *Histopaque*® 1077 (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante. Em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 3 mL do reagente *Histopaque*® e lentamente igual volume de sangue total. Esse material foi centrifugado a 400 x *g* por 30 minutos, a porção contendo o *buffy coat* foi separada e transferida para outro tubo cônico sendo adicionado 10 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) com homogeneização por aspiração delicada. O material foi centrifugado a 250 x *g* por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, recuperado o sedimento com 5 mL de PBS, procedendo-se nova centrifugação a 250 x *g* por 10 minutos. O *buffy coat* obtido foi ressuspensado em 1 mL de PBS e aliqotado para contagem do número de leucócitos em contador hematológico automatizado, e quando necessário, o número de células foi corrigido para uma obtenção de 10⁶ cels/mL. O material foi aliqotado e permaneceu armazenado a -80°C até a realização da extração do DNA.

4.4.1.2 Extração do DNA

O DNA total foi extraído a partir de 200 µL do concentrado de leucócitos, utilizando o kit comercial *PureLink*® *Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen CA, USA), segundo as instruções dos fabricantes e foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop*®*ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA).

4.4.2 Amplificação do material genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para cada reação de amplificação das diferentes regiões genômicas humanas e dos genes *env* e *pol* do HIV-1 foram utilizados entre 50 a 200 ng do DNA extraído para um volume final de reação de 25 µL ou 50 µL, contendo as concentrações finais: 0,2 a 0,75 µM dependendo do iniciador de cada reação, 1 U de *Taq Platinum*® DNA Polimerase (Invitrogen), 200 µM de deoxinucleotídeos

trifosfatados, 1x tampão de PCR sem MgCl₂ (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen) e água ultrapura para completar o volume. Todas as reações incluíram um controle negativo.

Nas reações de *nested*-PCR dos genes *env* e *pol*, foi utilizado um volume de 5 µL do produto da primeira reação como DNA molde. No QUADRO 1 constam os iniciadores utilizados nas diferentes reações de amplificação. As condições que foram utilizadas para a termociclagem constam nos subitens das amplificações de cada região. Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems®.

QUADRO 1 - INICIADORES UTILIZADOS PARA AS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DE REGIÕES DOS GENES *env* E *pol* DO HIV-1 E REGIÕES DOS GENES HUMANOS *CCR5* E *IL28B*

Iniciadores <i>env</i>	Sequência 5'-3'	Posição em K03544 (HXB2)
ED5	ATGGGATCAAAGCCTAAAGCCATGTG	6556-6581
ED12	AGTGCTTCCTGCTGCTCCCAAGAACCCAAG	7822-7792
ES7	*tgtaaaacgaaggccagcCTGTTAAATGGCAGTCTAGC	7001-7020
ES8	*caggaacagctatgaccCACTTCTCCAATTGTCCCTCA	7667-7647
Iniciadores <i>pol</i>	Sequência 5'-3'	Posição em K03544 (HXB2)
g17S	AAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGGGA	2017-2041
MMRT6	TTTTACATCATTAGTGTGGG	3647-3628
MMRT10	CAGGCTAATTTTTAGGGAA	2077-2096
MMRT5	TAAATTTGATATGTCCATTG	3574-3555
Iniciadores <i>CCR5</i>	Sequência 5'-3'	Posição em NC012637
p290	ACCAGATCTCAAAAAGAAGGTCT	8260-8282
P291	CATGATGGTGAAGATAAGCCTCACA	8484-8460
Iniciadores <i>IL28B</i>	Sequência 5'-3'	Posição em AC011445
F1	GACGAGAGGGCGTTAGAGCG	28961-28980
R2	ATTGACCCTGAGCCTGCGTT	29360-29341
F2	GAGCTCCCCGAAGGCGT	23832-23848
R1	CGAACCAGGGTTGAATTGCACTCC	29273-29250

NOTA: *sequência inicial (caixa baixa) complementar ao iniciador universal M-13. Posição dos nucleotídeos conforme sequência referência depositada no *GenBank* (disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide), K03544 (HXB2) para HIV-1; NC012637 para gene *CCR5*; AC011445 para *IL28B*.

4.4.2.1 Amplificação de regiões do gene *CCR5* e avaliação do polimorfismo *rs12979860*

A presença de deleção de 32 pb no gene *CCR5* e o polimorfismo *rs12979860* na região próxima ao gene codificante para a IL28B, foram determinados por meio de PCR convencional e avaliação direta dos produtos amplificados, conforme previamente descrito por Michael *et al* (1997) e Ferreira *et al* (2013), respectivamente.

Para a amplificação de região do gene *CCR5* (reação usando os iniciadores p290 e p291) as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e manutenção do produto amplificado em 4°C.

Para o polimorfismo *rs12979860* (uma única reação de amplificação usando os iniciadores R1, F1, R2, F2) as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 69,2°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 3 minutos, com manutenção do produto final em 4°C.

4.4.2.2 Amplificação de regiões dos genes *env* e *pol*

As amplificações de regiões dos genes *env* e *pol* foram realizadas como previamente descrito por Delwart *et al* (1995) e Bello *et al* (2008). Na primeira reação de amplificação do gene *env* (com iniciadores externos ED5 e ED12) e na *nested*-PCR (com iniciadores internos ES7 e ES8) as condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos para a PCR I, e de 1 minuto na *nested*-PCR, com manutenção do produto amplificado em 4°C.

Para a primeira reação de amplificação do gene *pol* (com iniciadores externos g17S e MMRT6) e na *nested*-PCR (com iniciadores internos MMRT10 e MMRT5), seguiram-se as mesmas condições de termociclagem de *env*, alterando somente a temperatura de hibridização para 55°C e tempo de extensão para 1 minuto e 30 segundos nas duas reações.

4.4.3 Visualização dos produtos amplificados nas reações de amplificação

Após a amplificação, os produtos de cada reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (gel a 2% para detectar os polimorfismos e 1,5% para os produtos amplificados dos genes *pol* e *env*) em tampão TBE (Tris-borato 45mM, EDTA 1mM), corado com brometo de etídio 0,01%, por aproximadamente 40 minutos a 100V, com posterior visualização do gel em transiluminador (VILBER LOURMAT®) sob luz ultravioleta, para detecção dos produtos amplificados e devidos registros documentais.

A partir da reação para identificação da presença da deleção de 32 pares de base no gene *CCR5* foram visualizados amplicons de 224 pares de bases (pb) correspondente ao alelo sem deleção, e 192 pb quando da presença do alelo com deleção ($\Delta 32CCR5$). A amplificação desse produto serviu como controle das demais reações de amplificação.

Para identificação do polimorfismo *rs12979860* foram visualizados um fragmento de 400 pb, resultante do anelamento dos iniciadores R1 e F2, considerado como um controle positivo da reação, e um produto de 312 pb na presença do alelo C e/ou um produto de 128 pb na presença do alelo T.

A presença do produto amplificado nas reações *nested* para *env* e *pol* foi identificada pela presença de fragmento de aproximadamente 660 pb e 1440 pb, respectivamente. Esses produtos amplificados de *env* e *pol* foram purificados e utilizados para as etapas de sequenciamento nucleotídico.

4.4.4 Purificação do produto amplificado de *env* e *pol*

Os produtos amplificados para as regiões dos genes *env* e *pol* foram purificados com o kit comercial *PureLink®PCR Purification Kit* (Life Technologies Carlsbad, CA, USA), segundo as orientações do fabricante. O material purificado foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop®ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc. MA, USA), e foram armazenados a -80°C até a realização das etapas de sequenciamento nucleotídico.

4.4.5 Etapas do processo de sequenciamento nucleotídico

Os produtos purificados de *env* e *pol* foram submetidos a reação de sequenciamento nucleotídico. A reação foi realizada em microplaca de 96 poços (MicroAmp Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando o kit de sequenciamento *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA), conforme as orientações do fabricante. Foram realizadas duas reações para cada produto amplificado, uma com o iniciador direto e outra reação com o iniciador reverso da *nested-PCR*, com aproximadamente 30 ng de DNA para cada reação de sequenciamento de *env* e 100 ng de DNA para *pol*. A reação foi realizada em termociclador *Veriti® Thermal Cycler Applied Biosystems®*, com as condições de termociclagem: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 segundos, hibridização 50°C por 15 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos, com manutenção do produto final em 4°C. Na sequência foi realizada a etapa de purificação e precipitação do material marcado amplificado, foram adicionados a cada poço da placa 66 µL de etanol absoluto, 2 µL de acetato de amônio 7,5 M e 10 µL de água ultrapura. A placa foi mantida em repouso no gelo, ao abrigo da luz. Em seguida foi realizada centrifugação a 2.200 x *g* por 45 minutos (Eppendorf Centrifuge 5430R). O material sobrenadante foi descartado por inversão da placa e foi adicionado a cada poço 100 µL de etanol 70%. Foi realizada nova centrifugação a 2.200 x *g* por 20 minutos e na sequência o sobrenadante foi descartado novamente por inversão da placa. A placa foi mantida por até 12 horas em temperatura ambiente para secagem, ao abrigo da luz. Após, a placa foi lacrada e armazenada a - 20°C até o momento de ser encaminhada ao departamento responsável pelo sequenciamento. Posteriormente, no momento do sequenciamento, as amostras foram solubilizadas adicionando-se 10 µL de formamida *Hi-Di™* (Applied Biosystems, Inc. USA) a cada poço, com posterior aquecimento em termociclador a 96°C por 5 minutos, e manutenção em gelo até a colocação da placa em sequenciador automático modelo *3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Inc. USA), do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná ou na plataforma *ABI Prism 3130xl Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR).

4.4.6 Avaliação das sequências e determinação dos subtipos virais

As sequências nucleotídicas foram previamente verificadas pelo *software Sequence Scanner 2.0* (Applied Biosystems) e posteriormente analisadas e editadas utilizando a ferramenta *DNASTAR Lasergene SeqMan Program version 7.0* (DNASTAR, Inc., Madison, WI). As sequências consenso geradas foram visualmente analisadas usando o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) e alinhadas por meio do programa *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2011).

A avaliação inicial da subtipagem foi realizada pela plataforma online *REGA HIV subtyping tool v.3.0* (disponível em <http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/>). Sequências referência HIV-1 grupo M foram extraídas do banco de dados LANL (*Los Alamos National Laboratory HIV Database*) e foram utilizadas para avaliações filogenéticas e de recombinação. A avaliação quanto a presença de clados recombinantes foi analisada pela ferramenta RIP (*recombinant identification program*) (disponível em <https://www.hiv.lanl.gov>) e pelo programa *SimPlot 3.5.1* (LOLE et al., 1999) por meio do método de *bootscanning*, sendo utilizado o método de Neighbor-Joining, com o modelo de substituição nucleotídica de Kimura 2-parâmetros (KIMURA, 1980), janela de 250 pb e um passo de 20 pb com 100 pseudoréplicas para avaliar o suporte dos grupamentos filogenéticos.

A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood - ML*), usando o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+ Γ 4, na plataforma MEGA versão 7.0.

4.4.7 Avaliação e predição *in silico* do tropismo viral

A predição *in silico* do tropismo viral nas amostras dos indivíduos LTNP foi realizada por meio da avaliação das sequências de aminoácidos da região da alça V3_{gp120} (amostras em triplicata), na plataforma online *Geno2Pheno_(coreceptor)* (LENGAUER et al., 2007) (disponível em <http://www.geno2pheno.org>), com razão de falso positivo de 10% (*Falso Positive Rate - FPR*). Esse programa realiza o processo de predição por modelos estatísticos complexos, em conjunto com marcadores clínicos do paciente, como contagem de células T CD4+ e CD8+, carga viral, presença de deleção de 32 pares de base no gene que codifica o correceptor

CCR5, e assim caracteriza os resultados indicando se determinada sequência genômica viral corresponde a um vírus que pode estar utilizando o correceptor celular CXCR4, englobando assim na mesma categoria vírus X4 e R5X4, ou se determinada sequência prediz ser um vírus R5 por estar utilizando o correceptor CCR5.

4.4.8 Análise de mutações de resistência primária do HIV-1 em amostras dos indivíduos LTNP

Para análise da presença de mutações de resistência primária foram avaliadas as sequências nucleotídicas de regiões do gene *pol* (PR/TR) das amostras dos indivíduos LTNP utilizando a ferramenta *Calibrated Population Resistance* (CPR) (GIFFORD et al., 2009), o qual utiliza o *Stanford Surveillance Drug Resistance Mutations 2009*, que exclui da análise os polimorfismos mais comuns na avaliação da resistência (BENNETT et al., 2009). Para os indivíduos que apresentavam mais de uma coleta, foi considerada para essa análise o resultado do sequenciamento da primeira amostra colhida, realizada no momento da entrada no estudo.

4.4.9 Clonagem região V3-V5_{gp120}, gene *env* HIV-1

Amostras de três indivíduos HIV-1 LTNP subtipo C (um controlador de elite e dois controladores de viremia) foram clonadas a partir dos produtos amplificados para a região V3-V5_{gp120} (aproximadamente 660 pb) para avaliação da presença de mutações específicas nessas sequências, uma vez que são poucos os dados na literatura referente a avaliação de mutações em sequências com esse subtipo viral. Os fragmentos amplificados foram clonados utilizando o kit comercial *pGEM®-T Easy Vector* (Promega, Madison, EUA), conforme as orientações do fabricante. Para um volume final de 10 µL de reação de ligação foram adicionados, em tubos de polipropileno de 1,5 mL, 1 µL do *vetor pGEM®-T Easy*, 5 µL do tampão *2x Rapid Ligation*, 1 µL da enzima *T4 DNA Ligase*, volumes de 1,9-1,6-1,5 µL dos insertos de DNA (produto amplificado e purificado com quantificações de 17,61 ng/µL - 19,81 ng/µL - 22,04 ng/µL, respectivamente) e água ultrapura qsp. A reação foi homogeneizada por pipetagem e incubada a 4°C por 16 horas. Posteriormente, foi

realizada a transformação em bactérias competentes por choque térmico, e o material devidamente identificado, foi plaqueado em meio LB (*Luria-Bertani*) sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 0,4 mM de IPTG (*Isopropil-β-D-tiogalactopirosídeo*) e 0,04 mg/mL de X-Gal (*bromo-chloro-indolyl-galactopyranosídeo*). As placas foram incubadas a 37°C por 16 horas. Na sequência, para facilitar a identificação de possíveis clones, as colônias brancas obtidas na transformação de ligações com sistema *pGEM®-T Easy* foram replicadas em uma nova placa de meio sólido LB – *master plate* – com um quadro numerado para identificação de cada colônia, e novamente incubadas por 16 horas.

Posteriormente foi realizada uma reação de amplificação das colônias com os iniciadores da *nested-PCR* do produto clonado (iniciadores ES7 e ES8), para confirmação da clonagem do inserto. As colônias que apresentaram resultado positivo na amplificação foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina, em tubos cônicos de 50 mL, que foram incubados a 37°C sob agitação constante de 200 rpm, por 16 horas. O isolamento do DNA plasmidial foi realizado utilizando o kit *Plasmid DNA Purification NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel). De cada amostra clonada foram sequenciados aproximadamente 10 clones, que foram utilizados para a obtenção de uma sequência consenso para cada uma das três amostras.

4.4.9.1 Avaliação das sequências obtidas por meio da clonagem

Após a correspondência em aminoácidos, as sequências consenso dos clones foram comparadas para avaliação de possíveis mutações com a sequência consenso geral para o subtipo C, com sequências de indivíduos LTNP do mundo (N=17), sequências do Brasil (N=58), sequências ancestrais (até o ano de 1995) (N=90) e sequências do mundo (ano de 2010) (N=292) da mesma região V3-V5_{gp120} do gene *env*, todas subtipo C, extraídas do banco de dados LANL (*download* em 31 de agosto de 2016) (APÊNDICE 2). O alinhamento das sequências foi realizado pelo programa *Clustal Omega* (SIEVERS et al., 2011) e visualmente analisadas utilizando os programas MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). Foram incluídas nos diferentes grupos de análise somente uma sequência por indivíduo.

4.4.10 Avaliação dos potenciais sítios de N-glicosilação

As sequências de aminoácidos da região V3-V5_{gp120} das amostras dos indivíduos LTNP desse estudo foram avaliadas quanto ao número de potenciais sítios de N-glicosilação por meio da plataforma *N-Glycosite*, do banco de dados LANL (ZHANG et al., 2004). Essa ferramenta de predição identifica a presença do padrão de aminoácidos NXS/T (*sequon*), onde X representa qualquer aminoácido (menos prolina) seguido de uma serina ou treonina. As sequências dos indivíduos LTNP desse estudo foram comparadas com os grupos de sequências descritas no item 4.4.9.1. Também foram realizadas comparações com sequências HIV-1 subtipo B e C provenientes de indivíduos classificados como progressores do grupo de transmissão vertical em atendimento no Hospital de Clínicas Curitiba (N= 21) e de indivíduos classificados como progressores, subtipos B e C (N=72), extraídas do banco de dados LANL (*download* em 20 de janeiro de 2017). Todas as sequências utilizadas nas avaliações constam no APÊNDICE 2.

4.4.11 Genotipagem *HLA-B*

Amostras de DNA genômico extraído de 23 indivíduos do grupo LTNP foram encaminhadas para avaliação e genotipagem do *HLA-B* em dois centros de referência sendo que, 13 amostras foram processadas no Laboratório de Imunogenética, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná e 10 amostras encaminhadas ao Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

A genotipagem *HLA-B* foi realizada por PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction - Specific Sequence Oligonucleotides Probes*), utilizando a metodologia *Luminex* (Luminex Corporation, Austin, EUA), que se baseia no uso de microesferas codificadas por diferentes tonalidades de fluorescências, decorrentes da mistura de dois corantes fluorescentes em diferentes proporções. As diferentes microesferas são conjugadas com sondas de oligonucleotídeos específicas para os diferentes alelos *HLA* (BONTADINI, 2012).

Para a tipificação do locus *HLA-B* foi utilizado o *LABType® Kit* (One Lambda Inc., Canoga Park, CA, USA), conforme as instruções do fabricante. Primeiramente o

DNA genômico foi amplificado, utilizando iniciadores marcados com biotina e específicos para os *exons* 2 e 3 para os genes *HLA*. Em seguida, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio para confirmação de amplificação específica dos produtos de interesse. Na sequência, foi realizada a etapa de hibridização, onde o DNA amplificado é primeiramente desnaturado e submetido à hibridização com as microesferas (que apresentam a fluorescência específica) que estão conjugadas com sondas de oligonucleotídeos específicos. Posteriormente, ocorre uma etapa de lavagem e reação com estreptavidina-ficoeritrina, que faz ligação com o DNA biotilado. O software *HLA Fusion* permite a identificação do genótipo *HLA* em média resolução a partir da análise do padrão de reatividade de cada amostra de DNA em relação ao conjunto de sondas conjugadas às microesferas. Para as análises estatísticas, foram considerados os resultados da tipificação quanto ao grupo alélico *HLA-B* (dois dígitos).

4.4.12 Avaliação das dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10

Foram utilizadas amostras de plasma, armazenadas a - 80°C para avaliar as dosagens das quimiocinas IL-8 e IP-10 no grupo de indivíduos LTNP referentes a coleta realizada para cada paciente no momento de entrada no estudo. Também foram avaliadas as dosagens dessas quimiocinas em amostras de indivíduos HIV-1 progressores (N=38) e um grupo controle (N=10).

As dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 foram mensuradas por citometria de fluxo utilizando *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Chemokine Kit* (BD Biosciences CA, USA), de acordo com as especificações do fabricante. Esse ensaio é um método de captura de analitos solúveis por microesferas (*beads*) de fluorescência conhecida conjugados a um anticorpo específico. O reagente de detecção do kit é formado por uma mistura de anticorpos monoclonais específicos contra cada uma das quimiocinas a serem testadas, conjugados com ficoeritrina (PE), que apresentam fluorescência distinta das microesferas. Quando ocorre a formação do complexo microesferas de captura + analito de interesse + reagente de detecção, ocorre um sinal de fluorescência proporcional a quantidade do analito presente na amostra que está sendo testada.

Os ensaios de dosagem das quimiocinas foram realizados no Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba-Paraná. Os testes e análises foram realizados na

plataforma de Citometria do ICC [RPT08L]. Primeiramente, uma curva de diluição seriada foi preparada com a amostra padrão das quimiocinas a serem testadas. A reação de dosagem das quimiocinas foi realizada em placa de 96 poços, fundo em U. Foram adicionados a cada reação 10 μL de cada microesfera de captura, 25 μL de amostra de plasma (diluída 1:4) e 75 μL do reagente de detecção (*Human Chemokine PE Detection Reagent*), incubados em temperatura ambiente, por 3 horas, ao abrigo da luz. Na sequência, foi adicionado 100 μL de tampão de lavagem a cada reação, seguido de centrifugação a 1500 x *g* por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão da placa, e o sedimento foi ressuspenso em 200 μL do tampão de lavagem. A placa foi levada para análise em equipamento *BD FACSCanto™ II 4.2.2* e os dados analisados pelo *software FCAP Array e FlowJo v.10*. As mensurações foram apresentadas em pg/mL.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas por estatística descritiva e analítica. Os dados foram digitados e compilados em planilhas Excel® e analisados utilizando o *software GraphPad Prism® v. 5.03* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

As frequências alélicas *HLA-B* foram obtidas por contagem direta. As variáveis categóricas foram analisadas utilizando o teste exato de Fischer ou qui-quadrado, quando apropriado, e para as variáveis contínuas foram utilizados os testes de *Mann-Whitney* e *Kruskal-Wallis* para comparação dos dados entre os grupos. As correlações foram determinadas usando o teste de correlação de *Pearson*.

Os resultados das variáveis contínuas foram expressos como medianas e variações interquartis, e os valores calculados de *p* foram bicaudais tendo um valor de $p < 0.05$ considerado como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Resultados parciais desse estudo já foram previamente publicados ou submetidos para publicação (APÊNDICE 3):

- SANTOS, J. S.; RIBEIRO C. E.; ALMEIDA S. M.; RABONI, S. M. Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil. **J AIDS Clin. Res**, v. 6, n. 9, 2015. doi:10.4172/2155-6113.1000502.
- SANTOS, J. S.; ALMEIDA S. M.; SILVEIRA, G. F.; BORDIGNON, J.; RABONI, S. M. Host Factors predictors in Long Term Non-Progressors HIV-1 infected individuals: correlation with distinct viral clades – artigo em processo de submissão.

5.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS DOS INDIVÍDUOS LTNP

O Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná atendeu aproximadamente 1400 pacientes HIV-1 positivos e entre os anos de 2012 a 2016 24 (1,71%) foram identificados como indivíduos LTNP, segundo os os critérios de inclusão no presente estudo. Todos os indivíduos identificados com o perfil LTNP concordaram em participar do estudo.

A distribuição por sexo entre os indivíduos incluídos no estudo foi de 58% para o sexo feminino (14/24), sem diferença estatística na distribuição do número de casos por sexo ($p= 0,3868$), com uma mediana de idade para o grupo total LTNP de 45 anos (IIQ 37 - 51). Entre os casos em que a infecção pelo HIV-1 foi por transmissão vertical as idade dos indivíduos incluídos no estudo variaram de 12 a 19 anos. A maioria dos indivíduos LTNP foi classificada como de etnia branca (20/24 - 83%). Quanto ao risco de infecção por HIV-1, para 16/24 (67%) foi relacionada à atividade sexual, sendo que desses 75% se declararam heterossexuais. A infecção por transmissão vertical foi observada em 5/24 (21%) e o uso de drogas injetáveis foi informado por 3/24 (12%) dos indivíduos do grupo LTNP.

Quanto ao histórico clínico evolutivo, a mediana do tempo de diagnóstico da infecção pelo HIV-1 foi de 14 anos (IIQ 12-16) e a mediana da contagem de células T CD4+ foi de 702 células/ μ L (IIQ 538-953).

Conforme o histórico de carga viral, 4/24 (17%) dos indivíduos foram classificados como controladores de elite (EC), apresentando carga viral indetectável na grande maioria das mensurações, 7/24 (29%) como controladores de viremia (VC), com até 2000 cópias de RNA/mL na maioria das mensurações, e os demais (54%) como não controladores de viremia ou não progressores virêmicos (VNP), com carga viral variável. Todos os indivíduos LTNP com infecção pelo HIV-1 por transmissão vertical foram classificados como VNP. A TABELA 1 e a FIGURA 20 apresentam alguns parâmetros clínicos do grupo LTNP. Foi observado que o subgrupo dos indivíduos controladores de elite apresentaram parâmetros mais altos com relação a contagem de células T CD4+ e quanto a razão CD4/CD8, quando comparados com os subgrupos de controladores de viremia e não progressores virêmicos, tanto nos dados recentes como no histórico evolutivo.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS DOS INDIVÍDUOS HIV-1 GRUPO LTNP

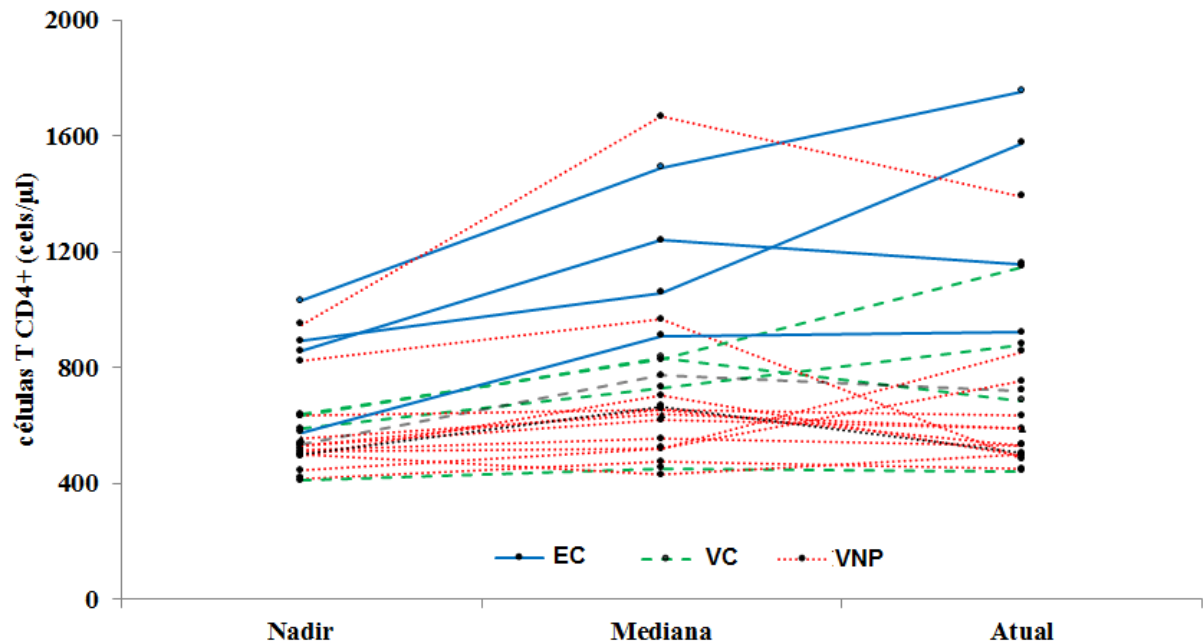
Característica	LTNP N = 24	EC N = 4	VC N = 7	VNP N = 13	valor de p
Tempo de infecção pelo HIV-1, anos	14 (12-16)	13 (10-23)	15 (11-17)	13 (10-19)	0,899
Células T CD4 ⁺ , cells/ μ L, atual	628 (506-875)	1414 (960-1708)	679 (504-880)	588 (496-640)	0,011
Células T CD8 ⁺ , cells/ μ L, atual	1463 (973-1861)	1295 (782-1809)	1418 (982-1860)	1599 (1037-2163)	0,798
Razão CD4/CD8, atual	0,48 (0,36-0,87)	1,12 (0,94-1,27)	0,50 (0,40-0,70)	0,38 (0,26-0,70)	0,016
Células T CD4 ⁺ cells/ μ L, <i>nadir</i>	526 (437-633)	874 (645-996)	536 (409-634)	494 (439-541)	0,037
Células T CD4 ⁺ cells/ μ L, histórico evolutivo	702 (538-953)	1149 (932-1418)	680 (514-862)	658 (538-819)	<0,0001
Carga viral (cópias RNA/mL) histórico evolutivo	-	< limite detecção	957 (442-2062)	9480 (3630-25636)	<0,0001

FONTE: A autora (2017).

NOTA: Mediana dos valores (IIQ).

LEGENDA: EC: controladores de elite, VC: controladores de viremia, VNP: não progressores virêmicos, IIQ = intervalo interquartil.

FIGURA 20 - CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ NOS INDIVÍDUOS LTNP



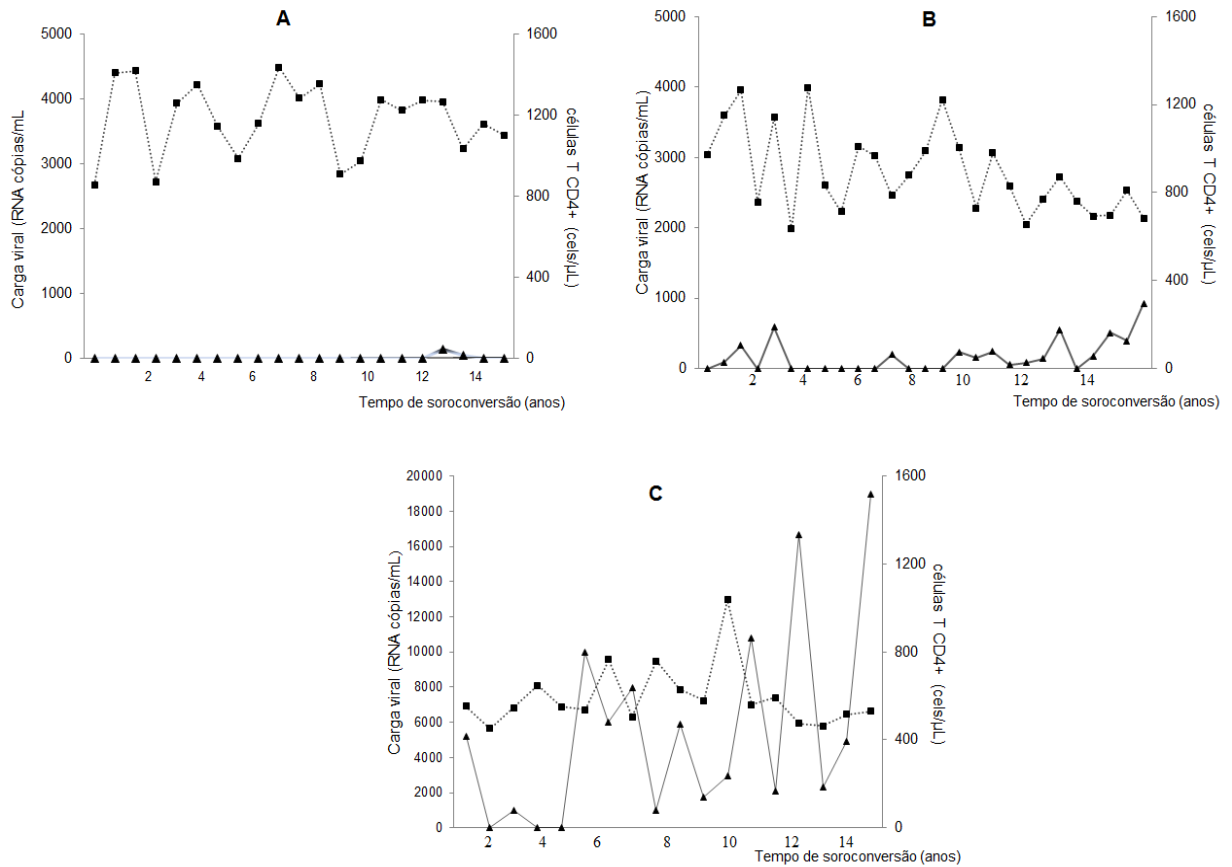
FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: VNP - não progressores virêmicos, EC - controladores de elite, VC - controladores de viremia.

A FIGURA 21 mostra a evolução ao longo do tempo quanto a contagem de células T CD4 + e carga viral, de um representante de cada subgrupo LTNP, evidenciando o perfil diferenciado de controle da infecção pelo HIV-1.

No acompanhamento clínico evolutivo dos indivíduos LTNP, na última revisão dos prontuários realizada em dezembro de 2016, foi observado que 7/24 (29%) desses indivíduos iniciaram TARV. Todos permaneciam assintomáticos quanto a evolução da doença, 5/7 apresentaram leve queda na contagem de células T CD4+, 1/7 iniciou tratamento por estar em relação sorodiscordante e 1/7 iniciou o tratamento pela presença de comorbidades. Vale ressaltar que todas as avaliações dos parâmetros clínicos incluem apenas o período livre de TARV para todos os indivíduos LTNP.

FIGURA 21 - PERFIL EVOLUTIVO DE CARGA VIRAL E CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ EM INDIVÍDUOS DOS SUBGRUPOS LTNP



FONTE: A autora (2017).

NOTA: linhas com marcações com triângulos indicam carga viral e linhas com marcações com quadrados indicam contagem de células T CD4+.

LEGENDA: A – paciente controlador de elite; B – paciente controlador de viremia; C – paciente não progressor virêmico.

5.2 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS VIRAIS NO GRUPO LTNP

5.2.1 Avaliação da distribuição dos clados HIV-1 no grupo LTNP

Pela avaliação das sequências nucleotídicas do HIV-1, a partir da amplificação da região V3-V5_{gp120} do gene *env* e das regiões da protease (PR) e transcriptase reversa (RT) do gene *pol*, foram identificados nos indivíduos LTNP, por meio de análise filogenética e pelas ferramentas de análise de recombinação, subtipo C em 12/24 (50%), subtipo B em 7/24 (29,2%) e formas recombinantes BF e

BC em 3/24 (12,5%) e 2/24 (8,3%) dos indivíduos, respectivamente. No APÊNDICE 4 é demonstrada a identificação de recombinação por *bootscanning*, por meio das ferramentas *SimPlot* e *RIP* de uma das amostras recombinantes em região da protease e transcriptase reversa.

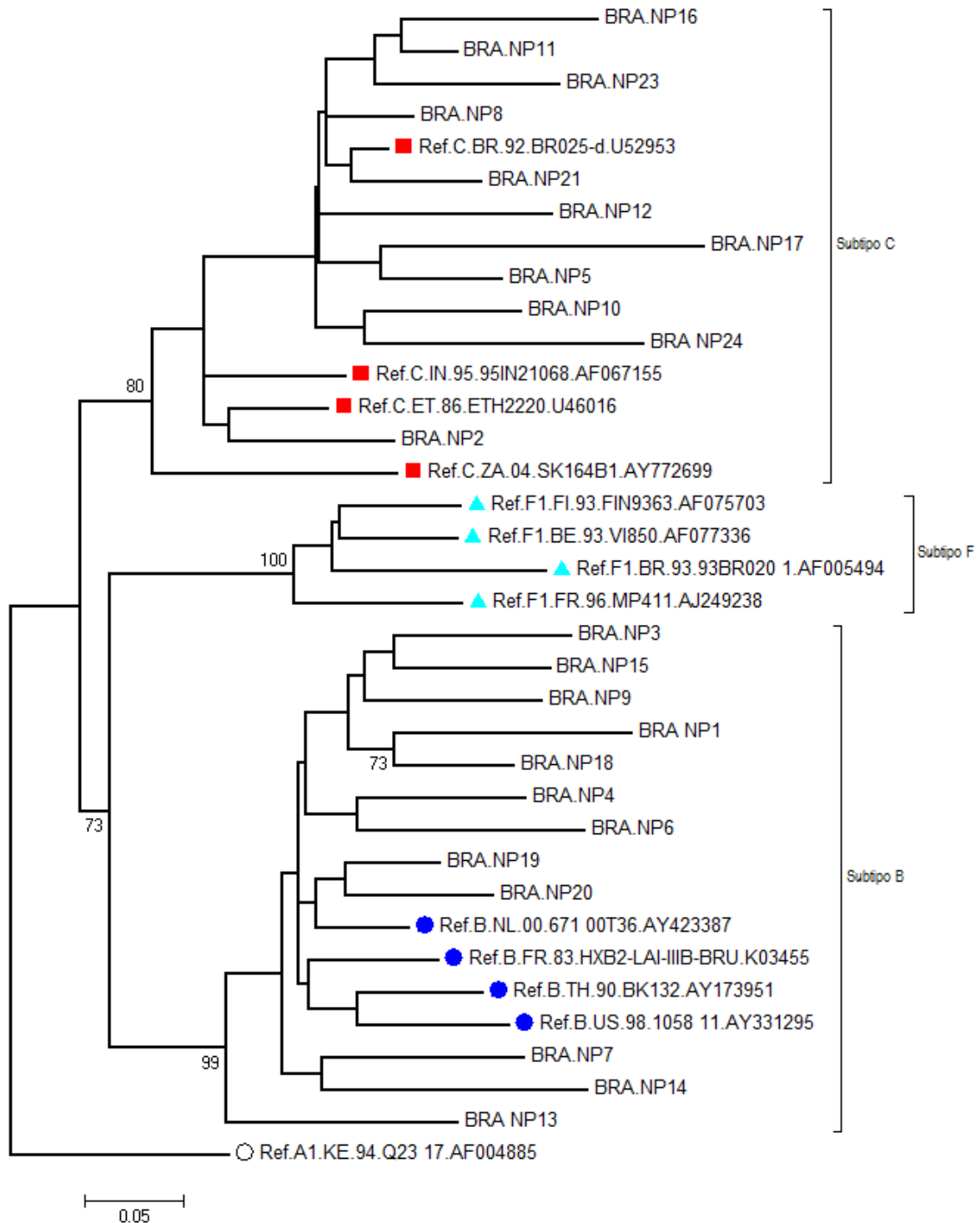
Para uma amostra não houve amplificação e não foi possível realizar a análise filogenética para o gene *pol*, o mesmo acontecendo com uma amostra para o gene *env*. Na TABELA 2 é apresentada a classificação por subtipos de cada paciente LTNP incluído no estudo e as FIGURAS 22, 23 e 24 mostram as árvores filogenéticas para as regiões sequenciadas dos genes *env* e *pol*.

TABELA 2 - SUBTIPOS VIRAIS DAS AMOSTRAS HIV-1 DO GRUPO LTNP PARA REGIÃO V3-V5_{gp120} E REGIÃO PR/RT

Identificação	<i>env</i> (V3-V5 _{gp120})	<i>pol</i> (PR/RT)	Classificação final
NP1	B	BC	BC
NP2	C	C	C
NP3	B	B	B
NP4	B	F	BF
NP5	C	C	C
NP6	B	BF	BF
NP7	B	B	B
NP8	C	C	C
NP9	B	-	B
NP10	C	C	C
NP11	C	C	C
NP12	C	C	C
NP13	B	B	B
NP14	B	F	BF
NP15	B	B	B
NP16	C	C	C
NP17	C	C	C
NP18	B	BC	BC
NP19	B	B	B
NP20	B	B	B
NP21	C	C	C
NP22	-	C	C
NP23	C	C	C
NP24	C	C	C

FONTE: A autora (2017).

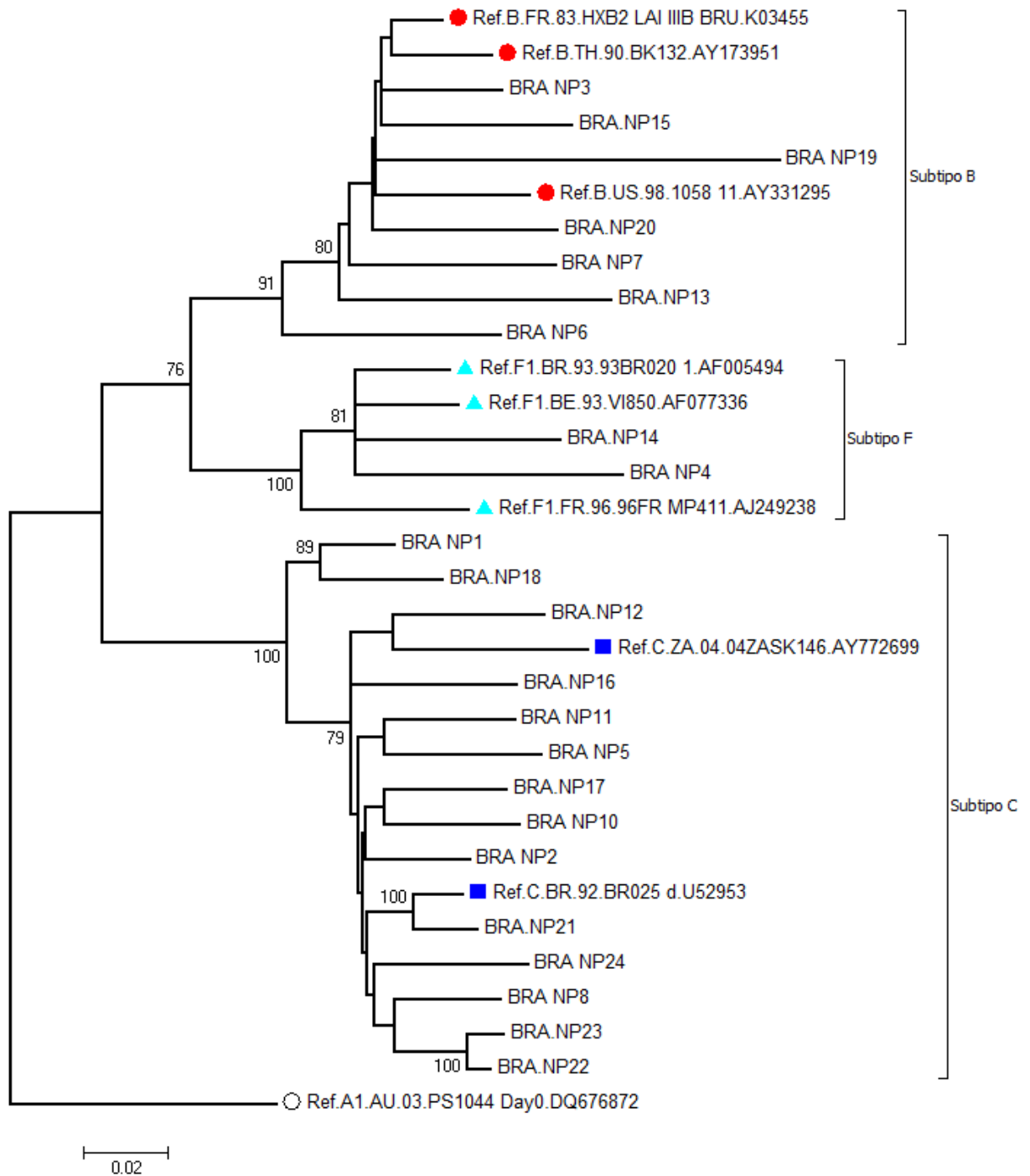
FIGURA 22 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS HIV-1, REGIÃO V3-V5_{gp120} GENE *env*, GRUPO LTNP



FONTE: A autora (2017).

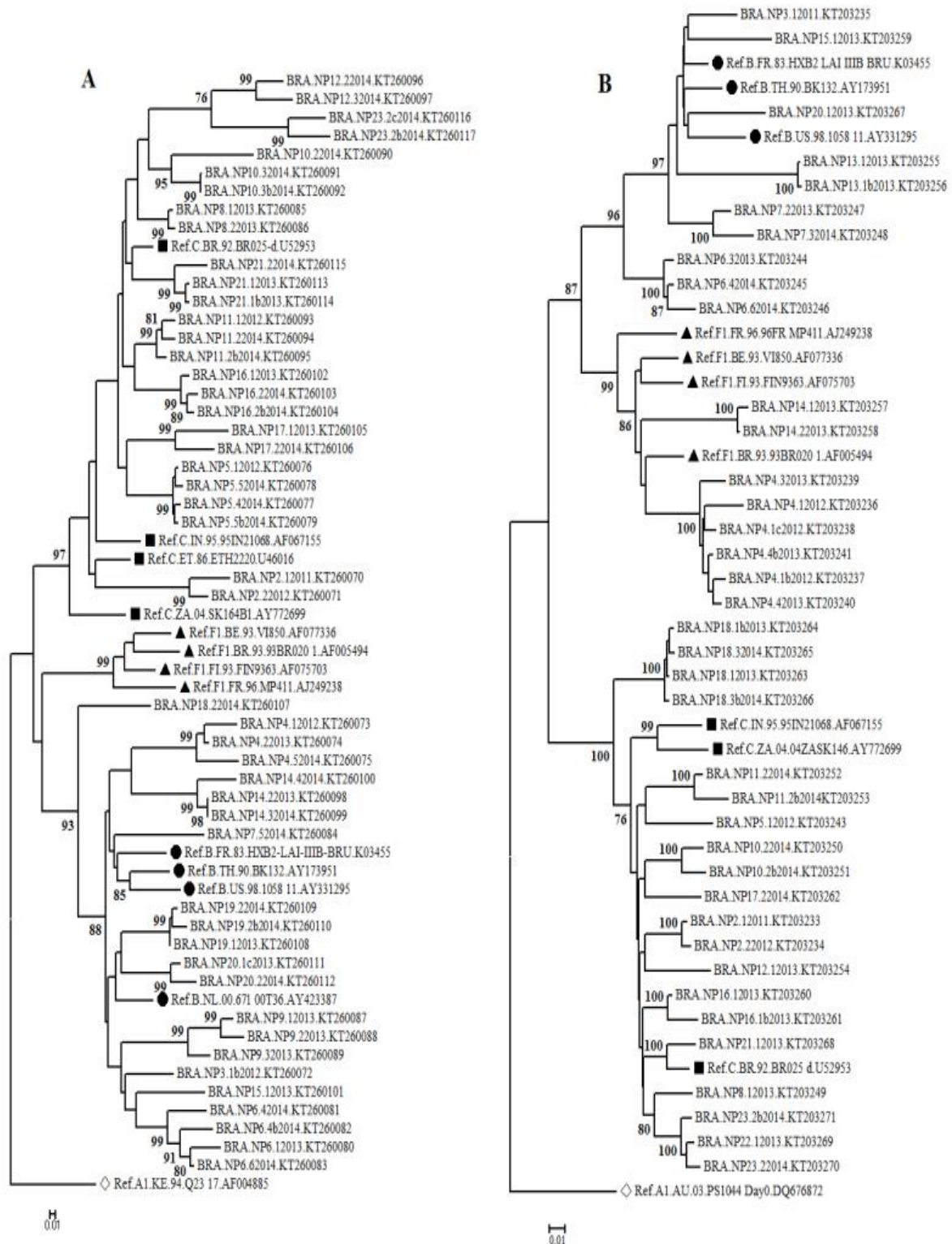
NOTA: Árvore filogenética resultante do sequenciamento da região V3-V5_{gp120} gene *env* HIV-1, por meio do algoritmo de Máxima Verossimilhança. As amostras dos indivíduos LTNP estão nominadas com a inicial BRA. Sequências referências (destacadas com marcadores em vermelho, verde e azul) foram extraídas do banco de dados Los Alamos HIV Database. São mostrados apenas valores de *bootstrap* acima de 70%.

FIGURA 23 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS HIV-1 REGIÃO PR/RT GENE *pol*, GRUPO LTNP



FONTE: A autora (2017).

NOTA: Árvore filogenética resultante do sequenciamento da região PR/TR gene *pol*/HIV-1, por meio do algoritmo de Máxima Verossimilhança. As amostras dos indivíduos LTNP estão nominadas com a inicial BRA. Sequências referências (destacadas com marcadores em vermelho, verde e azul) foram extraídas do banco de dados Los Alamos HIV Database. São mostrados apenas valores de *bootstrap* acima de 70%.

FIGURA 24 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS AMOSTRAS HIV-1, GENES *env* E *pol*, GRUPO LTNP

FONTE: Santos et al (2015).

NOTA: Árvore filogenética pelo algoritmo de Máxima Verossimilhança, obtida a partir do sequenciamento região V3-V5gp120 gene *env* (A) e PR/RT gene *pol* (B). Sequências referências foram obtidas do banco de dados *Los Alamos HIV Database* e estão indicadas com marcador em preto. Sequências das amostras de indivíduos LTNP iniciam com BRA. São mostrados somente valores de *bootstrap* acima de 70%.

Foi realizada avaliação das sequências das amostras classificadas como subtipo B na região *env*, analisando os aminoácidos das posições 15 a 18 da região da coroa da alça V3_{gp120}, para identificação das variantes B. Para tanto foi considerado o que foi proposto no trabalho de Junqueira et al (2013), isso é a avaliação mais direcionada ao segundo aminoácido do tetrapeptídeo. Nessa avaliação, 6/12 (50%) dos indivíduos foram classificados como a variante B pandêmica, com uma prolina na segunda posição (motivo XPXX) e 3/12 (25%) apresentaram a variante brasileira B_{BR}. Motivos diferenciados foram identificados em amostras de três (25%) dos indivíduos avaliados (GLGR e GFGR).

A FIGURA 25 apresenta a avaliação das variantes B, sendo que para alguns casos são demonstradas mais de uma sequência por paciente.

FIGURA 25 - REGIÃO DA COROA DA ALÇA V3_{gp120}, AMOSTRAS DO GRUPO LTNP HIV-1 SUBTIPO B EM *env*

		CTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVTIGKIGNMRQAH
Ref.B.HXB2..K03455		
BRA.NP1		GWGR
BRA.NP9.KT260087	Variante B _{BR}	GWGR
BRA.NP9.KT260088	GWGR	GWGR
BRA.NP18.KT26107		GWGR
BRA.NP3.KT260072		GLGR
BRA.NP6.KT260080		GFGR
BRA.NP6.KT260082		GFGR
BRA.NP6.KT260083		GFGR
BRA.NP15.KT260101		GFGR
BRA.NP4.KT260073		GPGR
BRA.NP4.KT260075		GPGR
BRA.NP4.KT260074		GPGR
BRA.NP7.KT260084		GPG-
BRA.NP13.KX673786	Variante	GPGG
BRA.NP14.KT260098	B-GPGR pandêmica	GPGR
BRA.NP14.KT260099		GPGR
BRA.NP19.KT260108		GPGR
BRA.NP19.KT260109		GPGR
BRA.NP19.KT260110		GPGR
BRA.NP20.KT260112		GPGG

FONTE: A autora (2017).

NOTA: É apresentada apenas a região referente ao motivo X₂XX, para identificação das variantes do subtipo B. Sequência referência HXB2 da alça V3_{gp120}. Para as amostras NP9, NP6, NP4, NP14 e NP19 são mostradas mais de uma sequência.

Devido ao número de indivíduos LTNP ser reduzido, não foi possível avaliar a presença de associação dos referidos motivos da alça V3 com categorias de exposição ao HIV-1, bem como para associação entre os subgrupos LTNP.

5.2.1.1 Avaliação das características clínico-epidemiológicas do grupo LTNP e os subtipos virais

Na avaliação das variáveis epidemiológicas e clínicas e a relação com os subtipos virais (TABELA 3) a variável sexo apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,019$). O subtipo C foi relacionado com sexo feminino (9/12) (75%) e subtipo B com maior número de casos no sexo masculino (6/7) (86%). Todos os casos nos quais o risco de infecção foi a exposição sexual em indivíduos com subtipo B (N=4) ocorreram entre HSH.

TABELA 3 - VARIÁVEIS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS E SUBTIPOS VIRAIS HIV-1, GRUPO LTNP

CARACTERÍSTICA	Subtipo B (N=7)	Subtipo C (N=12)	Recombinantes (N=5)	valor de p
Sexo feminino (%)	1 (14)	9 (75)	4 (80)	0,019
Sexo masculino (%)	6 (86)	3 (25)	1 (20)	
Fator de risco para infecção pelo HIV (%)				
Sexual	4 (57)	8 (66)	4 (80)	0,709
Uso de drogas injetáveis	1 (14)	2 (17)	0 (0)	-
Transmissão vertical	2 (29)	2 (17)	1 (20)	-
Tempo de infecção pelo HIV, anos, mediana (IIQ)	14 (12-19)	13 (11-16)	14 (10-17)	0,459
Classificação dos indivíduos LTNP (%)				
EC	2 (29)	2 (17)	0	-
VC	1 (14)	3 (25)	3 (60)	0,424
VNP	4 (57)	7 (58)	2 (40)	0,111
Células T CD4+, <i>Nadir</i> , cels/ μ L, mediana (IIQ)				
EC	536 (443-857)	541 (442-637)	494 (421-543)	0,461
VC	874 (857-891)	803 (575-1031)	-	
VNP	536	634 (356-638)	433 (409-588)	
	463 (423-595)	524 (436-554)	496 (494-498)	0,77
Células T CD4+, atual, cels/ μ L, mediana (IIQ)				
EC	720 (484-1253)	605 (538-1075)	504 (463-763)	0,418
VC	1414 (1253-1574)	1308 (863-1753)	-	
VNP	720	679 (565-1146)	504 (433-880)	
	559 (457-723)	588 (514-622)	570 (494-646)	0,9
Carga viral \log_{10} , mediana (IIQ)				
EC	< limite de detecção	< limite de detecção	-	
VC	3,24 (2,87-3,78)	2,96 (2,06-3,11)	2,7 (2,69-3,26)	0,9
VNP	4,36 (3,79-4,75)	3,99 (3,87-4,13)	3,95 (3,84-4,07)	0,414

FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: EC - controladores de elite, VC - controladores de viremia, VNP - não progressores virêmicos.

Na avaliação das categorias de exposição para o HIV-1, a categoria transmissão sexual apresentou maior número de casos em indivíduos com subtipo C (50% do total dos casos de transmissão sexual), mas a associação dessa categoria entre os clados apresentou resultado sem diferença estatística ($p= 0,709$). Analisando o subtipo C, houve associação com a categoria de exposição transmissão sexual ($p= 0,011$). Não houve associação entre os subtipos virais e os subgrupos LTNP. Nenhuma das contagens de células T CD4+, tanto *nadir* como atual, mostrou associação com algum dos clados HIV-1. Avaliando os indivíduos LTNP subtipo C (tanto VC como VNP) foi observado que apresentaram carga viral menor quando comparados com os indivíduos com subtipo B, porém com valores sem diferença estatisticamente significativa.

5.2.2 Tropismo viral

Com base no sequenciamento do gene *env*, mais especificamente da região da alça V3 (35 aminoácidos, posição 7110-7217 na sequência referência HXB2) foi determinado o tropismo viral no grupo LTNP com o uso da plataforma *Geno2Pheno*_(coreceptor). Para uma das amostras subtipo C não foi possível realizar a predição do tropismo, pois não houve amplificação do gene *env*. A predição *in silico* mostrou a presença de vírus com tropismo para o correceptor CCR5 (vírus R5) em 22/23 (96%) dos indivíduos LTNP, sendo identificado somente em um indivíduo isolado viral com tropismo para o correceptor CXCR4 (vírus R5/X4 ou X4) (resultado identificado também em amostras sequenciais). Esse mesmo indivíduo também apresentou heterozigose para deleção de 32 pares de base no gene *CCR5* (os dados do polimorfismo serão tratados no subitem específico referente aos marcadores genéticos). No APÊNDICE 5 é demonstrada a plotagem de dois resultados de predição do tropismo viral, um referente ao único caso de vírus R5/X4 ou X4, e outro de vírus R5, utilizando sequências da região V3 em conjunto com marcadores clínicos como contagem de células T CD4+ e CD8+, % de células T CD4+, carga viral e presença de deleção para correceptor CCR5 que foram incluídos na plataforma *Geno2Pheno*_(coreceptor).

5.2.3 Avaliação da presença de mutações de resistência primária

A partir do sequenciamento das regiões da PR e RT do gene *pol* foi analisada a presença de mutações de resistência primária em 23/24 dos integrantes do grupo LTNP. Dentre as sequências analisadas, 2/23 (8,7%) dos indivíduos apresentaram amostras com mutações de resistência primária aos fármacos sendo um indivíduo com presença de mutação acessória na região da PR e outro indivíduo com mutações na região da RT (com presença dessas mutações em mais de uma amostra sequenciada de cada paciente) (TABELA 4). Esses dois indivíduos pertencem ao subgrupo de não progressores virêmicos, isto é, apresentam carga viral acima de 2000 cópias RNA/mL. Várias mutações foram identificadas nas amostras virais dos indivíduos LTNP, tanto na região da PR como da RT, mas não associados a mutações de resistência a fármacos.

Para um indivíduo LTNP, subgrupo controlador de elite (1/4), foi verificada a presença de 6 mutações relacionadas com a indução por APOBEC3G/F, 2 mutações na região da PR e 4 na região da RT.

TABELA 4 - MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA IDENTIFICADAS NO GRUPO LTNP

Identificação	Mutação	Classe	Perfil de Resistência	Subtipo em <i>pol</i>
BRA NP4	N83D	IP	ATV/r - baixo	F
BRA NP13	D67N T215S K219E	ITRN	ABC – baixo; AZT – intermediário; TDF – baixo; DDI – baixo; d4T – intermediário	B

FONTE: A autora (2017)

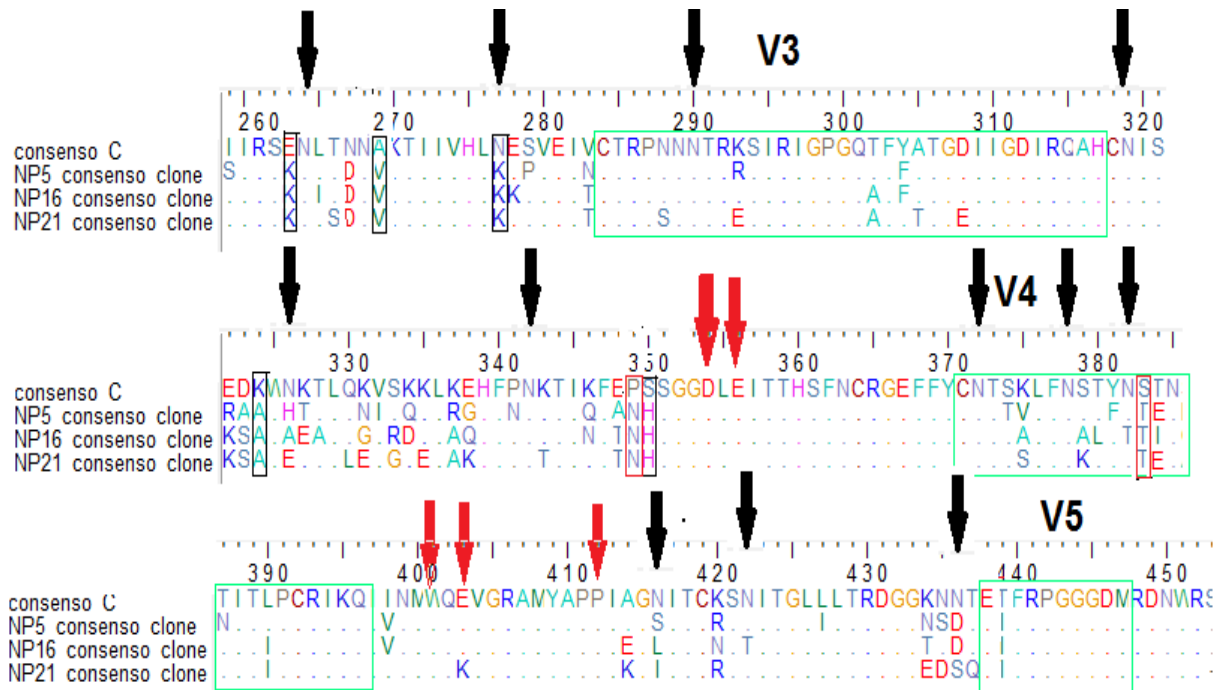
LEGENDA: IP: inibidor de protease; ITRN: inibidor nucleosídico da transcriptase reversa; ATV/r: atazanavir/ritonavir; ABC: abacavir; AZT: zidovudina; TDF: tenofovir DDI: didanosina; d4T: estavudina

5.2.4 Avaliação de mutações na região V3-V5_{gp120}, grupo LTNP subtipo C

As sequências consenso correspondentes a região V3-V5_{gp120} do gene *env*, obtidas por meio do processo de clonagem desses produtos provenientes de 3

indivíduos LTNP do subtipo C (1 controlador de elite e dois controladores de viremia) foram comparados com a sequência consenso para o subtipo C obtida do banco de dados LANL (FIGURA 26). Nessa análise foram detectadas 9 posições de mutações comuns às sequências virais dos 3 casos em avaliação. Na comparação dessas mutações com grupos de sequências HIV-1 subtipo C (grupos 2 a 5 TABELA 5), buscando identificar possíveis assinaturas específicas para as sequências dos indivíduos LTNP, foram identificados as mutações P349N e S383T das regiões C3 e V4, respectivamente, em associação com amostras de indivíduos LTNP, e os polimorfismos E263K, A269V, N277K, K324A e S350H, mostraram associação com amostras brasileiras.

FIGURA 26 - AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NA REGIÃO V3-V5_{GP120} SUBTIPO C



FONTE: A autora (2017).

NOTA: Retângulos pretos indicam as posições de mutações associadas com amostras brasileiras; vermelhos associação com amostras LTNP; Retângulos verdes correspondem às regiões variáveis da gp120; setas vermelhas indicam sítios de ligação ao CD4; setas pretas indicam potenciais sítios de N-glicosilação na sequência consenso C.

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES NA REGIÃO V3-V5_{GP120}, GENE *env* EM AMOSTRAS HIV-1 SUBTIPO C

Posição cons.C (gp120)	Grupo 1 (N=3)	Grupo 2 (N=17)	valor de p	Grupo 3 (N=58)	valor de p	Grupo 4 (N=90)	valor de p	Grupo 5 (N=292)	valor de p
E263K	3	10	0.521	33	0.281	10	0.002	32	0.001
N267D	3	8	0.218	38	0.544	26	0.028	110	0.055
A269V	3	5	0.049	21	0.056	38	0.082	80	0.021
N277K	3	6	0.073	23	0.072	15	0.006	22	<0.001
K324A	3	8	0.218	26	0.101	8	0.001	39	0.0027
<u>P349N</u>	3	6	0.073	12	0.012	6	<0.001	9	<0.0001
S350H	3	5	0.049	39	0.545	15	0.006	45	0.0027
<u>S383T</u>	3	10	0.521	13	0.015	10	0.002	56	0.007
T439I	3	4	0.030	5	0.001	26	0.028	110	0.0553

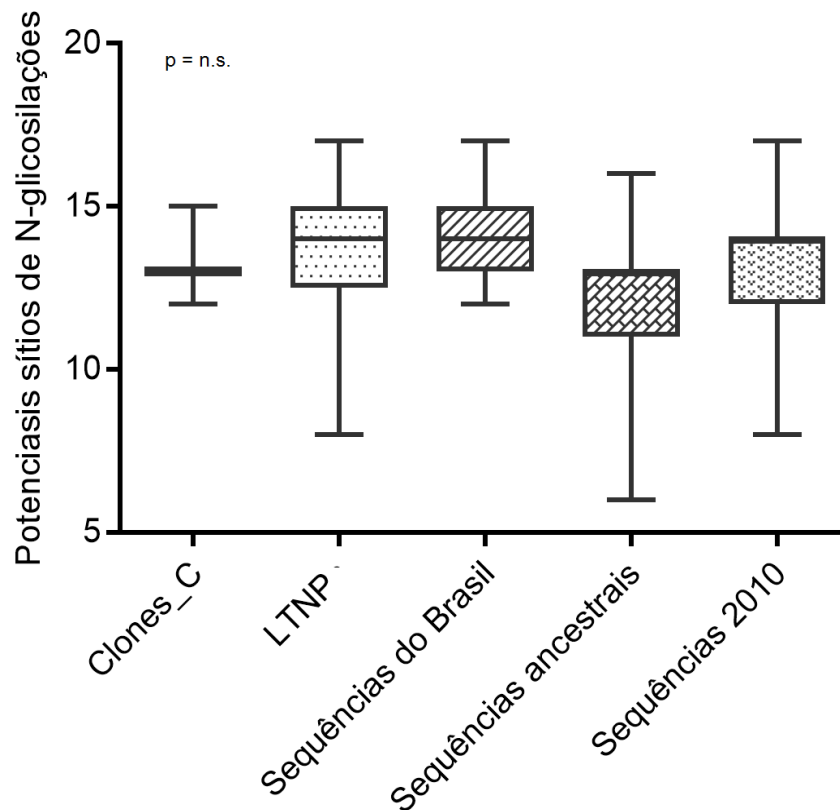
FONTE: A autora (2017).

NOTA: Mutações grafadas em negrito estão associadas a amostras do Brasil. Mutações grafadas em negrito e sublinhadas estão associadas com amostras de indivíduos LTNP. GRUPO 1: sequências consenso de amostras clonadas de indivíduos LTNP desse estudo; GRUPO 2: sequências de indivíduos LTNP do mundo (incluindo LTNP desse estudo); GRUPO 3: Sequências do Brasil; GRUPO 4: Sequências ancestrais (até 1995) do mundo; GRUPO 5: Sequências do mundo, do ano de 2010. Todas as sequências são subtipo C, obtidas do banco de dados *Los Alamos HIV Database*. Posição em *env*, conforme referência consenso C.

5.2.5 Avaliação dos sítios de N-glicosilação região V3-V5_{gp120} grupo LTNP

Na avaliação do número de sítios de N-glicosilação para a região V3-V5_{gp120} entre os diferentes grupos de sequências subtipo C, as amostras que foram clonadas (1 EC e 2 VC) apresentaram o mesmo número de potenciais sítios de N-glicosilação que as sequências de amostras ancestrais, porém sem diferença estatística quando comparados com as demais sequências (sequências C do Brasil, sequências subtipo C de indivíduos LTNP do mundo e sequências subtipo C do ano de 2010) (FIGURA 27).

FIGURA 27 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE SÍTIOS DE N-GLICOSILAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS DE SEQUÊNCIAS - REGIÃO V3-V5_{GP120} SUBTIPO C



FONTE: A autora (2017).

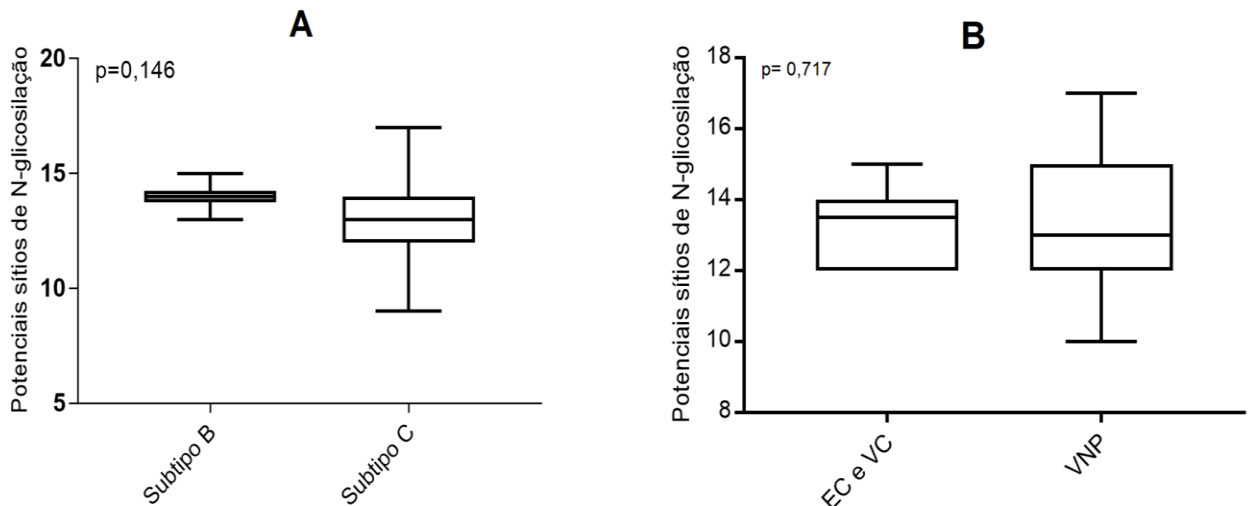
Ainda na avaliação quanto ao número de N-glicosilações também não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as sequências dos subtipos B e C do grupo LTNP ($p=0,146$) (FIGURA 28 A). Na comparação do número dos potenciais sítios de N-glicosilação entre os subgrupos do grupo LTNP desse estudo, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os subgrupos EC e VC quando comparados com o subgrupo VNP ($p=0,717$) (FIGURA 28 B).

Da mesma forma, não foram observadas diferenças na comparação entre o número de N-glicosilações das sequências dos indivíduos EC e VC com sequências de indivíduos progressores do grupo de transmissão vertical ($p=0,099$) ou com progressores de sequências B e C do mundo ($p=0,3334$).

Na análise dos potenciais sítios de N-glicosilação, foi observada nas sequências das 3 amostras *env* subtipo C clonadas a perda de 2 sítios N277 e N326 (posição N289 e N339 em HXB2). Considerando a posição desses potenciais sítios de N-glicosilação na sequência referência HXB2, entre os indivíduos LTNP subtipo

C, 7/11 (63%) apresentaram perda do sítio N289 (região C2) e 7/11 (63%) perda do sítio N339 (região C3). Essas perdas foram menos frequentes nos LTNP subtipo B e recombinantes (TABELA 6).

FIGURA 28 - AVALIAÇÃO DO NÚMERO DE POTENCIAIS SÍTIOS DE N-GLICOSILAÇÃO NO GRUPO LTNP



FONTE: A autora (2017).

NOTA: A – avaliação do número de potenciais sítios de N-glicosilação entre as sequências subtipo B e subtipo C grupo LTNP; B - avaliação do número de potenciais sítios de N-glicosilação entre as sequências dos subgrupos EC/VC e VNP.

TABELA 6 - PRESENÇA DE MUTAÇÃO NOS POTENCIAIS SÍTIOS DE N-GLICOSILAÇÃO N289 E N339 EM AMOSTRAS GRUPO LTNP

Sequências LTNP	Mutação sítio N289	Mutação sítio N339	Mutações N289 e N339
Clones subtipo C	3/3 (100%)	3/3 (100%)	3/3 (100%)
LTNP subtipo C	7/11 (63%)	7/11 (63%)	6/11 (54%)
LTNP subtipo B	1/7 (14%)	2/7 (28,6%)	0/7
LTNP recombinantes	0/5	2/5 (40%)	0/5

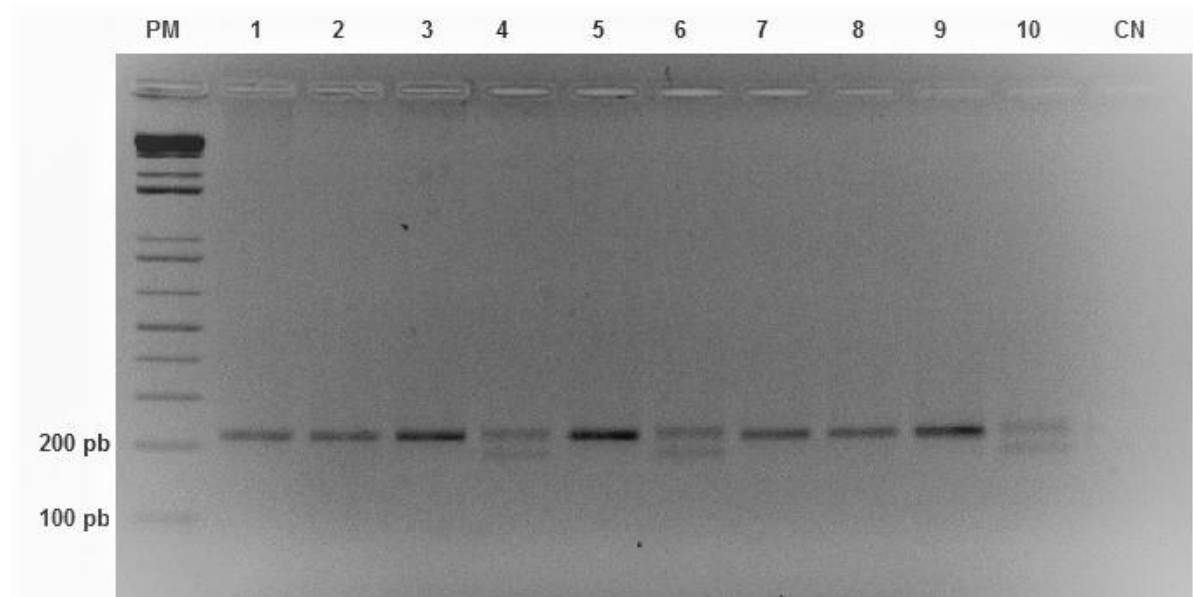
FONTE: A autora (2017).

5.3 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO HOSPEDEIRO NO GRUPO LTNP

5.3.1 Avaliação da presença de deleção de 32 pb no gene *CCR5*

A partir da análise dos produtos amplificados para o gene *CCR5* foi observada a presença de heterozigose para a deleção de 32 pb ($\Delta 32\text{CCR5}/\text{CCR5}$) em 4/24 (17%) dos indivíduos LTNP, sendo verificada em dois indivíduos controladores de viremia e em dois indivíduos não progressores virêmicos. Os demais indivíduos LTNP (20/24) apresentaram padrão homozigótico, *CCR5/CCR5* sem deleção. Um dos casos em que foi observada a presença da heterozigose para a deleção de 32 pb é referente ao único indivíduo desse estudo que também apresentou tropismo viral R5/X4. A FIGURA 29 mostra os produtos amplificados das amostras de alguns dos indivíduos do grupo LTNP analisados para a identificação da presença da deleção de 32 pb no gene *CCR5*.

FIGURA 29 - AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE DELEÇÃO DE 32 pb NO GENE *CCR5* EM AMOSTRAS DE INDIVÍDUOS DO GRUPO LTNP



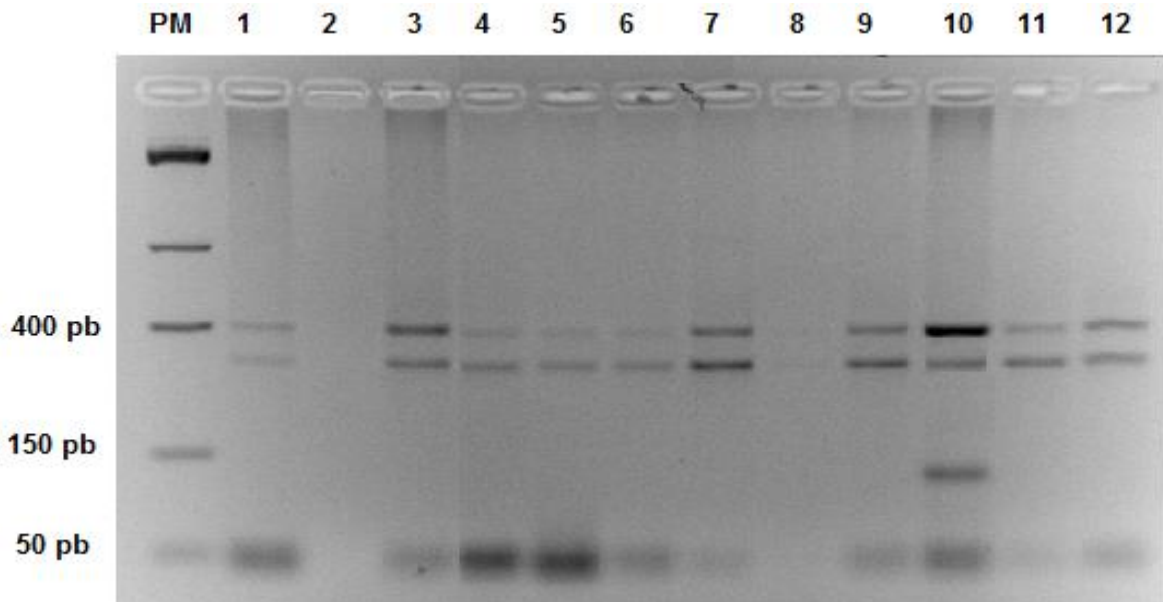
FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: PM: peso molecular 100 pares de base (*Invitrogen® Carlsbad, EUA*), gel de agarose 2%. CN: controle negativo. Colunas 1, 2, 3, 5, 7, 8 e 9 apresentam amostras de indivíduos LTNP homozigotos sem deleção (*CCR5/CCR5*) e colunas 4, 6 e 10 apresentam amostras heterozigotas ($\Delta 32\text{CCR5}/\text{CCR5}$) para a deleção de 32 pb.

5.3.2 Avaliação do polimorfismo *rs12979860* IL28B

Na avaliação do polimorfismo *rs12979860* localizado próximo da região codificante para a IL28B, 21/24 (87,5%) dos indivíduos LTNP apresentaram o genótipo C/C. Em 3/24 (12,5%) dos indivíduos LTNP os produtos amplificados caracterizaram esses indivíduos com o genótipo C/T. Não foi observado o genótipo T/T entre os indivíduos LTNP. A FIGURA 30 apresenta resultados do polimorfismo *rs12979860* a partir da avaliação dos produtos amplificados. Entre os subgrupos LTNP não foi observada diferença estatística quanto a presença do genótipo C/C ($p=0.707$) (TABELA 7).

FIGURA 30 - AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO *rs12979860* NOS INDIVÍDUOS LTNP



FONTE: A autora (2017).

NOTA: Avaliação do polimorfismo *rs12979860* - PM: peso molecular DNA *size Lambda* gel de agarose 2%. Colunas 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 e 12 apresentam amostras de indivíduos LTNP genótipo C/C; coluna 2 amostra negativa para a reação; coluna 8 amostra com genótipo C/C fracamente positiva; coluna 10 amostra genótipo C/T.

TABELA 7 - AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO *rs12979860* NOS INDIVÍDUOS DOS SUBGRUPOS LTNP

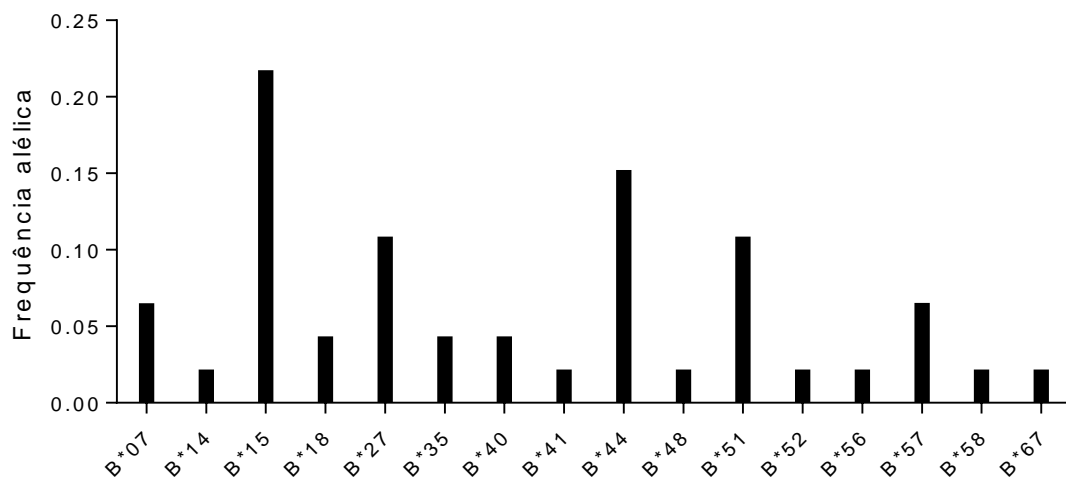
Polimorfismo <i>rs12979860</i> genótipo	EC (N=4)	VC (N=7)	VNP (N=13)	valor de p
C/C	4 (100%)	6 (86%)	11 (85%)	0.707
C/T	0	1 (14%)	2 (15%)	

FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: EC – controlador de elite; VC – controlador de viremia; VNP – não-progressor virêmico.

5.3.3 Avaliação da genotipagem *HLA-B* no grupo de indivíduos LTNP

Foi realizada a genotipagem *HLA-B* para 23/24 (96%) dos indivíduos do grupo LTNP. Foram identificados no grupo LTNP a presença de 16 diferentes grupos alélicos *HLA-B*, sendo que cinco, *HLA-B*15*, *B*44*, *B*51*, *B*27* e *B*57* representaram praticamente 2/3 de todos os alelos presentes, correspondendo às frequências alélicas de 0,217, 0,152, 0,109, 0,109 e 0,065, respectivamente (FIGURA 31). Essas frequências alélicas apresentaram algumas diferenças na avaliação por subgrupos LTNP isolados, porém sem significância estatística (TABELA 8).

FIGURA 31 - GRUPOS ALÉLICOS *HLA-B* E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NO GRUPO LTNP

FONTE: A autora (2017)

TABELA 8 - ALELOS *HLA-B* E FREQUÊNCIAS ALÉLICAS NO GRUPO LTNP E SUBGRUPOS

Alelos <i>HLA-B</i>	LTNP 2n=46 f.a.	EC 2n=8 f.a.	VC 2n=12 f.a.	VNP 2n=26 f.a.	valor de p ¹	EC/VC 2n=20 f.a.	valor de p ²
<i>B*27</i>	0,109	0	0,167	0,115	-	0,1	1
<i>B*57</i>	0,065	0,125	0,083	0,038	0,657	0,1	0,572
<i>B*44</i>	0,152	0,375	0,167	0,077	0,12	0,25	0,213
<i>B*51</i>	0,109	0,25	0,083	0,077	0,368	0,15	0,639
<i>B*15</i>	0,217	0	0,083	0,346	-	0,05	0,027

FONTE: A autora (2017).

NOTA: ¹ valor de *p* calculado entre subgrupos EC-VC-VNP; ² valor de *p* calculado entre o conjunto EC/VC e VNP.

LEGENDA: EC – controlador de elite; VC – controlador de viremia; VNP – não-progressor virêmico; f.a- frequência alélica

O alelo *HLA-B*15* apresentou maior frequência alélica no subgrupo VNP com diferença estatisticamente significativa na comparação com o conjunto dos subgrupos EC/VC ($p=0,027$).

Considerando os subgrupos EC e VC juntos, 8/10 (80%) dos indivíduos apresentaram pelo menos um alelo *HLA-B* (*B*27*, *B*44*, *B*51*, *B*57*) já reportado na literatura como potencialmente protetivo para a evolução para aids. Já avaliando somente o grupo EC, 100% desses apresentaram ao menos um desses alelos protetores (PEREYRA et al., 2010; TANG et al., 2011; MARTIN; CARRINGTON, 2013; PETERSON et al., 2013; ZHANG et al., 2013).

Nas avaliações entre os clados HIV-1 B e C não foi observada nenhuma associação com determinado grupo alélico *HLA-B* no grupo LTNP (*B*15* $p=0,209$; *B*27* $p=1,00$; *B*44* $p=0,356$; *B*51* $p=1,00$; *B*57* $p=1,00$).

5.3.4 Avaliação das quimiocinas CXCL8 (IL-8) e CXCL10 (IP-10)

As análises das dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 foram realizadas para 18/24 (75%) dos indivíduos LTNP. Os dados de uma única amostra de cada indivíduo foram utilizados para as avaliações de correlação entre as

dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 com a carga viral e contagem de células T CD4+ e CD8+.

Nas TABELAS 9 e 10 são apresentados os valores das dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 nos diferentes subgrupos LTNP e nos grupos de indivíduos HIV-1 progressores (em tratamento).

TABELA 9 - DOSAGENS PLASMÁTICAS DAS QUIMIOCINAS IL-8 E IP-10 NO GRUPO LTNP E SUBGRUPOS

Quimiocina	LTNP (N=18)	EC (N=3)	VC (N=6)	VNP (N=9)	valor de p
IL-8, pg/mL, mediana (IIQ)	0,2 (0,2-6,02)	0,2 (0,2-3,85)	2,78 (0,2-13,57)	0,2 (0,2-6,68)	0,64
IP-10, pg/mL, mediana (IIQ)	852 (596-1050)	416 (325-506)	852 (804-904)	1050 (684-298)	0,01

FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: IIQ - intervalo interquartil; EC – controlador de elite; VC – controlador de viremia; VNP – não-progressor virêmico.

TABELA 10 – DOSAGENS PLASMÁTICAS DAS QUIMIOCINAS IL-8 E IP-10 NO GRUPO DE INDIVÍDUOS HIV-1 PROGRESSORES COMPARANDO COM INDIVÍDUOS RESPONDEDORES OU NÃO À TARV

Quimiocina	Progressores (N = 38)	TARV respondedores (N = 28)	TARV não-respondedores (N = 10)	valor de p
IL-8, pg/mL, mediana (IIQ)	9,84 (4,90-15,76)	9,29 (4,78-16,3)	11,63 (8,18-14,68)	0,55
IP-10, pg/mL, mediana (IIQ)	605,7 (317-889,9)	420,42 (284-765)	785,40 (674-983)	0,01

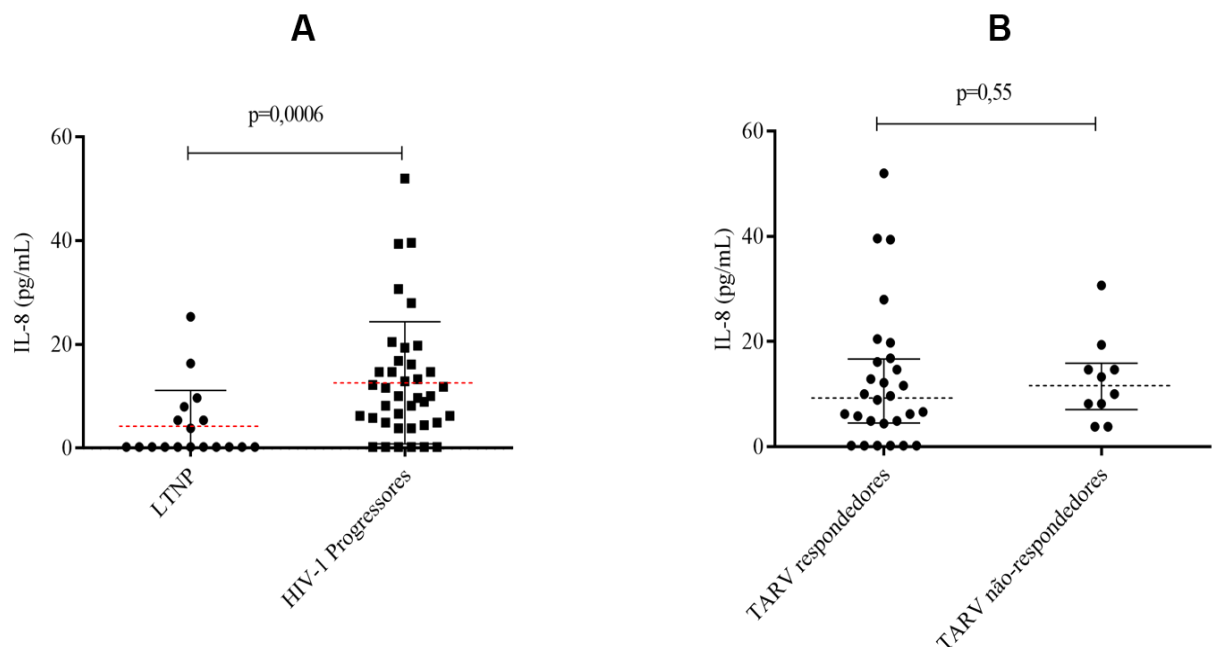
FONTE: A autora (2017)

LEGENDA: IIQ - intervalo interquartil; TARV – terapia antirretroviral.

5.3.4.1 Avaliação das dosagens plasmáticas da quimiocina IL-8

Na avaliação das dosagens plasmáticas da quimiocina IL-8 não foi observada diferença nos subgrupos LTNP ($p= 0,64$) (TABELA 9). Na comparação das dosagens entre os diferentes grupos avaliados, o grupo LTNP apresentou menor dosagem de IL-8 quando comparado ao grupo de indivíduos HIV-1 progressores ($p= 0,0006$) (FIGURA 32A). Não foi observada diferença nas dosagens plasmáticas de IL-8 entre os indivíduos progressores TARV respondedores e TARV não-respondedores ($p= 0,55$) (TABELA 10) (FIGURA 32B).

FIGURA 32 - DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IL-8 ENTRE OS DIFERENTES GRUPOS AVALIADOS



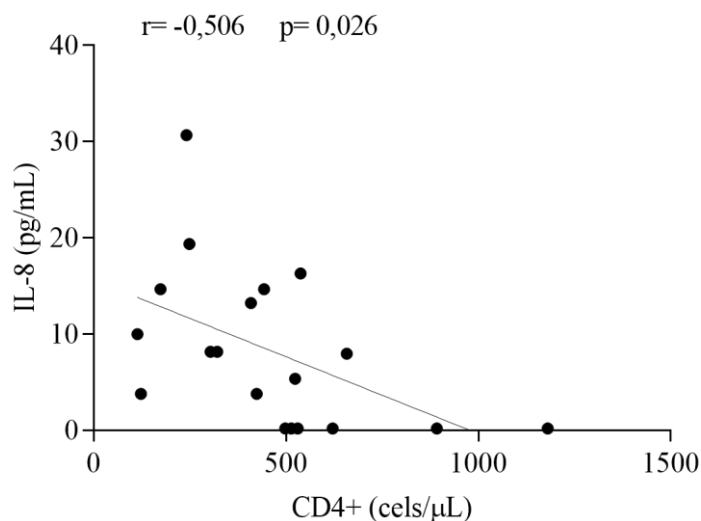
FONTE: A autora (2017).

NOTA: A: avaliação dos valores plasmáticos de IL-8 entre os indivíduos LTNP e HIV-1 progressores;
B: avaliação dos valores plasmáticos de IL-8 entre os indivíduos HIV-1 progressores TARV respondedores e TARV não-respondedores.

Observou-se correlação negativa entre a contagem de células T CD4+ e as dosagens plasmáticas de IL-8 em indivíduos com viremia ($r= -0,506$; $p= 0,026$) (FIGURA 33) e uma correlação positiva entre a contagem de células T CD8+ e as dosagens plasmáticas de IL-8 no grupo HIV-1 progressores ($r= 0,35$; $p= 0,03$) (FIGURA 34). Nas avaliações, não foram observadas correlação entre os valores de carga viral e dosagem de IL-8 em nenhum dos grupos avaliados.

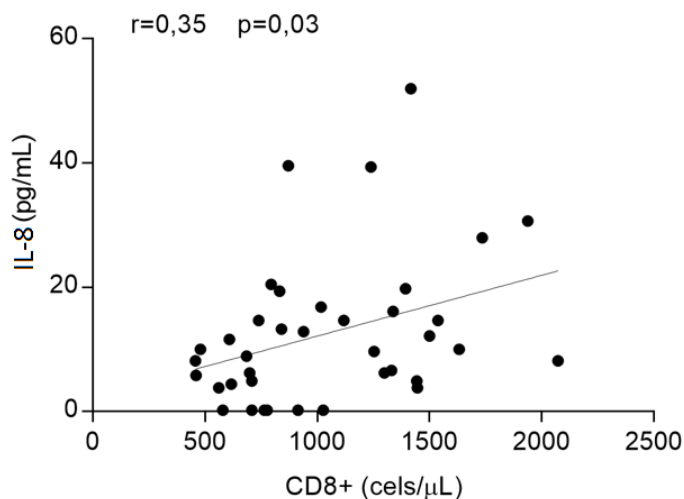
Na avaliação da dosagem da quimiocina IL-8 entre os subtipos HIV-1 (grupo LTNP) não foi observada diferença estatística entre as mensurações ($p=0,98$) (TABELA 11).

FIGURA 33 - CORRELAÇÃO ENTRE VALORES PLASMÁTICOS DE IL-8 E CONTAGEM DE CÉLULAS T CD4+ ENTRE INDIVÍDUOS AVALIADOS COM VIREMIA



FONTE: A autora (2017).

FIGURA 34 - CORRELAÇÃO ENTRE AS DOSAGENS PLASMÁTICAS DE IL-8 E CONTAGEM DE CÉLULAS T CD8+



FONTE: A autora (2017).

NOTA: A: correlação das dosagens plasmáticas de IL-8 e contagem de células T CD8+ no grupo de indivíduos HIV-1 progressores.

TABELA 11 – DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IL-8 ENTRE OS DIFERENTES CLADOS HIV-1, GRUPO LTNP

Quimiocina	Subtipo B (N=4)	Subtipo C (N=11)	Recombinantes (N=3)	valor de p
IL-8, pg/mL, mediana (IIQ)	2,013 (0,2-4,984)	0,2 (0,2-7,99)	0,2 (0,2-25,32)	0,985

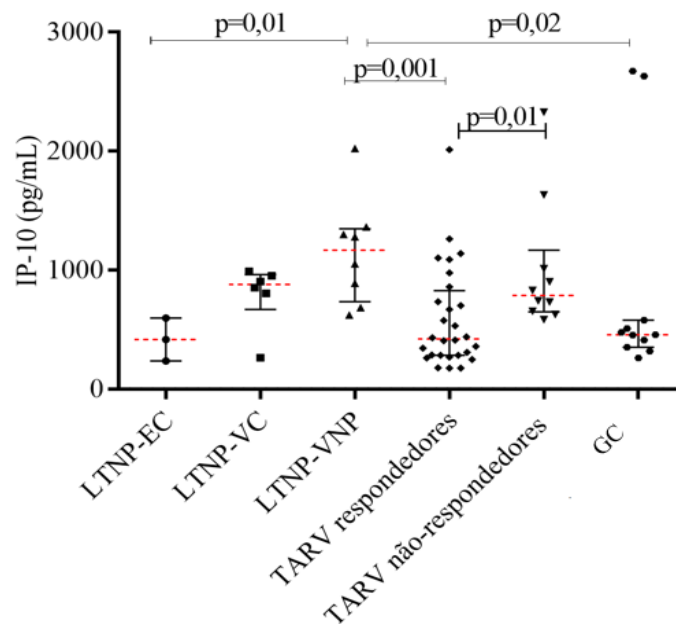
FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: IIQ - intervalo interquartil.

5.3.4.2 Avaliação das dosagens plasmáticas da quimiocina IP-10

A análise das dosagens plasmáticas da quimiocina IP-10 mostrou associação com a presença de viremia para o HIV-1, sendo observada diferença nas dosagens entre os grupos avaliados, (TABELAS 9 e 10), tendo os indivíduos do subgrupo EC dosagem semelhante aos indivíduos TARV respondedores e indivíduos do grupo saudável (p= 0,68) (FIGURA 35).

FIGURA 35 - DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 NOS DIFERENTES GRUPOS AVALIADOS

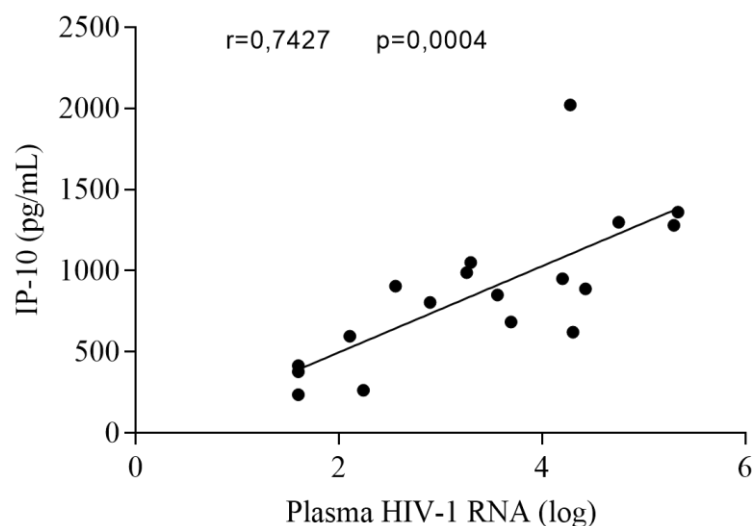


FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: EC – controlador de elite; VC – controlador de viremia; VNP – não-progressor virêmico; TARV- terapia antirretroviral; GC – grupo controle.

Observou-se uma correlação positiva entre a dosagem plasmática de IP-10 e os valores de carga viral para o HIV-1 entre os indivíduos virêmicos ($r= 0,434$; $p= 0,032$), sendo maior essa correlação quando foram avaliados em separado os indivíduos do grupo LTNP ($r= 0,7427$; $p= 0,0004$) (FIGURA 36).

FIGURA 36 - CORRELAÇÃO DA DOSAGEM PLASMÁTICA DA QUIMIOCINA IP-10 E CARGA VIRAL_{log} GRUPO LTNP

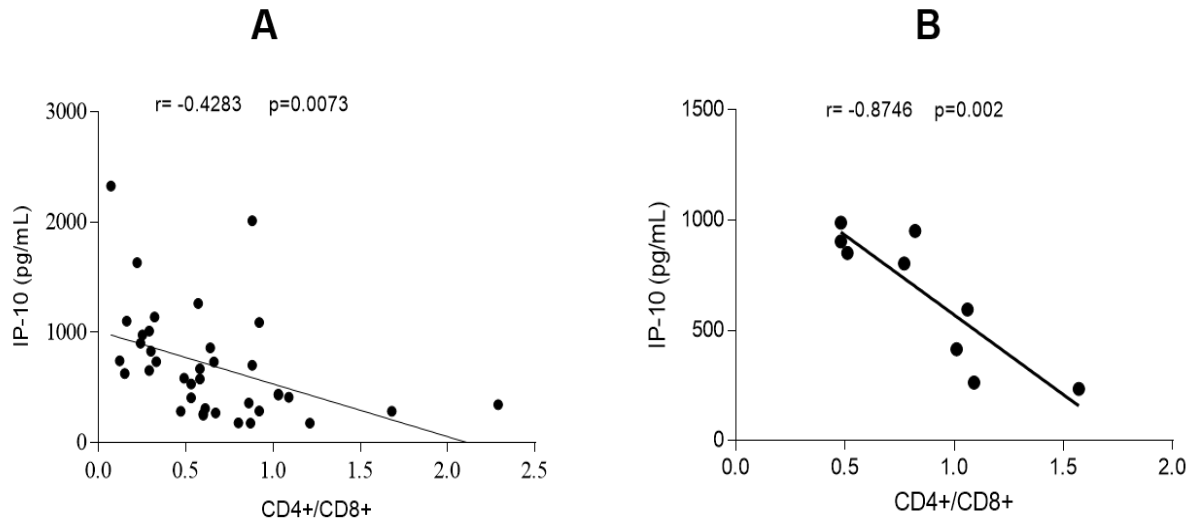


FONTE: A autora (2017).

Nas análises, verificou-se uma correlação negativa entre os valores plasmáticos da quimiocina IP-10 e a razão de células T CD4+/CD8+, tanto no grupo de indivíduos HIV-1 progressores ($r= -0,4283$; $p= 0,0073$), quanto no subgrupo conjunto de indivíduos EC e VC ($r= -0,8746$; $p= 0,002$) (FIGURA 37 A e B). Adicionalmente, a contagem de células T CD4+ foi negativamente correlacionada com as dosagens plasmáticas da quimiocina IP-10 no grupo de indivíduos progressores ($r= -0,4404$; $p= 0,005$), e com a % de células T CD4+ do subgrupo conjunto de EC e VC ($r= -0,7994$; $p= 0,0009$) (FIGURA 38 A e B). Por último, não foi observada correlação entre as dosagens plasmáticas da quimiocina IP-10 com as contagens de células T CD8+ em nenhum dos grupos avaliados.

Quanto a avaliação das dosagens plasmáticas de IP-10 entre os diferentes clados HIV-1, não foi observada associação entre a dosagem dessa quimiocina com subtipos B, C ou recombinantes no grupo LTNP ($p= 0,515$) (TABELA 12).

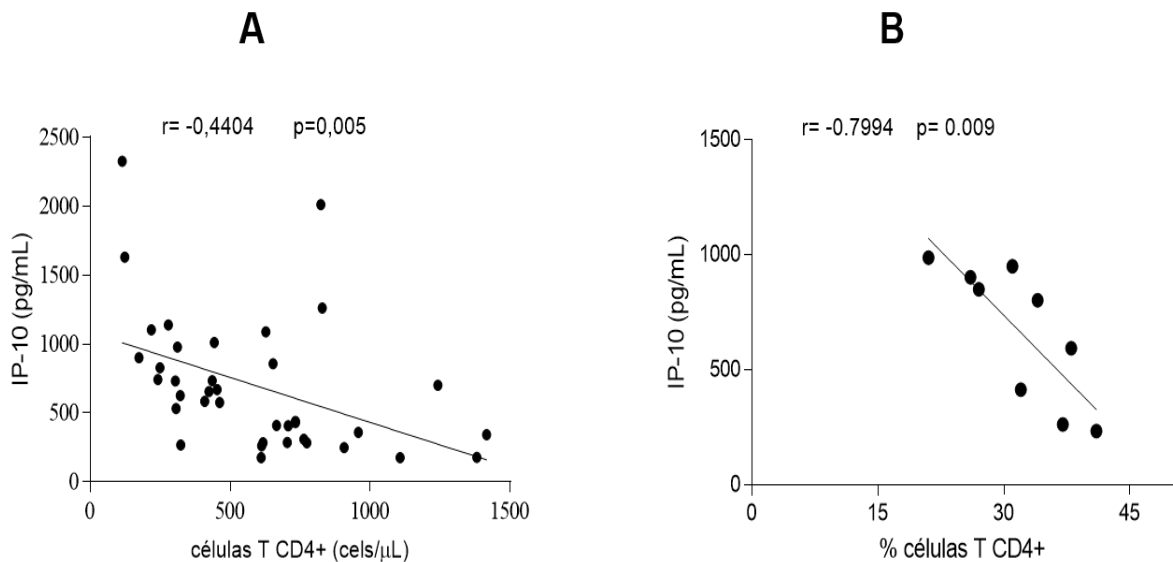
FIGURA 37 - CORRELAÇÃO DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 E RAZÃO DE CÉLULAS T CD4+/CD8+



FONTE: A autora (2017).

NOTA: A: correlação das dosagens plasmáticas de IP-10 e CD4+/CD8+ no grupo de indivíduos HIV-1 progressores; B: correlação das dosagens plasmáticas de IP-10 e CD4+/CD8+ no subgrupo conjunto de indivíduos EC e VC.

FIGURA 38 - CORRELAÇÃO DAS DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 E CÉLULAS T CD4+



FONTE: A autora (2017)

NOTA: A: correlação das dosagens plasmáticas de IP-10 e contagem de células T CD4+ no grupo de indivíduos HIV-1 progressores; B: correlação das dosagens plasmáticas de IP-10 e % de células T CD4+ no subgrupo conjunto de indivíduos EC e VC.

TABELA 12 - DOSAGENS PLASMÁTICAS DA QUIMIOCINA IP-10 ENTRE OS DIFERENTES CLADOS HIV-1, GRUPO LTNP

Quimiocina	Subtipo B (N=4)	Subtipo C (N=11)	Recombinantes (N=3)	valor de p
IP-10, pg/mL, mediana (IIQ)	614,8 (271,2-1001)	887,8 (596-1298)	904,5 (621-951,5)	0,515

FONTE: A autora (2017).

LEGENDA: IIQ - intervalo interquartil.

6 DISCUSSÃO

Vários estudos indicam que tanto fatores virais como do hospedeiro humano podem estar associados com não progressão ou progressão lenta para aids nos indivíduos HIV-1 LTNP (SANDONIS et al., 2009; CASADO et al., 2010; CASADO et al., 2013; MARTIN; CARRINGTON, 2013; KLATT et al., 2014; PLATTEN et al., 2016). Este presente trabalho procurou identificar e caracterizar os indivíduos LTNP em atendimento no Ambulatório de Infectologia do HC-UFPR.

Embora o número de indivíduos LTNP incluídos no estudo seja pequeno (N=24) representando aproximadamente 1,7% do total de indivíduos atendidos, está de acordo com o que é descrito na literatura para a ocorrência de casos de indivíduos HIV-1 LTNP (SABIN; LUNDGREN, 2013). Estudos com indivíduos LTNP no Brasil apresentam um número de casos semelhante ao do presente trabalho (PASSAES et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014; CORTES et al., 2015; LEITE et al., 2017).

Características epidemiológicas e clínicas dos indivíduos LTNP

Quanto à caracterização dos indivíduos LTNP, utilizando como critério de classificação o controle da replicação viral, os indivíduos do subgrupo controladores de elite apresentaram melhores parâmetros de contagem de células T CD4+, bem como na razão CD4+/CD8+, principalmente quando comparados com o subgrupo de não-progressores virêmicos. O perfil de controle da replicação viral desses indivíduos controladores de elite e controladores de viremia pode estar associado a eventos que ocorrem desde a fase aguda da infecção (HAASE et al., 2010; MIURA et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010). Já para os indivíduos classificados como não-progressores virêmicos, que representaram 54% dos indivíduos LTNP desse estudo, os mecanismos de controle de progressão para aids podem também estar associados a outros fatores como expressão do correceptor CCR5 e menor infecção em células T CD4+ de memória central, como já referenciado em outros estudos com indivíduos não progressores virêmicos (KLATT et al., 2014; MUENCHHOEFF et al., 2016). Referente aos indivíduos desse estudo infectados pelo HIV-1 por meio de transmissão vertical (N=5), todos apresentavam carga viral maior que 2000 cópias RNA/mL, e foram classificados como não-progressores virêmicos. Os estudos com indivíduos pediátricos não-progressores também mostram que o padrão de

replicação viral baixo ou indetectável é muito raro para esse grupo (GOULDER; LEWIN; LEITMAN, 2016).

A transmissão sexual foi o principal fator de risco para a infecção pelo HIV-1 entre os indivíduos LTNP desse presente estudo. Não foi verificada diferença na distribuição do número de casos por sexo, mas foi observada uma predominância do sexo feminino relacionado ao subtipo C e do sexo masculino ao subtipo B, sendo que todos os casos de HIV-1 subtipo B com infecção por transmissão sexual foram entre HSH. Apesar do pequeno número de indivíduos avaliados nesse estudo, e mesmo com ampla diversificação das vias de transmissão de todos os clados de HIV-1, alguns estudos da região sul do Brasil têm demonstrado que o subtipo C está frequentemente relacionado com a população heterossexual, com uma alta prevalência desse clado entre mulheres, e o subtipo B mais relacionado a HSH (RABONI et al., 2010; GRAF et al., 2011; SILVA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2012; GRAF et al., 2016).

Distribuição dos clados HIV-1 no grupo LTNP e características virais associadas

A distribuição dos clados HIV-1 no grupo LTNP, com maior ocorrência do subtipo C (50%), demonstra o perfil diferenciado que a região Sul do Brasil apresenta na comparação com as demais regiões brasileiras, onde a epidemia molecular do HIV-1 está relacionada principalmente ao subtipo B e recombinante BF (ALENCAR et al., 2013; LEITE et al., 2017). Estudos da região Sul do Brasil mostram uma alta frequência do subtipo C (40% - 80%) e recombinantes BC, com algumas diferenças nessas proporções entre os Estados (RABONI et al., 2010; GRAF et al., 2013; GRAF et al., 2016). A ocorrência de maior número de casos de indivíduos infectados com subtipo C na região Sul do país pode estar relacionado ao “efeito fundador” desse subtipo no Estado do Paraná (BELLO et al., 2008; VERAS et al., 2011; BELLO et al., 2012b), e a ocorrência das cadeias de transmissão desse clado que, segundo estudos, inicialmente foi introduzido no grupo heterossexual e posteriormente entre HSH. Estudos demonstram que a transmissão heterossexual do subtipo C ainda atua como um importante fator de estabelecimento e difusão desse clado no Brasil (GRAF et al., 2016). A menor razão de casos de infecção por HIV-1 entre homens e mulheres observada na região Sul do Brasil também pode estar relacionada à influência da epidemiologia molecular diferenciada da região Sul com o restante do país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Na avaliação dos valores de carga viral dos indivíduos dos grupos controladores de viremia e não progressores virêmicos foi observado nesse estudo que os indivíduos com HIV-1 subtipo C apresentaram menores valores de carga viral que o subtipo B, embora o fato do número de indivíduos incluídos em cada subgrupo ser muito pequeno para determinar a significância dessas diferenças. Estudos *in vitro* sugerem que a replicação do subtipo C parece ser menos competente que outros subtipos ou apresentar igual aptidão de transmissão viral que os outros subtipos, mas ter propriedade patogênica reduzida (ARIEN et al., 2005; TEBIT et al., 2007; ABRAHA et al., 2009). O estudo longitudinal de Venner et al (2016) identificou que as pacientes classificadas como controladores de viremia do subtipo C apresentaram menor carga viral quando comparadas com os outros clados, e que a menor patogenicidade do subtipo C foi preditivo de progressão mais lenta para aids. Ainda nesse estudo, avaliações *in vitro* mostraram que isolados HIV-1 subtipo C apresentaram menor capacidade replicativa que isolados dos subtipos B, D e A, e sugere a possibilidade de que a expansão global da epidemia pelo subtipo C poderia estar relacionada a menor “virulência” desse subtipo, propiciando maiores períodos assintomáticos da infecção e aumentando as oportunidades para a transmissão comparado aos demais subtipos. No presente estudo a maior frequência de infecções pelo subtipo C (50%) entre os indivíduos LTNP, pode estar relacionado a maior ocorrência desse subtipo na região ou a características virais próprias desses isolados.

Entre os indivíduos LTNP subtipo B para a região *env* desse estudo, 25% apresentaram a variante brasileira B_{BR}, o que corrobora os achados de outros estudos que indicam que essa variante ocorre em cerca de 20% a 30% dos casos de infecção pelo subtipo B no país, se apresentando em valores epidêmicos restritamente no Brasil (JUNQUEIRA et al., 2013; PIMENTEL et al., 2013; LEITE et al., 2017). Essa variante brasileira já foi identificada em alguns estudos como sendo menos patogênica que a variante B pandêmica (DIAZ et al., 2008; ARAÚJO et al., 2010), porém devido ao número de indivíduos LTNP subtipo B do presente estudo ser pequeno, não foi possível avaliar a associação das variantes com os subgrupos LTNP, bem como com as categorias de exposição ao HIV-1. Mudanças na estrutura secundária da coroa da alça V3_{gp120} poderiam refletir em alterações nas propriedades bioquímicas e biológicas dessas linhagens B_{BR}, podendo influenciar no perfil de progressão da infecção (MORGADO et al., 1996), como pela possibilidade

de maior avidéz dos anticorpos direcionados a região V3_{gp120} desses vírus (DE BRITO et al., 2006). O estudo de Leite e colaboradores (2017) identificou perfis similares de progressão para aids entre infecções pelo subtipo B com as variantes pandêmica e brasileira, sendo identificados entre os indivíduos classificados como LTNP 27,7% apresentando a variável B_{BR}, dado esse que corrobora os achados do presente estudo.

Ainda referente ao motivo da coroa da alça V3_{gp120} subtipo B, 3 (25%) dos indivíduos LTNP do presente estudo apresentaram variantes com os motivos diferenciados GLGR e GFGR. Alguns estudos têm mostrado uma possível associação do motivo GWG (variante B_{BR}) como um estado de transição para outras variantes GXG, sugerindo que talvez não poderiam ser tratados como vírus independentes, sendo que a derivação do motivo GLG poderia ser proveniente de linhagens da variante brasileira GWG por ocorrência de uma simples mutação no códon TGG (W) para TTG (L) com derivação para o motivo GFG (códon TTT ou TTC) (COVAS et al., 1998; PIMENTEL et al., 2013). No presente estudo a sequência com motivo XLXX apresentou o códon TTG e as sequências XFXX o códon TTT.

Características virais do grupo LTNP - Tropismo viral e presença de mutações de resistência primária aos fármacos

As plataformas de predição genotípica têm sido amplamente utilizadas para determinar o correceptor que está sendo utilizado pela linhagem viral infectante (ARRUDA et al., 2014; FABENI et al., 2015). Na grande maioria das infecções pelo HIV-1, os vírus R5 predominam durante a fase inicial da infecção, sendo que com o tempo ocorre o surgimento de vírus X4, geralmente em associação com depleção de células T CD4+ e progressão clínica para aids (XIAO et al., 1998; JEKLE et al., 2003; MEEHAN et al., 2010). Na avaliação quanto ao tropismo viral das amostras dos indivíduos LTNP desse estudo, quase a totalidade desses (96%) apresentou linhagens virais com tropismo R5, independentemente do subtipo apresentado, portanto, com associação ao tropismo associado a fase assintomática da infecção e assim evidenciando o perfil de controle da progressão para aids nesse grupo. O uso do correceptor CXCR4 tem sido amplamente documentado em linhagens virais do HIV-1 com progressão da infecção em indivíduos não tratados ou em falha terapêutica, onde o aparecimento de linhagens virais X4 parece ser bem evidentes para o subtipo B com o aparecimento desse tropismo em cerca de 50% dos casos

ao longo do tempo (PEETERS et al., 1999; TEBIT et al., 2007; ESBJORNSSON et al., 2010). A mudança de tropismo, de vírus R5 para X4 em infecções com subtipo C, ao longo do curso da infecção, parece ser bem menos pronunciada e parece estar relacionada com mais mutações em *env* quando comparado aos outros subtipos, como mostrado no estudo de Coetzer et al (2011), sugerindo que as barreiras para o uso do correceptor CXCR4 são maiores do que para o subtipo B. O único caso do atual estudo (1/23 do grupo LTNP) que apresentou tropismo viral R5/X4 é um indivíduo controlador de viremia que também apresenta heterozigose para a deleção de 32 pb no gene *CCR5* ($\Delta 32CCR5/CCR5$), com manutenção do quadro assintomático e do estado LTNP, apresentando contagem de células T CD4+ estáveis durante todo o seu histórico evolutivo. O estudo conduzido por Foster e colaboradores (2015) identificou, entre indivíduos LTNP, 18% de aparecimento de vírus X4 durante o seguimento clínico, da mesma forma sem alteração do perfil LTNP, em concordância com o atual estudo.

Na avaliação das sequências dos indivíduos LTNP desse estudo, não foram observadas grandes deleções ou inserções nas regiões da PR ou RT do gene *pol* ou na região V3-V5 do gene *env*. A presença de sequências com grandes deleções, além de mutações pontuais infrequentes, foi demonstrada em estudo com indivíduos LTNP HIV-1 subtipo B, na região 5'LTR-*gag* (deleções de tamanho variável) e na região da integrase do gene *pol* (deleção de 247 pb) (SANDONIS et al., 2009). Essas comparações não puderam ser avaliadas, uma vez que essas regiões não foram sequenciadas nas amostras do presente estudo.

Na avaliação das sequências das regiões da PR e RT do gene *pol* por meio da plataforma *Stanford* CPR foi observada a ocorrência de mutações de resistência primária a fármacos em dois indivíduos do grupo LTNP (8,7%), ambos do subgrupo não progressores virêmicos, isto é, que apresentavam carga viral variável, acima de 2000 cópias RNA/mL na maioria das mensurações. O estudo de Moura et al (2015) mostrou que a ocorrência de mutações de resistência transmitida em diferentes categorias de exposição ao HIV-1 na região Nordeste do Brasil foi presente em 11,2% dos indivíduos investigados, com diferenças nas proporções entre as categorias analisadas. A ocorrência de mutações de resistência transmitida relatadas em alguns outros estudos no Brasil também não é muito divergente do que foi observado no presente estudo. Graf et al., 2011, analisando amostras da região de Florianópolis-SC, relatou a presença dessas mutações em 11% das sequências

analisadas e Ferreira e colaboradores (2013) encontrou em amostras provenientes do Estado de São Paulo, 7,6% de mutações de resistência primária aos fármacos entre 225 amostras avaliadas entre os anos 2008 e 2009.

Ainda como resultado das estimativas da ferramenta *Stanford* CPR, uma amostra proveniente de um paciente controlador de elite subtipo B, apresentou mutações nas regiões da PR e RT, condizentes com ação da enzima APOBEC3G/F segundo a plataforma utilizada, porém não houve avaliação nesse presente estudo das sequências do gene acessório *vif* que pudessem confirmar alguma alteração viral. Alguns estudos têm indicado a presença de mutações em sequências do gene *vif* em indivíduos LTNP e que poderiam estar associadas a uma menor ação anti-APOBEC nesses indivíduos (YAMADA; IWAMOTO, 2000; RANGEL et al., 2009). O estudo de Kikuchi e colaboradores (2015) avaliou amostras de 46 indivíduos controladores de elite, definidos como indivíduos infectados pelo HIV-1 com carga viral <50 cópias RNA/mL, em pelo menos 3 mensurações, no período mínimo de 1 ano, e identificou que a atividade anti-APOBEC das sequências dos indivíduos EC foi significativamente menor comparada com indivíduos não controladores de viremia, independentemente da presença de alelos *HLA* protetivos. Ainda nesse estudo os pesquisadores sugeriram que várias combinações de polimorfismos em *vif* devem ser responsáveis pela forma atenuada dessas linhagens virais nesse grupo EC avaliado.

Características virais do grupo LTNP - Sítios de N-glicosilação e mutações na região V3-V5_{gp120}

No presente estudo, na avaliação referente ao número de potenciais sítios de N-glicosilação das sequências da região V3-V5_{gp120} não foi observada nenhuma diferença na comparação entre as amostras de indivíduos LTNP subtipo C e os demais grupos de sequências comparadas. Diferentemente do presente estudo, Casado e colaboradores (2013) identificaram um número menor de potenciais sítios de N-glicosilação nas sequências virais de indivíduos LTNP subtipo B, porém com avaliação das regiões V1-V5_{gp120}. O estudo de Zhang e colaboradores (2006) que avaliou amostras de pacientes pediátricos HIV-1 subtipo C, regiões V1-V5_{gp120}, com diferentes perfis de progressão para aids também não identificou diferenças entre o número de N-glicosilações entre os diferentes grupos de indivíduos avaliados, o que corrobora nossos achados.

Na avaliação das sequências das amostras clonadas LTNP subtipo C desse estudo, foi identificada a perda de dois potenciais sítios de N-glicosilação, N289 (região C2) e N339 (região C3) (posição na sequência referência HXB2) que são, segundo a literatura, altamente conservados entre os diferentes clados (GO et al., 2009; WANG et al., 2013). Na avaliação das sequências dos demais indivíduos do grupo LTNP a perda de ambos os sítios N289 e N339, ou a perda isolada, foi mais frequente nas amostras dos indivíduos do subtipo C. Na literatura ainda não está devidamente esclarecido qual seria o número crítico de deleções nos potenciais sítios de N-glicosilação que poderiam interferir nas interações da rede de glicanos ou a função específica para cada sítio (BEHRENS et al., 2016). Canducci e colaboradores (2009) identificaram em amostras clonadas de indivíduos LTNP e comparadas com sequências depositadas no banco de dados *Stanford Database* a presença de perda de alguns sítios de N-glicosilação, incluindo o N339 que também foi encontrado no presente estudo. O anticorpo neutralizante 2G12 tem sido descrito como direcionado aos sítios de N-glicosilação N295, N332, N339 e N392, porém a perda de um desses sítios isoladamente parece não interferir na eficiência total desse anticorpo (MANRIQUE et al., 2007; PRITCHARD et al., 2015). O estudo de Pritchard e colaboradores (2015) mostrou que a deleção isolada de algum potencial sítio de N-glicosilação, como o N339, altera a abundância da rede de glicanos em 25%. Já no estudo de Wang e colaboradores (2013), que avaliou o papel de deleções em cada potencial sítio de N-glicosilação de uma amostra recombinante CRF07_BC, foi mostrado que a mutação no sítio N289 entre outros, com deleção desse sítio, tornou os vírus mais sensíveis à ação de anticorpos neutralizantes PG9 e PG16, além de promover redução na infectividade viral, indicando que essa mutação poderia afetar as mudanças conformacionais necessárias para a entrada dos vírus nas células. Nesse estudo ainda, os autores destacam as diferenças que determinadas deleções nesses sítios teriam dependendo do clado HIV-1, onde linhagens subtipo B seriam menos sensíveis a um maior número de deleções. De uma forma geral, e apenas observacional, a perda desses dois sítios N289 e N339 nas amostras LTNP, principalmente entre indivíduos do subtipo C, poderia ser mais um fator de controle da evolução da infecção nesses indivíduos. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar esta hipótese.

No presente estudo, foram identificadas duas mutações P349N (região C3) e S383T (região V4), (conforme posição na sequência consenso C) em associação

com amostras de indivíduos LTNP subtipo C, após comparação com vários grupos de sequências. A mutação P349N resultou no aparecimento de mais um potencial sítio de N-glicosilação em região próxima do sítio de ligação ao receptor CD4 354DLE356 que poderia interferir na capacidade de replicação desses vírus. Casado e colaboradores (2013) também identificaram alterações nesse mesmo sítio em um indivíduo LTNP subtipo B que estava em fase replicativa, porém as mutações encontradas pelos pesquisadores não mostraram inclusão de potencial sítio de N-glicosilação. Nesse mesmo trabalho, os pesquisadores mostraram que uma das mutações encontradas e relacionadas com amostras de indivíduos LTNP e que foi associada com vírus menos replicativos foi na mesma posição da região V4 encontrada nesse presente trabalho (posição S383T no consenso C). Essas avaliações talvez indiquem que a presença dessas mutações P349N e S383T em amostras subtipo C do presente estudo poderiam estar relacionadas a um perfil viral associado a não-progressão, porém outros estudos são necessários para avaliar o potencial dessas mutações na infectividade e replicação viral.

Características do hospedeiro no grupo LTNP

A presença do genótipo $\Delta 32CCR5/CCR5$ foi identificada em 17% dos indivíduos LTNP desse presente estudo, sendo uma frequência um pouco maior quando comparada com as frequências de 10% e 13% identificadas em estudos com indivíduos não infectados, de origem caucasiana no Estado do Paraná e Rio Grande do Sul, respectivamente (VARGAS et al, 2006; MUXEL et al., 2008). A frequência desse genótipo heterozigótico para a deleção de 32 pb no gene *CCR5* do grupo LTNP do presente estudo é muito maior quando comparada com os dados de indivíduos HIV-1 progressores (grupo de transmissão vertical) em acompanhamento no mesmo ambulatório de atendimento do Hospital de Clínicas da UFPR. Nesse grupo de HIV-1 progressores apenas 1,6% dos indivíduos apresentaram o genótipo $\Delta 32CCR5/CCR5$ (MARTIN et al., 2017, dados não publicados) evidenciando nessa comparação que a presença desse genótipo entre os indivíduos LTNP poderia atuar como mais um fator protetivo para evolução da infecção, como já identificado em outros estudos (IOANNIDIS et al., 2001; BORINSKAYA et al., 2012).

Na avaliação do polimorfismo *rs12979860*, o presente estudo mostrou que 87,5% dos indivíduos LTNP apresentaram o genótipo favorável C/C, evidenciando uma alta frequência deste genótipo entre os indivíduos avaliados, o que pode ser um

efeito aditivo no controle da replicação viral do HIV-1 nesse grupo. Existem poucos relatos na literatura sobre o envolvimento do polimorfismo *rs12979860* em indivíduos LTNP (SAJADI et al., 2011; MACHMACH et al., 2013). O estudo de Machmach e colaboradores (2013) mostrou uma frequência de genótipo favorável C/C em 62% dos indivíduos controladores de viremia com este genótipo sendo independentemente associado ao perfil de não-progressão para aids neste grupo de pacientes, onde a diferença nesta frequência em relação ao grupo LTNP desse atual estudo pode estar relacionada com a variação étnica dos grupos avaliados. Diversos estudos têm mostrado a presença e influência de genótipo favorável C/C e desfavorável T/T em indivíduos monoinfectados com HCV, ou coinfectados com HIV-1 (CAVALCANTE et al., 2012; BERTOL et al., 2015; AVANZI et al., 2016). O estudo conduzido por Bertol et al (2015), na cidade do Rio de Janeiro, identificou a presença do genótipo C/C em 47,4% dos indivíduos saudáveis e em aproximadamente 30% em indivíduos HIV-1 ou HCV monoinfectados. Em um estudo realizado no mesmo serviço de atendimento do presente trabalho, foi identificado que 56,5% dos indivíduos coinfectados HIV-1/HCV apresentavam o genótipo favorável C/C (AVANZI et al., 2016).

Ainda referente aos marcadores genéticos avaliados no grupo LTNP desse presente estudo, em relação à identificação dos alelos *HLA-B*, o alelo *B*15* foi o que apresentou maior frequência alélica na avaliação do grupo LTNP total ($f_a = 0,217$), sendo atribuído pela alta frequência alélica encontrada entre os indivíduos do subgrupo de indivíduos não-progressores virêmicos ($f_a = 0,346$ para subgrupo VNP *versus* $f_a = 0,050$ grupo EC/VC; $p=0,027$). Para 80% dos indivíduos do subgrupo EC/VC foi identificada a presença de pelo menos um alelo previamente identificado como potencialmente protetor na progressão para aids, e que podem atuar no controle da replicação viral do HIV-1 nesses indivíduos (PEREYRA et al., 2010; TANG et al., 2011; STEPHENS et al., 2012; MARTIN; CARRINGTON, 2013; PETERSON et al., 2013; ZHANG et al., 2013). Considerando as frequências dos alelos *B*27*, *B*44* e *B*57* observadas em indivíduos LTNP do subgrupo EC/VC, estas foram maiores quando comparadas com os resultados do estudo de Ruiz et al. (2005), que avaliou a frequência desses alelos na população da cidade de Curitiba (*B*44*: 0,250 *versus* 0,108, *B*27*: 0,100 *versus* 0,031 e *B*57*: 0,100 *versus* 0,031). Do mesmo modo, as frequências dos alelos *B*27* e *B*44* descritos no presente grupo LTNP são maiores do que as encontradas em um grupo de 183 indivíduos

infectados com HIV-1, recrutados no mesmo ambulatório de atendimento do Hospital de Clínicas que do presente estudo (LIMA, 2012). Comparando esses dados, para o alelo *B*27*, a diferença foi encontrada para o grupo LTNP (0,109 *versus* 0,016; $p = 0,0039$), enquanto para o alelo *B*44*, foi observada para os subgrupos EC/VC (0,25 *versus* 0,092; $p = 0,0404$). O alelo *B*44* já foi previamente identificado como um fator protetivo na evolução da infecção pelo HIV-1 (FLORES-VILLANUEVA et al., 2003; HONEYBORNE et al., 2007; HUANG et al., 2009; TANG et al., 2011; ZHANG et al., 2013) sendo associado a uma baixa carga viral e menor declínio no número de células T CD4+, na fase aguda e/ou crônica da infecção pelo HIV-1, porém os mecanismos exatos que estão associados à resposta restrita a esse grupo alélico ainda não são claros. Conforme o que foi identificado na literatura, essa é a primeira descrição da presença de maior frequência alélica do *B*44* em indivíduos HIV-1 LTNP no Brasil, principalmente observado nos resultados para o subgrupo EC/VC, porém o tamanho da amostra avaliada é fator limitante nessas considerações. Já a associação dos alelos identificados *B*27* e *B*57* com progressão mais lenta para aids é amplamente relatada, sendo esses alelos conhecidos como preditores de controle imune em diferentes grupos estudados, e dessa forma podem estar contribuindo para a não progressão para aids no grupo LTNP avaliado (PEREYRA et al., 2010; STEPHENS et al., 2012; MARTIN; CARRINGTON, 2013).

Por último, quanto a avaliação dos marcadores bioquímicos, as dosagens plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 mostraram diferenças nos indivíduos HIV-1 LTNP e progressores, evidenciando um perfil diferenciado no grupo desse estudo. Considerando a presença dos clados no grupo LTNP, as dosagens plasmáticas de IL-8 e IP-10 não mostraram diferenças estatisticamente significativas, provavelmente devido ao pequeno número de amostras avaliadas ou ao fato de que as expressões dessas quimiocinas não estarem relacionadas à presença de determinado subtipo viral. Nesse mesmo contexto, o estudo de Almeida et al. (2016) não identificou diferença significativa nas dosagens de alguns marcadores bioquímicos solúveis no soro, incluindo IP-10, entre indivíduos cronicamente infectados com HIV-1 subtipos B e C, o que corrobora os achados do presente estudo para essa quimiocina.

No presente estudo foi identificada uma correlação positiva entre a concentração plasmática de IL-8 e a contagem de células T CD8+ e uma correlação negativa com células CD4+, o que está de acordo com o que foi demonstrado no estudo de Pananghat et al. (2016), onde os autores sugerem que a quantificação

plasmática de IL-8 pode servir como marcador adicional para a progressão da infecção pelo HIV-1. Não foi observada associação entre a carga viral do HIV-1 e IL-8, sendo que, em indivíduos progressores, independentemente da supressão viral, as dosagens de IL-8 foram elevadas, enfatizando o efeito do estado de ativação imunológica crônica presente nesses indivíduos. Nos indivíduos LTNP, independente do subgrupo avaliado, não foi observada diferença na concentração de IL-8, sugerindo, talvez, diferenças no estado de ativação imune. No entanto, ensaios adicionais precisariam ser realizados para reforçar esse achado.

Na avaliação da concentração plasmática da quimiocina IP-10, todos os subgrupos LTNP mostraram diferenças nas dosagens dessa quimiocina associados à carga viral, como já foi observado em estudos anteriores (ROBERTS et al., 2010; KEATING et al., 2011; KAMAT et al., 2012; LEE et al., 2015). O subgrupo formado por indivíduos controladores de elite apresentou praticamente os mesmos valores plasmáticos de IP-10 de progressores em supressão viral e de indivíduos controles. Foi observada correlação negativa entre IP-10 e contagem de células T CD4+ e na relação CD4/CD8, mas não foi observada correlação com a contagem de células T CD8+. No estudo realizado por Noel e colaboradores (2014) também não foi observada correlação entre IP-10 e contagens de células T CD8+, corroborando os dados encontrados no presente estudo. Entretanto, esses mesmos autores mostraram que indivíduos classificados como controladores de elite apresentavam concentrações plasmáticas mais elevadas de IP-10 quando comparados ao grupo controle e similares ao apresentado pelos pacientes progressores em supressão viral. Esses resultados comparados com os do presente trabalho podem estar relacionados com os parâmetros delineados para formação dos grupos controle e grupo EC, o tempo de infecção pelo HIV-1 no grupo de indivíduos progressores e tempo de TARV. No estudo de Platten e colaboradores (2016), as concentrações de quimiocinas IP-10 em indivíduos EC foram semelhantes às observadas em indivíduos negativos para HIV-1 e em progressores em ART com carga viral suprimida, o que está de acordo com os resultados desse presente estudo, como também foi observada uma correlação negativa entre a concentração plasmática de IP-10 e % de células T CD4 em EC e VC, corroborando nossos achados.

Algumas limitações do presente estudo podem ser atribuídas ao número de indivíduos envolvidos nas avaliações, porém na maioria dos estudos com indivíduos LTNP o tamanho das coortes avaliadas são semelhantes ao desse trabalho, devido

a singularidade desse grupo. Uma outra limitação pode ser atribuída ao fato terem sido avaliadas somente duas regiões genômicas virais do HIV-1 dos indivíduos LTNP do presente estudo. Além disso, não foram avaliados outros fatores celulares ou marcadores solúveis que podem estar envolvidos na progressão lenta para aids.

A presença de vários fatores, tanto virais como do hospedeiro parecem estar presentes e contribuindo para a manutenção do perfil de indivíduo LTNP, e a identificação desses fatores em indivíduos que apresentam infecção por diferentes clados HIV-1, bem como diferentes perfis de controle da progressão para aids, pode ser importante para aumentar o conhecimento da patogênese desta doença, buscando ampliar futuras opções terapêuticas e profiláticas na infecção pelo HIV-1.

7 CONCLUSÕES

- Foram identificados 24 indivíduos HIV-1 que apresentaram o perfil LTNP com diferentes padrões de controle da progressão para aids, representando 1,71% do total de pacientes atendidos no Ambulatório de Infectologia do HC-UFPR;
- Os subtipos HIV-1 identificados nas amostras dos indivíduos LTNP demonstra o perfil diferenciado dessa distribuição para a Região Sul do Brasil, com 50% das amostras virais identificadas como subtipo C, e uma associação, entre as amostras avaliadas, do subtipo C com a transmissão heterossexual;
- 96% dos indivíduos do grupo LTNP apresentaram amostras virais com tropismo para o correceptor CCR5;
- A presença de mutações de resistência primária no grupo LTNP (8,7%) é semelhante a frequência encontrada em outros estudos na população brasileira;
- Sequências virais de amostras clonadas LTNP subtipo C apresentaram as mutações P349N e S383T que podem estar relacionadas à presença do perfil não-progressor, e indivíduos LTNP subtipo C apresentaram maior frequência de isolados virais com perdas dos potenciais sítios de N-glicosilação N289 e N339 que podem estar associados a um perfil menos replicativo desses vírus;
- A presença da deleção de 32 pb no gene *CCR5* foi identificada em 17% dos indivíduos LTNP;
- A avaliação do polimorfismo *rs12979860* mostrou a presença do genótipo favorável C/C em 87,5% dos indivíduos LTNP e pode representar um fator adicional para o controle da progressão para aids;

- A presença de alelos *HLA-B* protetivos foi identificada em 80% dos indivíduos dos subgrupos controladores de elite e controladores de viremia, mostrando uma alta frequência do alelo *B*44* entre esses indivíduos;
- As concentrações plasmáticas das quimiocinas IL-8 e IP-10 mostraram diferenças na comparação com grupos de indivíduos progressores e podem sugerir, como já identificado em outros estudos, um potencial uso para acompanhamento da evolução para aids.

8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Devido as dificuldades no estabelecimento novos grupos de indivíduos LTNP em face às atuais diretrizes do Ministério da Saúde que preconizam o início de TARV a partir do diagnóstico da infecção pelo HIV-1, a continuidade dos estudos com os grupos já pré-estabelecidos se faz necessária. O presente trabalho direciona a continuidade de estudos com as amostras dos indivíduos LTNP para o sequenciamento e avaliação de outras regiões do genoma do HIV-1 não contemplados neste trabalho, como o gene *env* completo e os genes *vif* e *nef*, bem como a avaliação de outros fatores que podem estar envolvidos no estado de ativação imune destes indivíduos, como a avaliação do perfil de ativação em células T e avaliação da translocação microbiana pela quantificação do sCD14 ou LPS e avaliação da dosagem de outras quimiocinas, como CXCL2 e CCL5.

9 PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE A EXECUÇÃO DO PROJETO

Em decorrência desse estudo, foram produzidos dois artigos referentes aos indivíduos LTNP e participação em outros projetos de pesquisa:

- SANTOS JS, RIBEIRO CE, ALMEIDA SM, RABONI SM. Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil. **J AIDS Clin. Res.** v. 6, n. 9, 2015. doi:10.4172/2155-6113.1000502. (APÊNDICE 3)
- SANTOS JS, ALMEIDA SM, SILVEIRA GF, BORDIGNON J, RABONI SM. Host Factors predictors in Long Term Non-Progressors HIV-1 infected individuals: correlation with distinct viral clades (artigo em processo de submissão).
- MARTIN B, SANTOS J, SCAPINELLO F, RIBEIRO C, GOMES-da-SILVA M, RABONI S. Young adults HIV-1 infected by vertical transmission in southern Brazil – clinical, demographic and virological features (artigo aceito para publicação no **International Journal of STD & AIDS**, março 2017). (APÊNDICE 3)
- MOREIRA FB, ROSARIO CS, SANTOS JS, AVANZI VM, NOGUEIRA MB, VIDAL LR, RABONI SM. Molecular characterization and clinical epidemiology of human respiratory syncytial virus (HRSV) A and B in hospitalized children, Southern Brazil. **J. Med Virol**, Feb 2017. doi: 10.1002/jmv.24795.

a) Participação em eventos científicos para divulgação dos resultados do projeto de pesquisa:

- SANTOS JS, RIBEIRO C, ALMEIDA SM, RABONI SM. Profile of Long-Term Non-Progressor HIV-1 Infected Patients in follow-up at a Tertiary Hospital, Southern Brazil. 1º CONGRESSO SULBRASILEIRO DE INFECTOLOGIA – Curitiba-PR 2016 – Apresentação Oral.
- SANTOS, J.S.; AVANZI VM; ROTTA, I.; ALMEIDA, S. M.; RABONI, S. M. HIV-1 subtype diversity, clinical and epidemiological profile of long-term non-progressors individuals in follow-up on a referral facility for Infectious Disease patients, Southern Brazil. 2015. 31º Annual Clinical Virology Symposium 2015 – Daytona- EUA. Pôster
- SANTOS JS Perfil clínico-epidemiológico e diversidade dos subtipos do HIV-1 em pacientes não progressores por longo tempo em acompanhamento em um serviço de referência em Infectologia, Curitiba-PR. 4º Congresso Brasileiro sobre HIV-AIDS e Vírus Relacionados e do IX Simpósio sobre

Avanços na Patogenia e Manejo da AIDS – 2014 Salvador – BA.
Apresentação Oral.

- SANTOS, J.S.; LARGURA, D.; BELOTO, N C P; ALMEIDA, S. M.; RABONI, S.M. Perfil Clínico-Epidemiológico dos Pacientes HIV+ Não-Progressores por Longo Tempo em Acompanhamento em um Serviço de Referência em Infectologia. XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE INFECTOLOGIA – 2013 Fortaleza - CE. Pôster

b) Trabalhos premiados:

- Special Travel Award for Latin American Residents - 31th Annual Clinical Virology Symposium – Daytona-Florida, 2015 - PAN AMERICAN SOCIETY FOR CLINICAL VIROLOGY
- 2º Evento de Produção Científica e 1º Simposio de Análises Clínicas e Anatomia Patológica, Unidade de Apoio e Diagnóstico do Hospital de Clínicas da UFPR, 2013.

REFERÊNCIAS

- AALAEI-ANDABILI, S. H. et al. Mysterious Linkages Between Hepatitis C Virus Genotypes, Interleukin-28B Genotypes and Viral Clearance- A Meta-Analysis. **Hepat Mon**, v. 14, n. 3, p. e15895, Mar 2014.
- ABRAHA, A. et al. CCR5- and CXCR4-tropic subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates have a lower level of pathogenic fitness than other dominant group M subtypes: implications for the epidemic. **J Virol**, v. 83, n. 11, p. 5592-5605, Jun 2009.
- ADLAND, E. et al. Discordant Impact of HLA on Viral Replicative Capacity and Disease Progression in Pediatric and Adult HIV Infection. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1004954, Jun 2015.
- ALENCAR, C. S. et al. HIV genotypes and primary drug resistance among HIV-seropositive blood donors in Brazil: role of infected blood donors as sentinel populations for molecular surveillance of HIV. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 63, n. 3, p. 387-392, Jul 2013.
- ALKHATIB, G. The biology of CCR5 and CXCR4. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 4, n. 2, p. 96-103, Mar 2009.
- ALMEIDA, S. E. et al. Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil. **Virol J**, v. 9, p. 306, 2012.
- AMATO NETO, V. et al. Síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids): descrição do primeiro caso autóctone do Brasil e estudo imunológico. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 101, n. 4, p. 165-168, jul./ago 1983.
- ANANWORANICH, J. et al. Characteristics of lymphocyte subsets in HIV-infected, long-term nonprogressor, and healthy Asian children through 12 years of age. **J Allergy Clin Immunol**, v. 126, n. 6, p. 1294-1301.e10, Dec 2010.
- ANSARI, A. W. et al. CCL2: a potential prognostic marker and target of anti-inflammatory strategy in HIV/AIDS pathogenesis. **Eur J Immunol**, v. 41, n. 12, p. 3412-3418, Dec 2011.
- ANTONI, S. et al. Genetic and biological characterization of recombinant HIV type 1 with Env derived from long-term nonprogressor (LTNP) viruses. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 23, n. 11, p. 1377-1386, Nov 2007.
- ARAUJO, A. F. et al. Lower prevalence of human immunodeficiency virus type 1 Brazilian subtype B found in northeastern Brazil with slower progression to AIDS. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 11, p. 1249-1254, Nov 2010.
- ARIËN, K. K. et al. The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. **J Virol**, v. 79, n. 14, p. 8979-8990, Jul 2005.

ARRUDA, L. B. et al. Determination of viral tropism by genotyping and phenotyping assays in Brazilian HIV-1-infected patients. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 287-290, 2014.

ASENSIO, V. C. et al. Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. **J Virol**, v. 75, n. 15, p. 7067-7077, Aug 2001.

AVANZI, V. IL28B and ITPA Single Nucleotide Polymorphisms in a Cohort of Patients with HCV and HCV/HIV, Southern Brazil. **J AIDS Clin Res**, v. 7, n. 9, 2016.

AYOUBA, A. et al. Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d'Ivoire. **AIDS**, v. 27, n. 15, p. 2488-2491, Sep 2013.

BAETEN, J. M. et al. HIV-1 subtype D infection is associated with faster disease progression than subtype A in spite of similar plasma HIV-1 loads. **J Infect Dis**, v. 195, n. 8, p. 1177-1180, Apr 2007.

BALDAUF, H. M. et al. SAMHD1 restricts HIV-1 infection in resting CD4(+) T cells. **Nat Med**, v. 18, n. 11, p. 1682-1687, Nov 2012.

BARRÉ-SINOUSSE, F. et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, May 1983.

BASHIROVA, A. A.; THOMAS, R.; CARRINGTON, M. HLA/KIR restraint of HIV: surviving the fittest. **Annu Rev Immunol**, v. 29, p. 295-317, 2011.

BEHRENS, A. J. et al. Composition and Antigenic Effects of Individual Glycan Sites of a Trimeric HIV-1 Envelope Glycoprotein. **Cell Rep**, v. 14, n. 11, p. 2695-2706, Mar 2016.

BELLO, G. et al. Demographic history of HIV-1 subtypes B and F in Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 7, n. 2, p. 263-270, Mar 2007.

BELLO, G. et al. Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. **AIDS**, v. 22, n. 15, p. 1993-2000, Oct 2008.

BELLO, G.; AFONSO, J. M.; MORGADO, M. G. Phylodynamics of HIV-1 subtype F1 in Angola, Brazil and Romania. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 5, p. 1079-1086, Jul 2012a.

BELLO, G. et al. Phylogeographic analysis of HIV-1 subtype C dissemination in Southern Brazil. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35649, 2012b.

BENNETT, D. E. et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. **PLoS One**, v. 4, n. 3, p. e4724, 2009.

BERTOL, B. C. et al. IL28B gene polymorphisms in mono- and HIV-coinfected chronic hepatitis C patients. **Front Microbiol**, v. 6, p. 153, 2015.

BEYRER, C. et al. Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. **Lancet**, v. 380, n. 9839, p. 367-377, Jul 2012.

BLANCO, M. et al. HIV-1 Genetic Variability in Cuba and Implications for Transmission and Clinical Progression. **MEDICC Rev**, v. 17, n. 4, p. 25-31, Oct 2015.

BLEUL, C. C. et al. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 5, p. 1925-1930, Mar 1997.

BOISVERT, M.; SHOUKRY, N. H. Type III Interferons in Hepatitis C Virus Infection. **Front Immunol**, v. 7, p. 628, 2016.

BONHOEFFER, S.; HOLMES, E. C.; NOWAK, M. A. Causes of HIV diversity. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 125, Jul 1995.

BONTADINI, A. HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. **Methods**, v. 56, n. 4, p. 471-476, Apr 2012.

BORINSKAYA, S. A. et al. Risk of HIV Infection and Lethality Are Decreased in CCR5del32 Heterozygotes: Focus Nosocomial Infection Study and Meta-analysis. **Acta Naturae**, v. 4, n. 1, p. 42-52, Jan 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para manejo da infecção pelo HIV em adultos. 2013.** Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: < <http://aids.gov.br> > Acesso em: 16/10/2016.

_____. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico HIV AIDS. 2016.** Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: < <http://aids.gov.br> > Acesso em: 02/12/2016.

_____. Ministério da Saúde. **Manual Técnico de Elaboração da Cascata de Cuidado Contínuo do HIV. 2017.** Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: < <http://aids.gov.br> > Acesso em: 01/03/2017.

BRENCHLEY, J. M. et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. **Nat Med**, v. 12, n. 12, p. 1365-1371, Dec 2006.

BRUMME, Z. L. et al. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. **J Infect Dis**, v. 192, n. 3, p. 466-474, Aug 2005.

BURGARD, M. et al. Mother-to-child transmission of HIV-2 infection from 1986 to 2007 in the ANRS French Perinatal Cohort EPF-CO1. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 7, p. 833-843, Oct 2010.

BUSH, S.; TEBIT, D. M. HIV-1 Group O Origin, Evolution, Pathogenesis, and Treatment: Unraveling the Complexity of an Outlier 25 Years Later. **AIDS Rev**, v. 17, n. 3, p. 147-158, 2015.

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

CANDUCCI, F. et al. Dynamic features of the selective pressure on the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 CD4-binding site in a group of long term non progressor (LTNP) subjects. **Retrovirology**, v. 6, p. 4, 2009.

CARVALHO, A. et al. Analysis of a local HIV-1 epidemic in Portugal highlights established transmission of non-B and non-G subtypes. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 5, p. 1506-1514, May 2015.

CASADO, C. et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11079, 2010.

CASADO, C. et al. Identification of a cluster of HIV-1 controllers infected with low replicating viruses. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77663, 2013.

CASE, K. Nomenclature: human immunodeficiency virus. **Ann Intern Med**, v. 105, n. 1, p. 133, Jul 1986.

CASSAN, E. et al. Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 113, n. 41, p. 11537-11542, Oct 2016.

CAVALCANTE, L. N. et al. IL28B polymorphisms are markers of therapy response and are influenced by genetic ancestry in chronic hepatitis C patients from an admixed population. **Liver Int**, v. 32, n. 3, p. 476-486, Mar 2012.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. AIDS Case Definition - Current Trends Update on Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) -United States. **MMWR**, v.31, n. 37, p. 507-508, 1982.

CHAHROUDI, A.; SILVESTRI, G. What pediatric nonprogressors and natural SIV hosts teach us about HIV. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 358, p. 358fs16, Sep 2016.

CHINEN, J.; SHEARER, W. T. Molecular virology and immunology of HIV infection. **J Allergy Clin Immunol**, v. 110, n. 2, p. 189-198, Aug 2002.

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

COETZER, M. et al. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 56, n. 1, p. 9-15, Jan 2011.

COFFIN, J.; SWANSTROM, R. HIV pathogenesis: dynamics and genetics of viral populations and infected cells. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 3, n. 1, p. a012526, Jan 2013.

COHEN, Y. Z. et al. Glycan-Dependent Neutralizing Antibodies Are Frequently Elicited in Individuals Chronically Infected with HIV-1 Clade B or C. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 31, n. 11, p. 1192-1201, Nov 2015.

COON, S.; WANG, D.; WU, L. Polymorphisms of the SAMHD1 gene are not associated with the infection and natural control of HIV type 1 in Europeans and African-Americans. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n. 12, p. 1565-1573, Dec 2012.

CÔRTEZ, F. H. et al. HIV Controllers With Different Viral Load Cutoff Levels Have Distinct Virologic and Immunologic Profiles. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 68, n. 4, p. 377-385, Apr 2015.

COVAS, D. T. et al. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 19, n. 1, p. 74-79, Sep 1998.

DA COSTA, C. M. et al. High HIV-1 Genetic Diversity in Patients from Northern Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 32, n. 9, p. 918-922, Sep 2016.

DANIEL, M. D. et al. Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1201-1204, Jun 1985.

D'ARC, M. et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 11, p. E1343-52, Mar 2015.

DE ALMEIDA, S. M. et al. Biomarkers of chemotaxis and inflammation in cerebrospinal fluid and serum in individuals with HIV-1 subtype C versus B. **J Neurovirol**, v. 22, n. 6, p. 715-724, Dec 2016.

DE BRITO, A. et al. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 11, p. 1476-81, Dec 2006.

DE MORAES SOARES, C. M. et al. Prevalence of transmitted HIV-1 antiretroviral resistance among patients initiating antiretroviral therapy in Brazil: a surveillance study using dried blood spots. **Journal of the International AIDS Society**, v. 17, n. 19042, 2014.

DE PASQUALE, M. et al. Lower HIV provirus levels are associated with more APOBEC3G protein in blood resting memory CD4+ T lymphocytes of controllers in vivo. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76002, 2013.

DEEKS, S. G. et al. HIV infection. **Nat Rev Dis Primers**, v. 1, p. 15035, 10 2015.

DESCOURS, B. et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. **Retrovirology**, v. 9, p. 87, 2012.

DELWART, E. L. et al. Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. **PCR Methods Appl**, v. 4, n. 5, p. S202-16, Apr 1995.

DESCOURS, B. et al. SAMHD1 restricts HIV-1 reverse transcription in quiescent CD4(+) T-cells. **Retrovirology**, v. 9, p. 87, 2012.

DIAZ, R. S. et al. Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. **Virology**, v. 381, n. 2, p. 184-193, Nov 2008.

DIMONTE, S. Different HIV-1 env frames: gp120 and ASP (antisense protein) biosynthesis, and theirs co-variation tropic amino acid signatures in X4- and R5-viruses. **J Med Virol**, v. 89, n. 1, p. 112-122, Jan 2017.

DOORES, K. J. The HIV glycan shield as a target for broadly neutralizing antibodies. **FEBS J**, v. 282, n. 24, p. 4679-91, Dec 2015.

DOUEK, D. C.; ROEDERER, M.; KOUP, R. A. Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. **Annu Rev Med**, v. 60, p. 471-84, 2009.

DUTRIEUX, J. et al. TRIM5 α is a SUMO substrate. **Retrovirology**, v. 12, p. 28, 2015.

EASTERBROOK, P. J. et al. Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. **J Int AIDS Soc**, v. 13, p. 4, 2010.

ECKERT, D. M.; KIM, P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. **Annu Rev Biochem**, v. 70, p. 777-810, 2001.

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

EKOUEVI, D. K. et al. Plasma HIV-2 RNA According to CD4 Count Strata among HIV-2-Infected Adults in the IeDEA West Africa Collaboration. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0129886, 2015.

ENGELMAN, A.; CHEREPANOV, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 4, p. 279-290, 03 2012.

ESBJÖRNSSON, J. et al. Frequent CXCR4 tropism of HIV-1 subtype A and CRF02_AG during late-stage disease--indication of an evolving epidemic in West Africa. **Retrovirology**, v. 7, p. 23, Mar 2010.

FABENI, L. et al. Genotypic Tropism Testing in HIV-1 Proviral DNA Can Provide Useful Information at Low-Level Viremia. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 9, p. 2935-2941, Sep 2015.

FARIA, N. R. et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 56-61, Oct 2014.

FELLAY, J. et al. Common genetic variation and the control of HIV-1 in humans. **PLoS Genet**, v. 5, n. 12, p. e1000791, Dec 2009.

FERREIRA, C. A. S. et al. A fast and cost-effective method for identifying a polymorphism of interleukin 28B related to hepatitis C. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e78142, 2013.

FERREIRA, J. L. et al. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 800-808, Dec 2008.

FERREIRA, J. L. et al. Transmitted Drug Resistance among People Living with HIV/Aids at Major Cities of Sao Paulo State, Brazil. **Adv Virol**, v. 2013, p. 878237, 2013.

FIEBIG, E. W. et al. Dynamics of HIV viremia and antibody seroconversion in plasma donors: implications for diagnosis and staging of primary HIV infection. **AIDS**, v. 17, n. 13, p. 1871-1879, Sep 2003.

FLORES-VILLANUEVA, P. O. et al. Associations of MHC ancestral haplotypes with resistance/susceptibility to AIDS disease development. **J Immunol**, v. 170, n. 4, p. 1925-1929, Feb 2003.

FOSTER, C. et al. HIV-1 co-receptor tropism and disease progression in children and young adults with perinatally acquired HIV-1 infection. The HICCUP Study. **J Virus Erad**, v. 1, n. 3, p. 173-8, Jul 2015.

FRANÇOIS, K. O.; BALZARINI, J. The highly conserved glycan at asparagine 260 of HIV-1 gp120 is indispensable for viral entry. **J Biol Chem**, v. 286, n. 50, p. 42900-42910, Dec 2011.

FREED, E. O.; MARTIN, M. A. Human Immunodeficiency Viruses: Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2013. p. 1502-1560.

FREED, E. O. HIV-1 assembly, release and maturation. **Nat Rev Microbiol**, v. 13, n. 8, p. 484-496, Aug 2015.

FREITAS, F. B. et al. Polymorphisms in the IFN γ , IL-10, and TGF β genes may be associated with HIV-1 infection. **Dis Markers**, v. 2015, p. 248571, 2015.

FUJITA, H. et al. Intracellular logistics of BST-2/tetherin. **Curr HIV Res**, v. 10, n. 4, p. 321-326, Jun 2012.

FUN, A. et al. Human Immunodeficiency Virus Gag and protease: partners in resistance. **Retrovirology**, v. 9, p. 63, Aug 2012.

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

GE, D. et al. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. **Nature**, v. 461, n. 7262, p. 399-401, Sep 2009.

GENO2PHENO [CORECEPTOR]. **Geno2pheno [coreceptor] 2.5**. Disponível em: <<http://coreceptor.geno2pheno.org/>>. Acesso em: 20 ago. 2016.

GERETTI, A. M. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 1-7, Feb 2006.

GERETTI, A. M. et al. Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 9, p. 1296-1305, May 2009.

GERMAN ADVISORY COMMITTEE BLOOD (ARBEITSKREIS BLUT), S. B. A. O. P. T. B. B. Human Immunodeficiency Virus (HIV). **Transfus Med Hemother**, v. 43, n. 3, p. 203-22, May 2016.

GIFFORD, R. J. et al. The calibrated population resistance tool: standardized genotypic estimation of transmitted HIV-1 drug resistance. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1197-1198, May 2009.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE STUDY HIV COLLABORATORS. Estimates of global, regional, and national incidence, prevalence, and mortality of HIV, 1980–2015. **The Lancet HIV**, v. 3, n. 8, Jul 2016.

GO, E. P. et al. Glycosylation site-specific analysis of clade C HIV-1 envelope proteins. **J Proteome Res**, v. 8, n. 9, p. 4231-4242, Sep 2009.

GOETGHEBUER, T. et al. Effect of early antiretroviral therapy on the risk of AIDS/death in HIV-infected infants. **AIDS**, v. 23, n. 5, p. 597-604, Mar 2009.

GOFF, S.P. Retroviridae. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2013. p. 1424-1473.

GOLDSCHMIDT, V. et al. Role of common human TRIM5alpha variants in HIV-1 disease progression. **Retrovirology**, v. 3, p. 54, 2006.

GONDA, M. A. et al. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. **Science**, v. 227, n. 4683, p. 173-177, Jan 1985.

GOTO, T. et al. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1922-1930, Sep 1994.

GOTTLIEB, G. S. et al. Lower levels of HIV RNA in semen in HIV-2 compared with HIV-1 infection: implications for differences in transmission. **AIDS**, v. 20, n. 6, p. 895-900, Apr 2006.

GOTTLIEB, M. S. et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. **N Engl J Med**, v. 305, n. 24, p. 1425-1431, Dec 1981.

GÖTTLINGER, H. G. The HIV-1 assembly machine. **AIDS**, v. 15 Suppl 5, p. S13-20, 2001.

GOULDER, P. J.; LEWIN, S. R.; LEITMAN, E. M. Paediatric HIV infection: the potential for cure. **Nat Rev Immunol**, v. 16, n. 4, p. 259-271, Apr 2016.

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. **J Clin Virol**, v. 51, n. 3, p. 186-191, Jul 2011.

GRÄF, T.; 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. 170-178, Jan 2013.

GRÄF, T. et al. Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. **J Virol**, v. 90, n. 18, p. 8160-8168, Sep 2016.

HAASE, A. T. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. **Nature**, v. 464, n. 7286, p. 217-223, Mar 2010.

HADI, K. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr polymorphisms associated with progressor and nonprogressor individuals alter Vpr-associated functions. **J Gen Virol**, v. 95, n. Pt 3, p. 700-711, Mar 2014.

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

HALL, T.A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, vol. 41, p. 95-98, 1999.

HARRIS, R. S.; LIDDAMENT, M. T. Retroviral restriction by APOBEC proteins. **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 11, p. 868-877, Nov 2004.

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

_____. Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. **J Infect**, v. 66, n. 5, p. 391-400, May 2013.

HERRING, B. L. et al. Segregation of human immunodeficiency virus type 1 subtypes by risk factor in Australia. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 10, p. 4600-4604, Oct 2003.

HIV DRUG RESISTANCE DATABASE - STANFORD UNIVERSITY. **Calibrated Population Resistance tool - CPR**. Disponível em: <<http://cpr.stanford.edu/cpr.cgi>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

HOLMES, M.; ZHANG, F.; BIENIASZ, P. D. Single-Cell and Single-Cycle Analysis of HIV-1 Replication. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1004961, Jun 2015.

HOMANN, S. et al. Upregulation of BST-2/Tetherin by HIV infection in vivo. **J Virol**, v. 85, n. 20, p. 10659-10668, Oct 2011.

HONEYBORNE, I. et al. Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. **J Virol**, v. 81, n. 7, p. 3667-3672, Apr 2007.

HRECKA, K. et al. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. **Nature**, v. 474, n. 7353, p. 658-661, Jun 2011.

HUANG, X. et al. Association of HLA-A, B, DRB1 alleles and haplotypes with HIV-1 infection in Chongqing, China. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 201, Dec 2009.

HUANG, A. et al. Global Comparison of Drug Resistance Mutations After First-Line Antiretroviral Therapy Across Human Immunodeficiency Virus-1 Subtypes. **Open Forum Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. ofv158, Apr 2016.

IBE, S. et al. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 54, n. 3, p. 241-7, Jul 2010.

IMRAN, M. et al. HIV-1 and hijacking of the host immune system: the current scenario. **APMIS**, v. 124, n. 10, p. 817-831, Oct 2016.

IOANNIDIS, J. P. et al. Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data. **Ann Intern Med**, v. 135, n. 9, p. 782-795, Nov 2001.

ISHIKAWA, N. et al. Elimination of mother-to-child transmission of HIV and syphilis in Cuba and Thailand. **Bull World Health Organ**, v. 94, n. 11, p. 787-787A, Nov 2016.

JEKLE, A. et al. In vivo evolution of human immunodeficiency virus type 1 toward increased pathogenicity through CXCR4-mediated killing of uninfected CD4 T cells. **J Virol**, v. 77, n. 10, p. 5846-5854, May 2003.

JIANG, Y. et al. KIR3DS1/L1 and HLA-Bw4-80I are associated with HIV disease progression among HIV typical progressors and long-term nonprogressors. **BMC Infect Dis**, v. 13, p. 405, Sep 2013.

JUNQUEIRA, D. M. et al. Reviewing the history of HIV-1: spread of subtype B in the Americas. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27489, 2011.

JUNQUEIRA, D. M. et al. Detection of the B" -GWGR variant in the southernmost region of Brazil: unveiling the complexity of the human

immunodeficiency virus-1 subtype B epidemic. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 6, p. 735-740, Sep 2013.

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

KAHLE, E. et al. HIV-1 subtype C is not associated with higher risk of heterosexual HIV-1 transmission: a multinational study among HIV-1 serodiscordant couples. **AIDS**, v. 28, n. 2, p. 235-243, Jan 2014.

KALEEBU, P. et al. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 45, n. 1, p. 28-33, May 2007.

KAMAT, A. et al. A plasma biomarker signature of immune activation in HIV patients on antiretroviral therapy. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30881, 2012.

KANG, M. W. et al. Associations of IFN-gamma polymorphism with HIV-1 infection in the Korean population. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 3, p. 297-299, Mar 2006.

KANKI, P. J. et al. Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1199-1201, Jun 1985.

KANTOR, R. Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n. 6, p. 594-606, Dec 2006.

KAUFMANN, D. E. et al. Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. **Nat Immunol**, v. 8, n. 11, p. 1246-1254, Nov 2007.

KEATING, S. M. et al. The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. **AIDS**, v. 25, n. 15, p. 1823-1832, Sep 2011.

KIKUCHI, T. et al. Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. **J Virol**, v. 89, p. 4992-5001. Feb 2015.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-120, Dec 1980.

KING, A. M. Q et al. **Virus Taxonomy - Classification and Nomenclature of Viruses**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 1st ed. San Diego, CA.: Elsevier Academic Press, 2012.

KIWANUKA, N. et al. Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. **J Infect Dis**, v. 197, n. 5, p. 707-713, Mar 2008.

KIWANUKA, N. et al. HIV-1 viral subtype differences in the rate of CD4+ T-cell decline among HIV seroincident antiretroviral naive persons in Rakai district, Uganda. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 54, n. 2, p. 180-184, Jun 2010.

KLATT, N. R. et al. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. **Immunol Rev**, v. 254, n. 1, p. 326-42, Jul 2013.

KLATT, N. R. et al. Limited HIV infection of central memory and stem cell memory CD4+ T cells is associated with lack of progression in viremic individuals. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 8, p. e1004345, Aug 2014.

KLØVERPRIS, H. N.; LESLIE, A.; GOULDER, P. Role of HLA Adaptation in HIV Evolution. **Front Immunol**, v. 6, p. 665, 2015.

KOURTEVA, Y. et al. APOBEC3G expression and hypermutation are inversely associated with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) burden in vivo. **Virology**, v. 430, n. 1, p. 1-9, Aug 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, Jul 2016.

KURITZKES, D. R.; KROUP, R. A. HIV-1: Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2013. p. 1561-1583.

LAMBOTTE, O. et al. HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 7, p. 1053-6, Oct 2005.

LANE, B. R. et al. Interleukin-8 stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication and is a potential new target for antiretroviral therapy. **J Virol**, v. 75, n. 17, p. 8195-8202, Sep 2001.

LANE, B. R. et al. The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. **Virology**, v. 307, n. 1, p. 122-34, Mar 2003.

LEE, S. et al. Interferon-inducible protein 10 (IP-10) is associated with viremia of early HIV-1 infection in Korean patients. **J Med Virol**, v. 87, n. 5, p. 782-789, May 2015.

LEITE, T. C. et al. Impact of HIV-1 Subtypes on AIDS Progression in a Brazilian Cohort. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 33, n. 1, p. 41-48, Jan 2017.

LENGAUER, T. et al. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. **Nat Biotechnol**, v. 25, n. 12, p. 1407-1410, Dec 2007.

LI, G.; DE CLERCQ, E. HIV Genome-Wide Protein Associations: a Review of 30 Years of Research. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, n. 3, p. 679-731, Sep 2016.

LIFSON, A. R. The association of clinical conditions and serologic tests with CD4+ lymphocyte counts in HIV-infected subjects without AIDS. **AIDS**, v. 5, n. 10, p. 1209-1215, Oct 1991.

LIHANA, R. W. et al. Update on HIV-1 diversity in Africa: a decade in review. **AIDS Rev**, v. 14, n. 2, p. 83-100, 2012 Apr-Jun 2012.

LIMA, A. C. M. **POLIMORFISMO DOS GENES HLA DE CLASSE I EM PACIENTES HIV POSITIVOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS - UFPR, DE CURITIBA, ESTADO DO PARANÁ**. 2012. 86f. Dissertação - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

LIOVAT, A. S. et al. Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46143, 2012.

LIU, H. et al. Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 8, p. 4581-4585, Apr 1999.

LIU, M. et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 22, n. 3, p. 1211-30, Jun 2011.

LOLE, K.S. et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. **J.Virol**, v. 73, p.152-160, 1999.

LOS ALAMOS NATIONAL LABORATORY HIV DATABASE. **HIV Databases**. Disponível em: <<https://www.hiv.lanl.gov/content/index>>. Acesso em: 31 ago. 2016 e 20 jan. 2017.

LUCOTTE, G. Distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion in West Europe. A hypothesis about the possible dispersion of the mutation by the Vikings in historical times. **Hum Immunol**, v. 62, n. 9, p. 933-936, Sep 2001.

LUZURIAGA, K.; MOFENSON, L. M. Challenges in the Elimination of Pediatric HIV-1 Infection. **N Engl J Med**, v. 374, n. 8, p. 761-770, Feb 2016.

MAARTENS, G.; CELUM, C.; LEWIN, S. R. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. **Lancet**, v. 384, n. 9939, p. 258-271, Jul 2014.

MACHMACH, K. et al. IL28B single-nucleotide polymorphism rs12979860 is associated with spontaneous HIV control in white subjects. **J Infect Dis**, v. 207, n. 4, p. 651-655, Feb 2013.

MAHAJAN, S. D. et al. Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 396, n. 2, p. 348-352, May 2010.

MALIM, M. H.; EMERMAN, M. HIV-1 accessory proteins ensuring viral survival in a hostile environment. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 6, p. 388-398, Jun 2008.

MAMIK, M. K.; GHORPADE, A. Chemokine CXCL8 promotes HIV-1 replication in human monocyte-derived macrophages and primary microglia via nuclear factor- κ B pathway. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92145, 2014.

MANGEAT, B. et al. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. **Nature**, v. 424, n. 6944, p. 99-103, Jul 2003.

MANRIQUE, A. et al. In vivo and in vitro escape from neutralizing antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. **J Virol**, v. 81, n. 16, p. 8793-8808, Aug 2007.

MARTIN, M. P. et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. **Nat Genet**, v. 31, n. 4, p. 429-34, Aug 2002.

MARTIN, M. P.; CARRINGTON, M. Immunogenetics of HIV disease. **Immunol Rev**, v. 254, n. 1, p. 245-264, Jul 2013.

MARTINEZ-CAJAS, J. L. et al. Differences in resistance mutations among HIV-1 non-subtype B infections: a systematic review of evidence (1996-2008). **J Int AIDS Soc**, v. 12, p. 11, Jun 2009.

MARTINSON, J. J. et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. **Nat Genet**, v. 16, n. 1, p. 100-103, May 1997.

MASUR, H. et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **N Engl J Med**, v. 305, n. 24, p. 1431-1438, Dec 1981.

MCMICHAEL, A. J. et al. The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 1, p. 11-23, Jan 2010.

MEEHAN, C. J. et al. Emergence, dominance, and possible decline of CXCR4 chemokine receptor usage during the course of HIV infection. **J Med Virol**, v. 82, n. 12, p. 2004-2012, Dec 2010.

MICHAEL, N. L. et al. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. **Nat Med**, v. 3, n. 3, p. 338-340, Mar 1997.

MILLER, J. D. et al. Differentiation of CD8 T cells in response to acute and chronic viral infections: implications for HIV vaccine development. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 5, n. 2, p. 121-129, Jun 2005.

MIURA, T. et al. Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. **J Virol**, v. 84, n. 15, p. 7581-7591, Aug 2010.

MOHAMMADI, P. et al. 24 hours in the life of HIV-1 in a T cell line. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 1, p. e1003161, Jan 2013.

MONTAGNIER, L. et al. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. **Princess Takamatsu Symp**, v. 15, p. 319-331, 1984.

MORGADO, M. G. et al. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 339-342, 1996 May-Jun 1996.

MOURA, M. E. et al. HIV-1 transmitted drug resistance and genetic diversity among patients from Piauí State, Northeast Brazil. **J Med Virol**, v. 87, n. 5, p. 798-806, May 2015.

MOUS, K. et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33934, 2012.

MOYLE, G. J. et al. Epidemiology and predictive factors for chemokine receptor use in HIV-1 infection. **J Infect Dis**, v. 191, n. 6, p. 866-872, Mar 2005.

MUENCHHOFF, M. et al. Nonprogressing HIV-infected children share fundamental immunological features of nonpathogenic SIV infection. **Sci Transl Med**, v. 8, n. 358, p. 358ra125, Sep 2016.

MUXEL, S. M. et al. Association study of CCR5 delta 32 polymorphism among the HLA-DRB1 Caucasian population in Northern Paraná, Brazil. **J Clin Lab Anal**, v. 22, n. 4, p. 229-33, 2008.

NAKAYAMA, E. E. et al. Wild type and H43Y variant of human TRIM5alpha show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. **Immunogenetics**, v. 59, n. 6, p. 511-515, Jun 2007.

NASI, M. et al. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. **Clin Exp Immunol**, v. 187, n. 1, p. 44-52, Jan 2017.

NEIL, S. J.; ZANG, T.; BIENIASZ, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. **Nature**, v. 451, n. 7177, p. 425-430, Jan 2008.

NOEL, N. et al. Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4⁺ T-cell counts in HIV controller patients. **AIDS**, v. 28, n. 4, p. 467-476, Feb 2014.

NONNEMACHER, M. R. et al. HIV-1 Promoter Single Nucleotide Polymorphisms Are Associated with Clinical Disease Severity. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0150835, 2016.

NUNES, C. C. et al. The influence of HIV-1 subtypes C, CRF31_BC and B on disease progression and initial virologic response to HAART in a Southern Brazilian cohort. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 3, p. 205-211, 2014

OKULICZ, J. F. et al. Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. **J Infect Dis**, v. 200, n. 11, p. 1714-1723, Dec 2009.

PANANGHAT, A. N. et al. IL-8 Alterations in HIV-1 Infected Children With Disease Progression. **Medicine (Baltimore)**, v. 95, n. 21, p. e3734, May 2016.

PANTALEO, G.; FAUCI, A. S. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. **Annu Rev Immunol**, v. 13, p. 487-512, 1995.

PAOLUCCI, S. et al. Accumulation of defective HIV-1 variants in a patient with slow disease progression. **Curr HIV Res**, v. 9, n. 1, p. 17-22, Jan 2011.

PASSAES, C. P. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) with HIV-1 infection outcomes in Brazilian HIV-1+ individuals. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e101780, 2014.

PEETERS, M. et al. Evidence for differences in MT2 cell tropism according to genetic subtypes of HIV-1: syncytium-inducing variants seem rare among subtype C HIV-1 viruses. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 20, n. 2, p. 115-121, Feb 1999.

PEETERS, M.; D'ARC, M.; DELAPORTE, E. Origin and diversity of human retroviruses. **AIDS Rev**, 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**, v. 271, n. 5255, p. 1582-1586, Mar 1996.

PEREYRA, F. et al. The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. **Science**, v. 330, n. 6010, p. 1551-1557, Dec 2010.

PERREAU, M.; LEVY, Y.; PANTALEO, G. Immune response to HIV. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 8, n. 4, p. 333-340, Jul 2013.

PETERSON, T. A. et al. HLA class I associations with rates of HIV-1 seroconversion and disease progression in the Pumwani Sex Worker Cohort. **Tissue Antigens**, v. 81, n. 2, p. 93-107, Feb 2013.

PIACENTINI, L. et al. Genetic correlates of protection against HIV infection: the ally within. **J Intern Med**, v. 265, n. 1, p. 110-124, Jan 2009.

PIMENTEL, V. F. et al. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Rio de Janeiro, Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 12, p. 1553-1561, Dec 2013.

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

PLATTEN, M. et al. Cytokine and Chemokine Signature in Elite Versus Viremic Controllers Infected with HIV. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 32, n. 6, p. 579-587, Jun 2016.

POLLAKIS, G. et al. Phenotypic and genotypic comparisons of CCR5- and CXCR4-tropic human immunodeficiency virus type 1 biological clones isolated from subtype C-infected individuals. **J Virol**, v. 78, n. 6, p. 2841-2852, Mar 2004.

POPPER, S. J. et al. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. **J Infect Dis**, v. 180, n. 4, p. 1116-1121, Oct 1999.

POROPATICH, K.; SULLIVAN, D. J. Human immunodeficiency virus type 1 long-term non-progressors: the viral, genetic and immunological basis for disease non-progression. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 2, p. 247-268, Feb 2011.

PRITCHARD, L. K. et al. Glycan clustering stabilizes the mannose patch of HIV-1 and preserves vulnerability to broadly neutralizing antibodies. **Nat Commun**, v. 6, p. 7479, Jun 2015.

RABONI, S. M. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1044-9, Dec 2010.

RADEMEYER, C. et al. Features of Recently Transmitted HIV-1 Clade C Viruses that Impact Antibody Recognition: Implications for Active and Passive Immunization. **PLoS Pathog**, v. 12, n. 7, p. e1005742, Jul 2016.

RANGEL, H. R. et al. Deletion, insertion and stop codon mutations in vif genes of HIV-1 infecting slow progressor patients. **J Infect Dev Ctries**, v. 3, n. 7, p. 531-538, Aug 2009.

REDE BRASIL DE IMUNOGENÉTICA. **REDOME**. Disponível em: <<http://imunogenetica.org/>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

RIBEIRO, R. M. et al. Estimation of the initial viral growth rate and basic reproductive number during acute HIV-1 infection. **J Virol**, v. 84, n. 12, p. 6096-6102, Jun 2010.

RIVEIRA-MUÑOZ, E. et al. Increased expression of SAMHD1 in a subset of HIV-1 elite controllers. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 11, p. 3057-3060, Nov 2014.

ROBERTS, L. et al. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. **AIDS**, v. 24, n. 6, p. 819-831, Mar 2010.

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

RUIZ, T. M. et al. Human leukocyte antigen allelic groups and haplotypes in a Brazilian sample of volunteer donors for bone marrow transplant in Curitiba, Paraná, Brazil. **Transplantation Proceedings**, v. 37, p. 2293–2296, 2005.

SABIN, C. A.; LUNDGREN, J. D. The natural history of HIV infection. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 8, n. 4, p. 311-317, Jul 2013.

SAGAR, M. et al. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. **J Virol**, v. 80, n. 19, p. 9586-9598, Oct 2006.

SAHA, K. et al. Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. **J Virol**, v. 72, n. 1, p. 876-81, Jan 1998.

SAJADI, M. M. et al. Epidemiologic characteristics and natural history of HIV-1 natural viral suppressors. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 50, n. 4, p. 403-408, Apr 2009.

SAJADI, M. M. et al. IL28B genotype does not correlate with HIV control in African Americans. **Clin Transl Sci**, v. 4, n. 4, p. 282-284, Aug 2011.

SALGADO, M. et al. Characterization of host genetic expression patterns in HIV-infected individuals with divergent disease progression. **Virology**, v. 411, n. 1, p. 103-112, Mar 2011.

SANDLER, N. G. et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. **J Infect Dis**, v. 203, n. 6, p. 780-790, Mar 2011.

SANDONÍS, V. et al. A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. **Virology**, v. 391, n. 1, p. 73-82, Aug 2009.

SANTA-MARTA, M. et al. Host Factors and HIV-1 Replication: Clinical Evidence and Potential Therapeutic Approaches. **Front Immunol**, v. 4, p. 343, 2013.

SANTOS, J. S. et al. Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil. **J AIDS Clin. Res.** v. 6, n. 9, 2015.

SANTOS DA SILVA, E. et al. The Envelope Cytoplasmic Tail of HIV-1 Subtype C Contributes to Poor Replication Capacity through Low Viral Infectivity and Cell-to-Cell Transmission. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. e0161596, 2016.

SAWYER, S. L. et al. High-frequency persistence of an impaired allele of the retroviral defense gene TRIM5 α in humans. **Curr Biol**, v. 16, n. 1, p. 95-100, Jan 2006.

SHARP, P. M.; HAHN, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, p. a006841, Sep 2011.

SHASHA, D.; WALKER, B. D. Lessons to be Learned from Natural Control of HIV - Future Directions, Therapeutic, and Preventive Implications. **Front Immunol**, v. 4, p. 162, 2013.

SHAW, G. M.; HUNTER, E. HIV transmission. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 11, Nov 2012.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol**, v. 7, p. 539, Oct 2011.

SILVA, M. M. et al. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 495-501, 2010 Sep-Oct 2010.

SILVEIRA, J. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. **J Clin Virol**, v. 54, n. 1, p. 36-41, May 2012.

SIMON, V.; BLOCH, N.; LANDAU, N. R. Intrinsic host restrictions to HIV-1 and mechanisms of viral escape. **Nat Immunol**, v. 16, n. 6, p. 546-553, Jun 2015

SMYTH, R. P. et al. Identifying recombination hot spots in the HIV-1 genome. **J Virol**, v. 88, n. 5, p. 2891-2902, Mar 2014.

SMYTH, R. P.; NEGRONI, M. A step forward understanding HIV-1 diversity. **Retrovirology**, v. 13, p. 27, Apr 2016.

SOBTI, R. C. et al. Insights into the role of IL-12B and IFN-gamma cytokine gene polymorphisms in HIV-1/AIDS infection. **Folia Biol (Praha)**, v. 56, n. 3, p. 110-115, 2010.

SSEWANYANA, I. et al. Profile of T cell immune responses in HIV-infected children from Uganda. **J Infect Dis**, v. 196, n. 11, p. 1667-1670, Dec 2007.

STEPHENS, H. A. Immunogenetic surveillance of HIV/AIDS. **Infect Genet Evol**, v. 12, n. 7, p. 1481-91, Oct 2012.

STREMLAU, M. et al. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. **Nature**, v. 427, n. 6977, p. 848-853, Feb 2004.

TANG, J. et al. Human leukocyte antigen variants B*44 and B*57 are consistently favorable during two distinct phases of primary HIV-1 infection in sub-Saharan Africans with several viral subtypes. **J Virol**, v. 85, n. 17, p. 8894-8902, Sep 2011.

TEBIT, D. M.; ARTS, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. 45-56, Jan 2011.

TEBIT, D. M. et al. HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? **AIDS Rev**, v. 9, n. 2, p. 75-87, 2007 Apr-Jun 2007.

TEIXEIRA, S. L. et al. Association of the HLA-B*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. **Genes Immun**, v. 15, n. 4, p. 256-262, Apr 2014.

TEODORESCU, L. L.; TEIXEIRA, P. R. **Histórias da Aids no Brasil 1983-2003**: As respostas governamentais à epidemia de aids. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde/Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, 2015.

THOMAS, D. L. et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 798-801, Oct 2009.

TOLEDO, P. V. et al. Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Paraná, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 3, p. 230-236, 2010.

TORRESILLA, C.; MESNARD, J. M.; BARBEAU, B. Reviving an old HIV-1 gene: the HIV-1 antisense protein. **Curr HIV Res**, v. 13, n. 2, p. 117-124, 2015.

TOWNSLEY, S. et al. Conserved Role of an N-Linked Glycan on the Surface Antigen of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Modulating Virus Sensitivity to Broadly Neutralizing Antibodies against the Receptor and Coreceptor Binding Sites. **J Virol**, v. 90, n. 2, p. 829-841, Oct 2015.

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

TSIBRIS, A. Update On CCR5 Inhibitors: Scientific Rationale, Clinical Evidence, and Anticipated Uses. **The PRN Notebook**, v. 12, 2007. Disponível em: < <http://prn.org/index.php> > Acesso em 20/06/2014.

UNAIDS United Nations Joint Programme on HIV/AIDS. **HIV data and estimates**. 2016. Disponível em: < <http://www.unaids.org> > Acesso em 25/11/2016.

_____. **Children and HIV Fact sheet**. 2016. Disponível em: < <http://www.unaids.org> > Acesso em 25/11/2016.

VALLARI, A. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **J Virol**, v. 85, n. 3, p. 1403-1407, Feb 2011.

VAN DAMME, N. et al. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. **Cell Host Microbe**, v. 3, n. 4, p. 245-252, Apr 2008.

VARGAS, A. E. et al. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. **Braz J Med Biol Res**, v. 39, n. 3, p. 321-325, Mar 2006.

VENNER, C. M. et al. Infecting HIV-1 Subtype Predicts Disease Progression in Women of Sub-Saharan Africa. **EBioMedicine**, v. 13, p. 305-314, Nov 2016.

VÉRAS, N. M. et al. High-resolution phylogenetics and phylogeography of human immunodeficiency virus type 1 subtype C epidemic in South America. **J Gen Virol**, v. 92, n. Pt 7, p. 1698-1709, Jul 2011.

VISSEAU, B. et al. Hiv-2 molecular epidemiology. **Infect Genet Evol**, v. 46, p. 233-240, Dec 2016.

VUILLEUMIER, S.; BONHOEFFER, S. Contribution of recombination to the evolutionary history of HIV. **Curr Opin HIV AIDS**, v. 10, n. 2, p. 84-89, Mar 2015.

WALTER, B. L. et al. Functional characteristics of HIV-1 subtype C compatible with increased heterosexual transmissibility. **AIDS**, v. 23, n. 9, p. 1047-1057, Jun 2009.

WANG, W. et al. A systematic study of the N-glycosylation sites of HIV-1 envelope protein on infectivity and antibody-mediated neutralization. **Retrovirology**, v. 10, p. 14, Feb 2013.

WEI, X. et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. **Nature**, v. 422, n. 6929, p. 307-312, Mar 2003.

WILLIAMS, R. et al. HIV-1 Tat co-operates with IFN-gamma and TNF-alpha to increase CXCL10 in human astrocytes. **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. e5709, May 2009.

WINKLER, C. et al. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). **Science**, v. 279, n. 5349, p. 389-393, Jan 1998.

WHO Network for HIV Isolation and Characterization. HIV type 1 variation in World Health Organization-sponsored vaccine evaluation sites: genetic screening, sequence analysis, and preliminary biological characterization of selected viral strains. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 10, n. 11, p. 1327-43, Nov 1994.

XIAO, L. et al. Adaptation to promiscuous usage of CC and CXC-chemokine coreceptors in vivo correlates with HIV-1 disease progression. **AIDS**, v. 12, n. 13, p. F137-143, Sep 1998.

YAMADA, T.; IWAMOTO, A. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Arch Virol**, v. 145, n. 5, p. 1021-1027, 2000.

YU, Q. et al. APOBEC3B and APOBEC3C are potent inhibitors of simian immunodeficiency virus replication. **J Biol Chem**, v. 279, n. 51, p. 53379-53386, Dec 2004.

ZHANG, M. et al. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV, SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. **Glycobiology**, v. 14, n. 12, p. 1229-1246, Dec 2004.

ZHANG, H. et al. Characterization of HIV-1 subtype C envelope glycoproteins from perinatally infected children with different courses of disease. **Retrovirology**, v. 3, p. 73, Oct 2006.

ZHANG, H. et al. Associations of HLA class I antigen specificities and haplotypes with disease progression in HIV-1-infected Hans in Northern China. **Hum Immunol**, v. 74, n. 12, p. 1636-1642, Dec 2013.

APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Dra Sonia Mara Raboni e Jucélia S. dos Santos, pesquisadores da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado “**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO HIV-1 EM PACIENTES NÃO PROGRESSORES POR LONGO TEMPO**”.

O objetivo desta pesquisa é identificar os tipos de HIV-1 circulantes entre pacientes que permanecem por um longo período de tempo sem progredir para a doença. A identificação de fatores de proteção contra a evolução para a doença pode contribuir para futuras medidas terapêuticas contra a infecção pelo HIV.

Caso você participe da pesquisa, será necessário realizar coletas de sangue periódicas.

Para tanto você deverá comparecer na coleta do laboratório para colher amostra de sangue, serão necessários uma coleta de 5 ml de sangue por meio de punção em veia do braço esquerdo ou direito, a cada 6 (seis) meses. No mesmo período em que você realiza periodicamente suas consultas médicas e exames laboratoriais de rotina por aproximadamente 2 (dois) anos.

É possível que você experimente algum desconforto ou dor no local em que foi retirado o sangue, sendo que geralmente desaparece em meia hora. Não há nenhum risco para você na coleta deste exame.

Os benefícios esperados com essa pesquisa são:

1. identificar possíveis fatores de proteção contra a progressão da doença
2. contribuir para futuras medidas terapêuticas contra a infecção pelo HIV.

No entanto, nem sempre você será diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, mas poderá contribuir para o avanço científico

A pesquisadora, Jucélia Stadinicki dos Santos, bióloga, telefone de contato: 9107-9990, e-mail: jucelias_santos@yahoo.com.br responsável por este estudo poderá ser contatada no laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas – Rua Padre Camargo, 280 – telefone 3360-7974 (local – endereço comercial, horário, e-mail, telefone) para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam o termo de consentimento livre e esclarecido assinado. A sua recusa não implicará na interrupção de seu atendimento e/ou tratamento, que está assegurado.

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o

As informações relacionadas ao estudo poderão conhecidas por pessoas autorizadas como seu médico, o orientador e pesquisadores desse estudo. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a sua identidade seja preservada e seja mantida a confidencialidade.

As despesas necessárias para a realização da pesquisa (exames, medicamentos etc.) não são de sua responsabilidade e pela sua participação no estudo você não receberá qualquer valor em dinheiro. Você terá a garantia de que problemas relacionados à punção venosa periférica decorrentes do estudo serão tratados na seção de coleta da Unidade de Apoio Diagnóstico.

Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

A amostra de sangue coletada e por mim autorizada por meio desse documento poderá ser utilizada em outras pesquisas futuras:

() CONCORDO

() NÃO CONCORDO

Eu, _____ li esse termo de consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta decisão afete meu tratamento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

(Assinatura do sujeito de pesquisa ou responsável legal)

Local e data

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do Pesquisador ou quem aplicou o TCLE

Local e data

Rubricas:

Sujeito da Pesquisa e /ou responsável legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o

APÊNDICE 2 - LISTA DE SEQUÊNCIAS

Sequências extraídas do banco de dados *Los Alamos National Laboratory HIV Database* (disponível em <https://www.hiv.lanl.gov/content/index>) utilizadas para avaliação da região V3-V5_{gp120} gene *env*, download em em 31 de agosto de 2016 e 20 de janeiro de 2017.

Sequências HIV-1 subtipo C ano 2010 download em 31 de agosto de 2016

KM190506 HM630292 HM630291 HM630290 HM630289 HM63028 HM630287 HM630286
 HM630284 HM630283 HM630282 HM630281 HM630280 HM630279 HM630278 HM630277
 HQ845232 HQ845231 JF320903 JN176197 JN176195 JN176194 JN176192 JN019807
 JN019806 JN019805 JN019804 JN019803 JN019802 KF818778 KF818777 KF818697
 KF818693 KF818688 KF818775 JN176193 KF818704 HQ452613 HQ452583 HQ452571
 HQ452556 JX993344 HQ452598 JX993346 KF818676 KF818674 KF835098 KF835021
 KF835009 KF835043 JX993342 KF835038 JX993340 JX993338 JX993336 JX993334 JX993332
 JX993330 JX993328 JX993326 JX993324 JX993322 JX993320 JX99334 JX993343 JX993341
 JX993339 JX993337 JX993335 JX993333 JX993331 JX993329 JX993327 JX993325 JX993323
 JX993321 JX993319 JN176198 KM513818 JN176196 JN176194 JF937888 JF937911 JF937881
 KC187660 KC187536 KC187302 KC187278 KC186610 KC186542 KC186456 KC186236
 KC186202 KC247434 KC807983 KC807980 KC807968 KC807956 KC807952 KC807940
 KC807929 KC807919 KC634162 KF725937 KF726025 KF726022 KF726020 KF726015
 KF726014 KF726013 KF726011 KF726007 KF726006 KF726001 KF726000 KF725999
 KF725998 KF725997 KF725996 KF725995 KF725994 KF725993 KF725992 KF725991
 KF725990 KF725989 KF725987 KF725984 KF725983 KF725979 KF725978 KF725976
 KF725975 KF725974 KF725973 KF725972 KF725971 KF725970 KF725969 KF725968
 KF725966 KF725963 KF725962 KF725961 KF725960 KF725959 KF725957 KF725956
 KF725954 KF725952 KF725951 KF725950 KF725949 KF725948 KF725947 KF725945
 KF725944 KF725942 KF725941 KF725938 KF725936 KF725935 KF725934 KF725933
 KF725932 KF725930 KF725929 KF725927 KF725925 KF725924 KF374570 KF374543
 KF374540 KF374539 KF374537 KF374505 KF374502 KF374499 KF374497 KF374470
 KF374469 KF374466 KF374463 KF374458 KF374457 KF374449 KF374447 KF374435
 KF374434 KF374429 KF374428 KF374422 KF374420 KF374417 KF374407 KF374404
 KF374400 KF374396 KF374394 KF374392 KF374389 KF374388 KF374387 KF374384
 KF374343 KF374342 KF374339 KF374338 KF374335 KF374332 KF374329 KF374328
 KT427843 KR861345 KR861340 KR861338 KR861337 KR861333 KR861331 KR861329
 KR861326 KR861325 KR861317 KR861316 KR861315 KR861313 KT221004 KF374326
 KF374325 KF374322 KF374321 KF374320 KF374318 KF374317 KF374315 KF374313
 KF374312 KF374310 KF374309 KF374307 KF374306 KF374304 KF374303 KF374300
 KF374295 KF374287 KF374285 KF374284 KF374282 KF374278 KF374277 KF374276
 KF374273 KF374272 KF374270 KF374269 KF374265 KF374264 KF374262 KF374261
 KF374259 KF374256 KF374253 KF374252 KF374225 KF374224 KF374221 KF374220
 KF374192 KF374191 KF374184 KF374179 KF374177 KF374148 KF374147 KF374144
 KF374143 KF374142 KF374137 KF374136 KF374135 KF374134 KF374132 KF374131
 KF374130 KF374129 KF374128 KF374127 KF374126 KF374125

Sequências HIV-1 subtipo C (até 1995)

EF02695 AY833060 AY833059 L48068 X90912 U90912 U07237 U06719 U06718 U06717
 U06716 L22944 L22956 L22954 L22948 L22946 JQ715373 JQ715372 EF26971 EF26970
 EF26969 EF26968 EF26967 EF26966 DQ199254 DQ199246 DQ199239 DQ199237 DQ199235
 DQ199229 DQ199225 AY249763 AY249756 AF095826 AF095825 AF053224 AF053223
 AF053222 AF053221 AF053220 AF053219 AF053218 AF053216 AF053215 AF053214
 AF101465 AF101462 AD101461 AF101460 L48067 U07103 U07101 U07101 U07099
 EF373536 DQ367258 QD367257 DQ367246 DQ367245 AY669746 AY669744 AY669742
 AY669739 AY669738 U08455 U08454 U08453 AF101119 U31362 U29698 U29697 U29696
 U29694 U29179 U39257 U39257 U39252 U39250 U39249 U39248 U39246 U39245 U39244
 U09126 U1521 GN836357 FW503062 HQ912711 HQ912708 IQ715376 IQ715368

Sequências HIV-1 subtipo C do Brasil

GQ401281 HM854674 HM854664 HM854668 HM854671 GQ401284 GQ401279 EU340755
 JN199027 JN196026 EF433508 JN196030 EF433504 EF433496 AY877024 EU340772
 GQ401286 GQ401285 GQ401280 HM854677 HM854670 JN196031 JN196026 JN196032
 JN196024 EU340786 JN196020 JN196033 EU258169 EU340776 KX673762 KX673763
 KX673764 KX673767 KX673769 KX673770 KX673772 KX673773 KX673774 KX673775
 KX673776 KX673778 KX673779 KX673780 KX673781 KX673785 KX673790 KX673792
 KX673795 KX673797 KX673799 KX673800 KX673802 KX673803 KX673804 KX673805
 KX673807

Sequências HIV-1 subtipo C LTNP

JN393554 JN393551 JN393546 JN393543 JN393540 JN393537 JN393536 JN393532
 JN393530 KT252545 KT260116 KT260097 KT260093 KT260086 KT260080 KT260091
 KT260105

Sequências HIV-1 subtipos B e C progressores

EF203986 EF203982 EF203972 DQ435684 AY821490 FJ443982 FJ443962 FJ443415
 FJ443378 FJ443340 FJ443208 GU216836 GU216817 GU216801 GU216723 JN681225
 JN681224 JN681223 KC863553 KC863541 KC863475 KC863460 KC863427 KC863410
 EU744175 EU744145 EU744096 EU744009 EU330133 EU329974 EU329887 EU272334
 EU272316 EU272304 EU272277 EU272265 EU272235 EU272228 EU272218 EU272205
 EU272193 DQ178991 DQ410618 DQ410598 DQ410582 DQ410579 DQ410568 DQ410559
 DQ410541 DQ410527 DQ410526 AY348525 AY348477 AY348407 AY348375 AF138522
 AF138407 AF105823 AF105772 AF105745 AF105537 AF105517 U95497 U95486 U95470
 U95469 U95459 U95448 GU455460 HQ644976 JF701706

APÊNDICE 3 - ARTIGOS

ARTIGO 1: Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil



**AIDS & Clinical
Research**

Santos et al., J AIDS Clin Res 2015, 6:9
<http://dx.doi.org/10.4172/2155-6113.1000502>

Research Article

Open Access

Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil

Santos JS¹, Ribeiro CE², Almeida SM^{3,4} and Raboni SM^{3*}

¹Postgraduate Program in Internal Medicine and Health Science, Universidade Federal do Paraná, Brazil

²Infectious Diseases Division, Universidade Federal do Paraná, Brazil

³Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Brazil

⁴Instituto de Pesquisa Pele Pequeno Príncipe, Brazil

Abstract

Objectives: We evaluated the HIV-1 subtype diversity, clinical, genetic and epidemiological profiles of a cohort of long-term non-progressor (LTNPs) followed-up at a referral hospital in southern Brazil.

Methods: This prospective study included patients who had more than eight years of HIV-1 diagnosis without antiretroviral therapy (ART). Clinical and epidemiological profiles of LTNPs were obtained from interviews and medical records. Periodic blood draws were taken to determine HIV-1 genetic variability and host genetic patterns.

Results: The study included 22 LTNPs, corresponding to 1.57% of patients followed-up at the Infectious Diseases Division. The gender distribution was nearly homogeneous, median age was 45 years; 16% were elite controllers, 23% were viremic controllers and 59% were non-viremic controllers. Three out of 22 patients were heterozygous for the CCR5Δ32 genotype. In most study patients, receptor use was consistent with an R5 phenotype. HIV-1 genotyping showed subtype C in 50% (11/22) of patients, subtype B in 32% (7/22), and the recombinant forms BF and BC in 14% (3/22) and 4% (1/22), respectively. There was a significant association of subtype C with female patients, and LTNPs patients infected with subtype C had lower viral loads compared with those infected with subtype B.

Conclusions: The HIV/AIDS epidemic in Brazil is complex, and there are variations in the subtype distribution. This is the first study of LTNPs in the southern region of Brazil, and the data obtained will help to characterize this group and aid in determining the probable mechanisms associated with delayed clinical progression.

Keywords: HIV; Long-term non-progressor; Elite controllers

Introduction

Among HIV+ individuals, there is a group with a markedly slower progression to AIDS; these individuals, called long-term non-progressor (LTNPs), present an asymptomatic stage of the disease for several years without antiretroviral therapy (ART) use, with high CD4+ T cell counts and low or undetectable viral loads. The control of viral replication and limited progression observed in LTNPs has been shown to be associated with various host, immune, and viral factors. Regarding the associated host characteristics, some HLA alleles, particularly HLA B*27 and B*57, have been found to be overexpressed in LTNPs. Other genetic markers, such as the heterozygous Δ32CCR5 genotype and CCR5 downregulation, lead to higher levels of chemokines, which activate receptor internalization, have been shown to be related to a longer clinical evolution and viral replication control. From a virological point of view, significant deletions and deleterious mutations have been found in viruses isolated from LTNPs [1-4].

Studies suggest that clinical damage in HIV-1 infected patients can vary depending on differences in viral and host characteristics [3,5]. HIV-1 subtypes may exhibit differences in transmission rates, disease progression, neurotoxicity, antiretroviral treatment failure profiles, and the accuracy of viral load measurements [6-8]. The HIV/AIDS epidemic in Brazil is complex, subtype B is the most common, followed by subtypes C and F1 and the recombinant forms BC and BF1. However, divergent distribution patterns of HIV-1 subtypes have been reported in distinct regions of the Country [9,10]. In the northern region, subtype B is the most common, followed by subtype F. In the northeast also predominant subtype B followed by F subtype and recombinant forms, which is the same as that reported in the midwest region of the country [11].

In the southeast, where the HIV epidemic began, there is a higher

frequency of genotype B, followed by F and the recombinant forms, and a lower percentage of subtype C [12]. In the southern region, there is a very different profile distribution, with a progressive increase of subtype C infection (20-50% of cases), especially in women and newly infected patients [10,13-16]. The aim of the present study was to evaluate the HIV-1 subtype diversity, and the clinical, genetic, and epidemiological profiles of a cohort of LTNPs followed-up at a referral hospital in Curitiba, Paraná, southern Brazil.

Material and Methods

Study subjects

This is a prospective cohort study carried out in the Infectious Diseases Division at a tertiary care academic center Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR) in Curitiba, southern Brazil. The study included patients who had more than eight years of HIV-1 diagnosis without ART. The clinical and epidemiological profiles of the LTNPs were obtained from interviews and medical

*Corresponding author: Sonia Mara Raboni, Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná 180 General Carneiro Street, 3rd floor, Curitiba, Paraná, Brazil, 80060-900; Tel: +55 41 33607974; Fax: +55 41 33601811; E-mail: sraboni@ufpr.br / raboni.sonia@gmail.com

Received August 20, 2015; Accepted September 21, 2015; Published September 28, 2015

Citation: Santos JS, Ribeiro CE, Almeida SM, Raboni SM (2015) Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil. J AIDS Clin Res 6: 502. doi:10.4172/2155-6113.1000502

Copyright: © 2015 Santos JS, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

record reviews. Periodic blood samples were obtained by standard venipuncture in ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA) tubes, and routine immunological and molecular assays to assess HIV infection were performed. The Institutional Review Board approved this study (IRB: #003004912.7.0000.0096), and all included patients provided written informed consent.

PCR amplification, sequencing, and HIV subtyping

DNA was extracted from 10^7 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) separated on a Histopaque[®] 1077 (Sigma-Aldrich) gradient using a commercial extraction kit, according to the manufacturer's protocol. Proviral DNA amplification and sequencing of the *pol* (nucleotides 2077–3574 in HXB2) and *env* (nucleotides 7001–7667 in HXB2) genes were performed as previously described [17,18]. The PCR products generated were sequenced using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions, in an Applied Biosystems[®] 3130 Genetic Analyzer. Nucleotide sequences were edited using the DNASTAR Lasergene SeqMan program (version 7.0; Dnastar, Inc., Madison, WI). The subtype assignment of sequences was confirmed using the REGA HIV subtyping tool v.3.0 (<http://hivdb.stanford.edu/RegaSubtyping/stanford-hiv/typingtool/>), and by performing maximum likelihood (ML) phylogenetic analyses with HIV-1 group M subtype reference sequences of HIV-1 subtypes available in the *Los Alamos* database, (<http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>), constructed under the best-fit model using the algorithm implemented in MEGA 6.0 package [19]. Recombinant profiles were inferred by bootscanning analysis using SimPlot 3.5.1 software [20].

Characterization of CCR5A-32 genotype and phenotype

Analysis of the CCR5 polymorphisms in PBMC DNA were

analyzed by PCR as previously described [21]. The primers amplified a 225-nt gene fragment for the wild-type allele and a 193-nt fragment for the CCR5A-32 allele, and these fragments were separated on a 2% TBE agarose gel.

Co-receptor usage predictions based on V3 sequences were performed by the 11/25 rules using Geno2pheno (<http://coreceptor.bioinf.mpiisb.mpg.de/cgi-bin/coreceptor.pl>) with a false-positive rate of 0.1 and the PhenoSeq platform (<http://burned.edu.au/phenoSeq>).

Statistical analyses

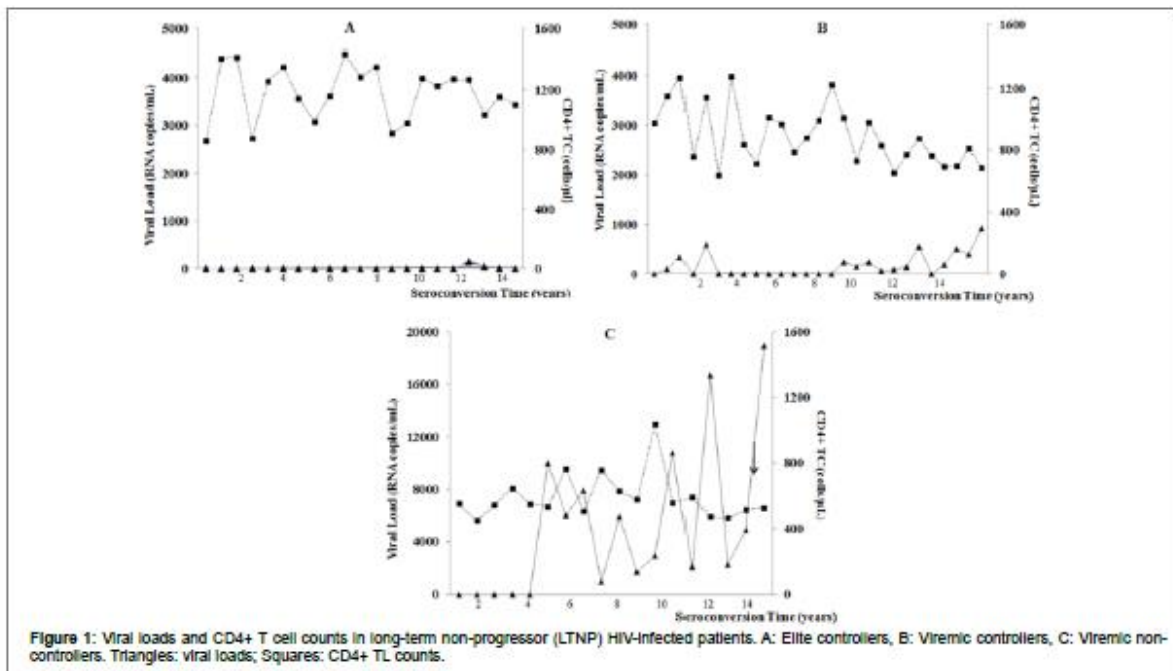
HIV-1 subtype, demographic, epidemiological, clinical, and genetic data were compiled and analyzed using GraphPad Prism[®] software version 5.03 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Fisher's exact test or the χ^2 test was used to assess between-group differences, and the Mann-Whitney test was used for continuous variables. Results for continuous data are expressed as median \pm interquartile range. All *p*-values are two-tailed, and a *p* value of less than 0.05 was considered significant.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported in this study were deposited in GenBank under accession numbers KT203233 to KT 203271 and KT260070 to KT260117.

Results

To date, 22 patients, corresponding to 1.57% of the total patients followed-up at the Infectious Diseases Division of HC/UFPR were identified as LTNPs. The gender distribution was almost homogeneous (54% female), and the median age at the time of the study was 45 years (range, 12–62y). The risk behavior for HIV-1 infection was sexual activity in 14 (63%; 71% were heterosexual), vertical infection in 5



(23%), and injectable drug use in 3 (14%) cases. The median time of HIV-1 diagnosis was 13.5 years (IQR 12;16), and the median CD4+ T lymphocyte count was 684 cells/mm³ (IQR 569;890).

Classification of long-term non-progressor (LTNPs)

According to the summarized classification of Casado and collaborators [4], 4/22 (18%) patients were classified as elite controllers (EC), with undetectable viral loads in nearly all tests, 5/22 (23%) individuals presented low viral loads (up to 2000 copies/mL) and were classified as viremic controllers, and the remaining LTNPs (13/22; 59%) presented variable viral loads in evaluated scores (Figure 1). Plasma viral load was systematically determined from

different detection models proposed by the network of public health laboratories of the Brazilian Ministry of Health (Cobas* Amplicor HIV-1 Monitor assay-Roche Diagnostics, and VERSANT* HIV-1 RNA 3.0 assay- Siemens Healthcare Diagnostics, USA), with a detection limit of 50 RNA copies/mL. Currently the detection limit is 40 RNA copies/mL (RealTime HIV-1 Assay- Abbott Laboratories). The included patients presented with CD4+ T lymphocytes greater than 400 cells/ μ L, and no significant alteration was observed between the nadir and current values (Figure 2).

Patient genetic polymorphisms

Genetic polymorphisms associated with slow progression were analyzed, and three out of 22 (14%) patients were heterozygous for the CCR5 Δ 32 genotype. Receptor use, deduced from the V3 amino acid sequence by genotypic algorithms, was consistent with an R5 phenotype in 21 (95%) of the studied patients.

HIV-1 subtypes

HIV-1 genotyping of the *env* and *pol* genes showed subtype C in 11/22 (50%), subtype B in 7/22 (32%); and the circulating recombinant forms (CRFs) BF in 3/22 (14%) and BC in 1/22 (4%) patients (Figure 3). A recombinant genome in the *pol* region was observed in one sample. Evaluation of the variables according to HIV-1 subtype (B, C, or CRFs BC, or BF) only showed a statistically significant difference ($p = 0.03$) for the variable gender female, with a higher occurrence of subtype C (75% sexual transmission). The remaining variables did not seem to be associated with a specific subtype. Demographic variables and the host and viral characteristics are summarized by HIV-1 subtype in Table 1.

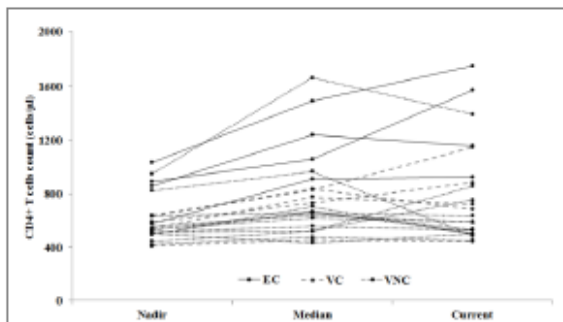
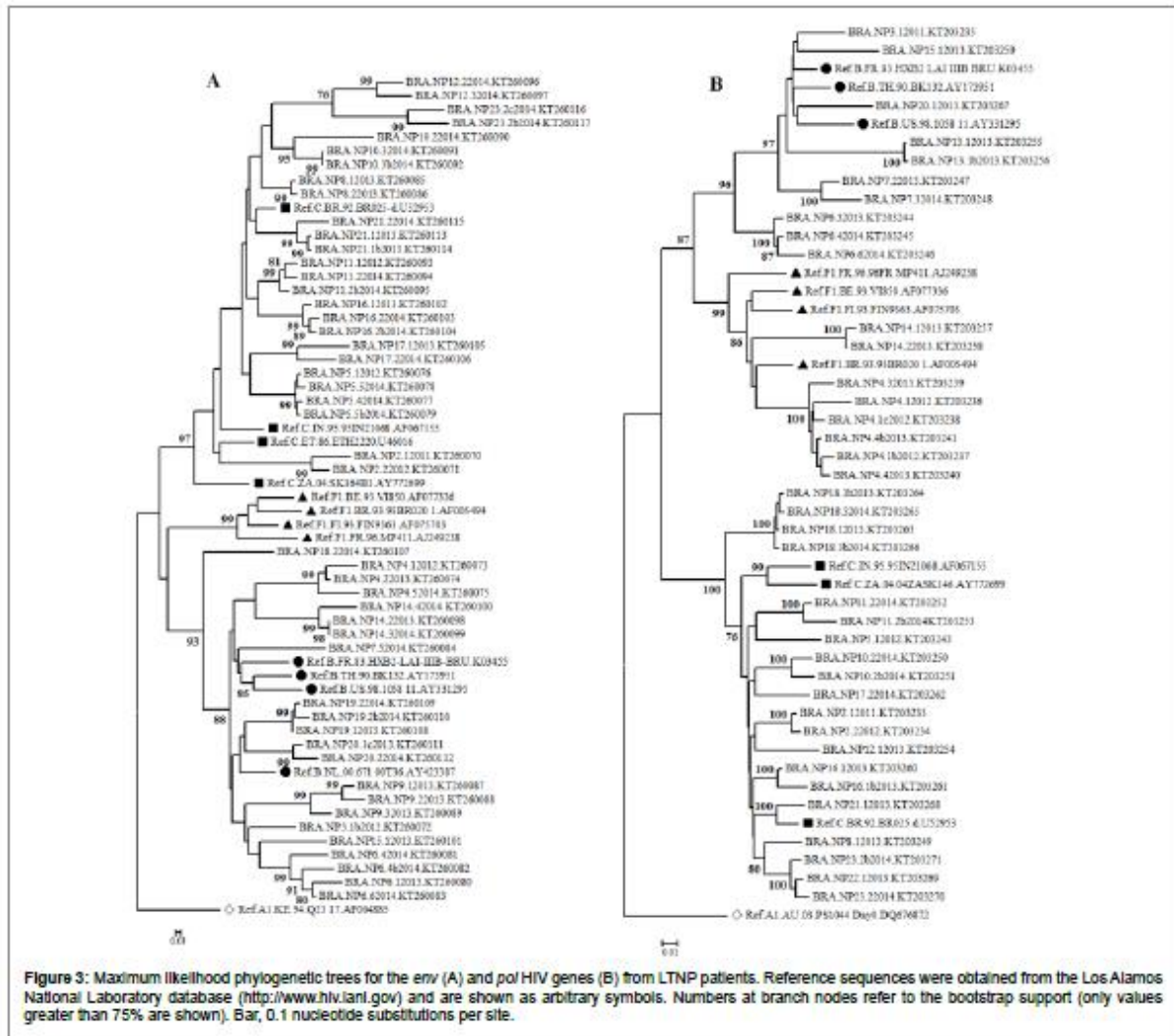


Figure 2: Nadir, median, and current CD4+ T cell counts of elite controllers, viremic controllers, and viremic non-controller HIV patients
 Note: Median: the median value of all CD4+ T cell counts reported in medical records.

Characteristic	Subtype B N = 7 (%)	Subtype C N = 11 (%)	CRFs N = 4 (%)	Total N = 22 (%)	P value
CCR5 Δ 32 heterozygous	0 (0)	1 (9)	2 (50)	3 (14)	0.055
Female	1 (14)	8 (73)	3 (75)	12 (54)	0.034
HIV risk factor					
Sexual	4 (57)	6 (55)	4 (100)	14 (63)	0.976
IDU	1 (14)	2 (18)	0 (0)	3 (14)	
Vertical infection	2 (29)	3 (27)	0 (0)	5 (23)	
Median time from HIV-1 diagnosis (IQR)	14y (13-18)	13y (11.5-16)	13y (11.75-14.5)	13.5y (12-16)	0.3438
Subject Age at Diagnosis (Median, IQR)	45y (41-51)	32y (27-37.5)	38.5y (24.75-44.5)	32y (22.5-36.5)	0.3113
LTNP classification					
EC	2/7 (29)	2/11 (18)	0/4 (0)	4 (18)	0.579
VC	1/7 (14)	2/11 (18)	2/4 (50)	5 (23)	0.348
NVC	4/7 (57)	7/11 (64)	2/4 (50)	13 (59)	0.886
Nadir CD4+ T cell count, cells/ μ L, median (IQR)	633 (489-839)	554 (512-636)	511 (473-544)	545 (501-637)	0.308
EC	874 (865-882)	803 (689-917)	-		
VC	536	636 (635-637)	499 (453-543)		
NVC	538 (436-680)	516 (503-543)	511 (502-520)		
Current CD4+ T cell count, cells/ μ L, median (IQR)	753 (677-1024)	684(559-1034)	512 (481-618)	702 (530-914)	0.220
EC	1365 (1260-1469)	1337 (1129-1545)	-		
VC	720	915 (799-1030)	661 (551-770)		
NVC	693 (587-787)	588 (517-721)	512 (503-521)		
Viral load, copies/mL, median (IQR)				NA	0.938
EC	Undetectable	Undetectable	-		
VC	1750 (745-6157)	361 (50-949)	724 (162-1948)		
VNC	18873(6814-33039)	9438 (3962-21900)	6980 (3560-11682)		

IDU = Intravenous drug user; LTNP = long-term non-progressor; EC = elite controller; VC = viremic controller; VNC = viremic non-controller; CRFs = circulating recombinants forms
Table 1: Patient demographics and viral characteristics of HIV-1-infected long-term non-progressor patients in Curitiba, southern Brazil



Discussion

Although the number of cases included in this study is low, it does not differ from the numbers reported in other studies of LTNPs [2,22,23] since they represent a very select group of patients presenting different patterns to disease progression. HIV-1 LTNP status is supposed to be associated with multiple viral and host factors. However, the mechanisms responsible for this phenotype have not been fully elucidated. Most studies evaluating LTNPs usually include patients with HIV subtype B; this is the first study that shows a cohort of non-progressor patients with different viral subtypes, pointing out that probably host factors likely have a greater correlation with non-progression than viral factors.

We showed a significant predominance of women infected with subtype C. Previous studies conducted in the southern region of Brazilian have already reported that subtype C is more frequently seen in the heterosexual population, with high prevalence of this clade

among women, whereas subtype B is more prevalent in MSM and MSMW [10,24,25]. This association was not observed with other HIV subtypes [16]. This greater predisposition for heterosexual transmission of subtype C appears to be related to a stronger preference for location in the female genital mucosa than other subtypes, which may enable both vertical and heterosexual transmission [5]. No other variables presented an association with a specific HIV-1 subtype; however, this assessment was limited due to the small sample size.

The subtypes found in the study group show the different patterns of HIV-1 subtypes that are distributed in Brazil; whereas the southern region has a higher frequency of subtype C; however, Raboni et al. [10] reported a higher frequency of subtype B (55%), followed by C (30%), F, and the CRFs (both 7.5%) for the city of Curitiba, with approximately the same distributions for gender, age, risk of contamination, and sexual behavior observed in our study. The higher frequency of subtype C observed in this study could be related to the reduced replicative rate

of this subtype. However, more studies are needed to identify any viral changes or mutations that may be related to the defective replication of viruses in this patient group.

HIV-1 subtypes may exhibit differences in transmission rates, disease progression, neurotoxicity, antiretroviral treatment failure profiles, and accuracy of viral load measurements [5]. Several clinical studies have addressed the differences in disease progression and outcome between viral subtypes. A study by Toulomi et al. (CASCADE data) [26] showed that, compared with subtype B, CD4+ T cell decline was significantly slower for subtypes A and CRF02 and marginally slower for subtype C. In addition, in most studies, subtype D was associated with faster disease progression. Easterbrook et al. [27] showed that subtype D was associated with a faster rate of CD4+ T cell decline and a higher rate of treatment failure when compared with subtypes A, B, and C. Other studies showed that compared to other subtypes, subtype D more frequently used the CXCR4 coreceptor, even in the early stages of infection, which could explain the faster rate of CD4+ TC decline and disease progression [28,29]. The relationship between subtype C and disease progression in naïve patients remains unclear. *In vitro* studies suggest that subtype C replication is less competent than subtype B replication [30-32]. In this study, we found that those LTNPs infected with subtype C (VC and NVC) had lower viral loads than those infected with subtype B, although the number of patients in each group was too small to determine the significance of the differences.

Miura et al. [33] showed that control of infection could be established very early, and in LTNPs, it could be the result of infection with attenuated viruses. Several studies have demonstrated the presence of defective viruses in LTNP cohorts [34-36]. In a study of HIV-1 LTNPs by Sandonis et al. [2], major deletions were detected in the 5'-LTR-gag region and pol gene that favor virus control, as well mutations in conserved residues in the region from the 5'-LTR to the nef gene. Casado et al. [35] reported the presence of low replicating viruses in a set of HIV-1 controllers with rare amino acids in the virus envelope that were associated with the presence of protective host alleles related to HIV control. Host protective factors, such as CCR5-Δ32 heterozygous and protective HLA alleles, have also been shown to be associated with infection control. However, most of these studies were restricted to subtype B virus.

The results of LTNP cohort studies are divergent with regard to the association between CCR5-Δ32 heterozygous and slower progression to AIDS. Concerning CCR5 polymorphisms, the frequencies of the CCR5Δ32 mutation in our study did not differ from that observed among the Caucasian population of seronegative individuals, as previously reported [37,38].

Bioinformatics tools have been widely used to determine coreceptor usage and could provide an alternative approach in clinical practice for screening candidates for CCR5 antagonist therapy, especially in cases where confirmatory assays for coreceptor usage are unavailable [39]. In this study, G2P and Phenoseq analysis showed R5 variants in almost all samples (95%), and the unique patient (VC) who showed the R5/X4 variants was CCR5Δ32 heterozygous. It is possible that other genetic alterations or variations in the expression of specific cellular proteins, such as the restriction factors APOBEC3, TRIM5, and Tetherin, are related to infection control [40]. Studies have shown that LTNPs with viral control tend to have a slightly higher number of CXCR4-expressing cells, although its association with disease progression is not significant [38].

Conclusion

This report is the first study of LTNPs in southern Brazilian, and the data obtained to date aid in our understanding of this group of HIV-infected patients, and will help in the determination of the probable mechanisms associated with delayed clinical progression. As most studies on LTNPs and HIV pathogenesis have focused on subtype B, further studies are needed to elucidate the host-viral interactions in LTNPs with various HIV-1 clades, to clarify the reasons for their slow progression, and to improve our understanding of the factors associated with this phenomenon, which could lead to novel therapeutic interventions.

References

1. Litson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawle AC, Wilber JC, et al. (1991) Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* 163: 959-965.
2. Sandonis V, Casado C, Alvaro T, Pemas M, Olivares I, et al. (2009) A combination of defective DNA and protective host factors are found in a set of HIV-1 ancestral LTNPs. *Virology* 391: 73-82.
3. Stevens LM, Lynn C, Golub RM (2012) JAMA patient page. HIV infection: the basics. *JAMA* 308: 419.
4. Casado C, Colombo S, Rauch A, Martinez R, Günthard HF, et al. (2010) Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One* 5: e11079.
5. Hemelaar J (2012) The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 18: 182-192.
6. Kantor R (2006) Impact of HIV-1 pol diversity on drug resistance and its clinical implications. *Curr Opin Infect Dis* 19: 594-606.
7. Kiwanuka N, Laeyendecker O, Robb M, Kigozi G, Arroyo M, et al. (2008) Effect of human immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) subtype on disease progression in persons from Rakai, Uganda, with incident HIV-1 infection. *J Infect Dis* 197: 707-713.
8. Geretti AM, Harrison L, Green H, Sabin C, Hill T, et al. (2009) Effect of HIV-1 subtype on virologic and immunologic response to starting highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 48: 1296-1305.
9. Cabral VP, Cunha CB, Magalhães EF, Pinto-Neto LF, Couto-Fernandez JC, et al. (2006) Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 881-885.
10. Raboni SM, Almeida SM, Rotta I, Ribeiro CE, Rosario D, et al. (2010) Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 1044-1049.
11. Salemi M, de Oliveira T, Soares MA, Pybus O, Dumans AT, et al. (2005) Different epidemic potentials of the HIV-1B and C subtypes. *J Mol Evol* 60: 598-605.
12. Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, et al. (2003) Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 17: 1063-1069.
13. Ferreira JL, Thomaz M, Rodrigues R, Harad D, Oliveira CM, et al. (2008) Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: preponderance of clade C among males with recent infections. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 800-808.
14. Bello G, Guimarães ML, Passaes CP, Matos Almeida SE, Veloso VG, et al. (2009) Short communication: Evidences of recent decline in the expansion rate of the HIV type 1 subtype C and CRF31_BC epidemics in southern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 25: 1065-1069.
15. Toledo PV, Carvalho DS, Rossi SG, Brindeiro R, de Queiroz-Telles F (2010) Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis* 14: 230-236.
16. Almeida SE, de Medeiros RM, Junqueira DM, Gräf T, Passaes CP, et al. (2012) Temporal dynamics of HIV-1 circulating subtypes in distinct exposure categories in southern Brazil. *Virol J* 9: 306.
17. Delwart EL, Herring B, Rodrigo AG, Mullins JI (1995) Genetic subtyping of human immunodeficiency virus using a heteroduplex mobility assay. *PCR Methods Appl* 4: S202-216.

Citation: Santos JS, Ribeiro CE, Almeida SM, Raboni SM (2015) Clinical, Virologic and Immunological Outcomes in a Cohort of Long-Term Non-Progressor HIV Infected Patients, Southern Brazil. *J AIDS Clin Res* 6: 502. doi:10.4172/2155-8113.1000502

Page 6 of 6

18. Bello G, Passaes CP, Guimarães ML, Lorete RS, Matos Almeida SE, et al. (2008) Origin and evolutionary history of HIV-1 subtype C in Brazil. *AIDS* 22: 1993-2000.
19. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30: 2725-2729.
20. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkar D, Kulkarni SS, et al. (1999) Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73: 152-160.
21. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, et al. (1997) The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 3: 1160-1162.
22. Teixeira SL, de Sa NB, Campos DP, Coelho AB, Guimarães ML, et al. (2014) Association of the HLA-B*52 allele with non-progression to AIDS in Brazilian HIV-1-infected individuals. *Genes Immun* 15: 256-262.
23. Cortes FH, Passaes CP, Bello G, Teixeira SL, Vorsatz C, et al. (2015) HIV controllers with different viral load cutoff levels have distinct virologic and immunologic profiles. *J Acquir Immune Defic Syndr* 68: 377-385.
24. Silva MM, Telles FQ, da Cunha CA, Rhame FS (2010) HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. *Braz J Infect Dis* 14: 495-501.
25. Silveira J, Santos AF, Martinez AM, Góes LR, Mendoza-Sassi R, et al. (2012) Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. *J Clin Virol* 54: 36-41.
26. Touloumi G, Pantazis N, Pillay D, Paraskevis D, Chalk ML, et al. (2013) Impact of HIV-1 subtype on CD4 count at HIV seroconversion, rate of decline, and viral load set point in European seroconverter cohorts. *Clin Infect Dis* 56: 888-897.
27. Easterbrook PJ, Smith M, Mullen J, O'Shea S, Chrystle I, et al. (2010) Impact of HIV-1 viral subtype on disease progression and response to antiretroviral therapy. *J Int AIDS Soc* 13: 4.
28. Tschering C, Alaeus A, Fredriksson R, Björndal A, Deng H, et al. (1998) Differences in chemokine coreceptor usage between genetic subtypes of HIV-1. *Virology* 241: 181-188.
29. Kaleebu P, Nankya IL, Yirell DL, Shafer LA, Kyosimire-Lugemwa J, et al. (2007) Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: results from a rural Ugandan cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45: 28-33.
30. Ariën KK, Abrahams A, Quilones-Mateu ME, Kestens L, Vanham G, et al. (2005) The replicative fitness of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M, HIV-1 group O, and HIV-2 isolates. *J Virol* 79: 8979-8990.
31. Geretti AM (2006) HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis* 19: 1-7.
32. Tebit DM, Nankya I, Arts EJ, Gao Y (2007) HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? *AIDS Rev* 9: 75-87.
33. Miura T, Brumme ZL, Brockman MA, Rosato P, Sela J, et al. (2010) Impaired replication capacity of acute/early viruses in persons who become HIV controllers. *J Virol* 84: 7581-7591.
34. Brumme ZL, Li C, Miura T, Sela J, Rosato PC, et al. (2011) Reduced replication capacity of NL4-3 recombinant viruses encoding reverse transcriptase-integrase sequences from HIV-1 elite controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 56: 100-108.
35. Casado C, Pemas M, Sardonis V, Alvaro-Cifuentes T, Olivares I, et al. (2013) Identification of a cluster of HIV-1 controllers infected with low replicating viruses. *PLoS One* 8: e77663.
36. Hadji K, Walker LA, Guha D, Murali R, Watkins SC, et al. (2014) Human immunodeficiency virus type 1 Vpr polymorphisms associated with progressor and nonprogressor individuals alter Vpr-associated functions. *J Gen Virol* 95: 700-711.
37. Pereyra F, Addo MM, Kaufmann DE, Liu Y, Miura T, et al. (2008) Genetic and immunologic heterogeneity among persons who control HIV infection in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 563-571.
38. Meijerink H, Indrati AR, van Crevel R, Joosten I, Koenen H, et al. (2014) The number of CCR5 expressing CD4+ T lymphocytes is lower in HIV-infected long-term non-progressors with viral control compared to normal progressors: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 14: 683.
39. Amuda LB, Araújo ML, Martínez ML, González CR, Duarte AJ, et al. (2014) Determination of viral tropism by genotyping and phenotyping assays in Brazilian HIV-1-infected patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 56: 287-290.
40. Borinskaya SA, Kozhekbaeva ZhM, Zalesov AV, Oliseeva EV, Maksimov AR, et al. (2012) Risk of HIV Infection and Lethality Are Decreased in CCR5Δ32 Heterozygotes: Focus Nosocomial Infection Study and Meta-analysis. *Acta Naturae* 4: 42-52.

ARTIGO 2**Young adults HIV-1 infected by vertical transmission in southern Brazil – clinical, demographic and virological features**

Beatris M Martin^{1*}, Jucélia S Santos^{2*}, Fernanda V Scapinello¹, Clea EL Ribeiro¹, Monica M Gomes-da-Silva³, Sonia M Raboni^{1,2}.

¹Infectious Disease Division, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

²Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná

³Internal Medicine Department, Universidade Federal do Paraná, Brazil

*Both authors contributed equally to this study.

Corresponding author:

Infectious Diseases Division/Laboratory of Virology

Universidade Federal do Paraná

280 Padre Camargo Street – 2nd floor – room 202

Zip code: 82060-240. Curitiba – PR, Brazil

E-mail: sraboni@ufpr.br

Abstract

Combined antiretroviral therapy promotes longer life expectancy, making it possible for perinatally HIV-infected patients to achieve adulthood. Past therapy was not always optimized, suggesting that virological and host features also play a role in survival. The aim of this study is to analyze disease progression associated with virological and host features in adolescents perinatally HIV-infected. A cross-sectional study was conducted including 81 patients identified in the public health database that were in follow-up in the reference service. Venous blood was collected to conduct tropism and viral subtype assays. The median age was 19 years old (IQR 18-21), mainly female (54.3%). Viral subtype was obtained for 66 (82%) patients, and subtypes B and C were found in 34% and 59%, respectively. Tropism assay was conducted in 55 (67%) patients, 71% were R5 and 29% X4. Distribution of viral tropism and subtype shows a significant association of subtype C with R5 tropism. Viral tropism in the pediatric population is heterogeneous. Subtype C presents in a higher frequency in southern Brazil, just as in the broader population infected with HIV by vertical transmission. The presence of R5 tropism not only extends treatment choices for these patients but may also impact on disease control.

Introduction

Combined antiretroviral therapy (cART) changed HIV-1 natural history resulting in better life expectancy, not only for HIV-infected adults but also for perinatally infected patients^{1,2}. HIV-1 infected children born in late 1980s and the 1990s are now becoming adults and, despite being young, carry a long HIV-1 clinical history. In the past, available treatment was limited and, even though a high mortality rate was expected, some children were able to survive. Biological markers, such as CD4+ T Cell count (CD4+) and viral load (VL), are poor predictors of rapid disease progression in infants². It has therefore been suggested that host and viral features are also related to disease progression.

Among the host factors evaluated, some HLA alleles and the heterozygous $\Delta 32$ CCR5 genotype have been related to a longer clinical evolution in adults³; however, the mechanisms of slower progression in children are not defined. Low immune activation despite high viremia and a low CCR5 expression on long-lived central memory CD4+ appear to be associated with slower progression in a cohort of antiretroviral therapy naïve children⁴.

Among the viral characteristics, the use of CCR5 (R5) coreceptor has been associated with the time of HIV-1 acquisition and early stages of the disease, where the switch to

CXCR4 (X4) is associated with an increase of viral load and disease progression^{5,6}. Moreover, clinical studies have addressed the differences in disease progression and outcome between HIV-1 subtypes and coreceptor use^{7,8}. HIV-1 subtype C seems to have a slower progression to AIDS^{8,9}. Subtype D viruses, by contrast, use X4 coreceptor more frequently, even in the early stages of infection, which could explain the faster rate of CD4+ decline and disease progression^{10,11}. However, the presence of X4 strains is widely associated with progression to AIDS in adults, yet in children some uncertainty still remains⁵.

The aim of this study is to report host and virological features in adolescents and young adults HIV-1 infected by vertical transmission, and analyze disease progression associated with the viral subtype, tropism, CCR5 polymorphism and cART history.

Material and Methods

Study subjects.

A cross-sectional study was conducted with perinatally HIV-1 infected adolescents and young adults from the Infectious Diseases Division at Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), a tertiary care academic center from Curitiba, southern Brazil. A total of 203 infants, born in Curitiba from January 1st, 1987 to December 31, 1999, were reported as HIV-1 vertically infected in the public health system database. The cohort for the present study comprises 61 patients

identified in the above database, 9 patients who had reached 16 years of age (born in 2000), and 11 individuals that were not born in Curitiba, but were receiving regular follow-up in the unit, thus totaling 81 patients included for the full review.

Clinical and epidemiological profiles were reviewed from the medical record. Blood samples were collected to assess HIV subtype, coreceptor tropism, viral load and CD4+ count. The study was performed in compliance with relevant laws and in accordance with the ethical standards of the Declaration of Helsinki, the Institutional Review Board approved this study (IRB: Number 24359713.7.0000.0096), and patients provided written informed consent.

PCR amplification, sequencing, and HIV-1 subtyping

Proviral DNAs were isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using AxyPrep Viral DNA/RNA kit (Axygen Biosciences CA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. Amplification and nucleotide sequencing of env gene to assess phylogenetic diversity, genotypic tropism test prediction and subtype determination were performed as described elsewhere¹². Some individuals had HIV subtype reported in the medical records, resulting from genotyping studies carried out to evaluate ART failure. This subtyping was performed by analysis of pol and gag gene regions¹³.

Determination of HIV-1 coreceptor tropism

Sequences of env-V3 loop were used to perform the genotypic tropism test. Viral tropism was predicted as implemented in the Geno2Pheno coreceptor tool¹⁴, clonal and clinical setting, using 10% FPR cut-off. As the test recognizes R5 virus and does not differentiate X4 from a dual tropic virus, in this study both X4 and dual tropic will be considered X4.

Characterization of CCR5 polymorphism

Determination of the CCR5 polymorphisms in PBMC DNA was carried out by PCR method as previously reported¹⁵. The primers amplified a 225-nt gene fragment for the wild-type allele and a 193-nt fragment for the CCR5 Δ -32 allele, and the PCR products were resolved on 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide (0.5 μ g/mL).

Statistical analyses

The variables were analyzed using descriptive and analytical statistics. The data were compiled using JMP® software version 5.2.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.) and analyzed using the GraphPad Prism® software version 5.03 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). In the analysis of quantitative variables absolute and relative frequencies were obtained, and the median and mean values calculated with their interquartile ranges and standard deviations, respectively. Chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the differences between the groups, while the Mann-Whitney test was used for continuous variables, where appropriate. A 95% confidence interval was assumed and *p*-values <0.05 considered statistically significant.

Nucleotide sequence accession numbers

The sequences reported in this study were deposited in *GenBank* under accession numbers KX673762 to KX673808.

Results

Clinical and Epidemiological characteristics

The analysis of medical records included 81 patients. The median age was 19 years (IQR, 18-21) and 44 (54.3%) were female. The median age at the time of diagnosis was 3 years old (IQR, 1-5) at which time patients were categorized, according to CDC classification¹⁶, 30% as C3, 25% as B3, 20% as B2, and 25% as other. Forty-eight percent presented an opportunistic infection in their previous history. Median nadir and last CD4+ T lymphocytes were 250 cells/mm³ (IQR, 120-413 cells/mm³) and 484 cells/mm³ (IQR, 355.5-736.5 cells/mm³), respectively. At last observation, 45 (56%) presented with suppressed viral load and among those with detectable viruses, the median was 3.92 log (IQR 2.95-4.59). All patients were advised to take cART, 29 (36%) were prescribed salvage regimens and 14 (17%) missed their follow-up.

Previous ART exposure and ART resistance

According to previous ART history, use of ART in monotherapy was reported in 4 (5%), dual therapy in 37(46%), and unboosted Protease Inhibitor (PI) in 31 (38%) cases. Overall, 51 patients were exposed to not optimized cART. At last observation, from those patients exposed to suboptimal regimens, 21 (41%) were taking salvage regimens compared to 30 (59%) who were not. Even considering the complexity of a salvage regimen, virological control was similar in both groups, with 57% and 53% of patients showing suppressed viral load, respectively. All salvage combinations included a PI, and Darunavir was the most frequent drug in this class.

Characterization of CCR5Δ-32 genotype

Genetic polymorphisms for the CCR5 coreceptor were found in 61 individuals, and in only 1 case (1.6%) a partial deletion in this gene was encountered, classified as heterozygous for the CCR5Δ-32 genotype.

HIV-1 subtype

Viral subtype was obtained from 66 patients, 18 (27%) were subtype B, 39 (59%) subtype C, 2 (3%) subtype F, and 7 (11%) circulating recombinant forms (BC, BF and F1), determined by env and/or pol sequences (figure 1). Regarding subtype B, 4/18 (22%) cases were classified as B' variant (GWG motif at the V3 tip).

Comparing HIV-1 subtype, a higher prevalence of subtype C was observed ($p=0.0004$), and there was a significant association between subtype C and R5 tropism ($p = 0.03$), whereas subtype B had almost the same distribution for R5 or X4 tropism. The CD4+ nadir was 372 cells/mm³ (IQR, 156-458 cells/mm³) in subtype C and 163.5 cells/mm³ (IQR, 74-232 cells/mm³) in subtype B ($p=0.0035$). The remaining variables did not seem to be associated with a specific subtype.

HIV-1 coreceptor tropism

Tropism prediction, deduced from the V3 amino acid sequence by genotypic algorithms, was obtained in 55 (68%) cases as demonstrated in Table 1. There was a significant difference between R5 and X4 tropic individuals associated with age, viral subtype and medians of CD4+ nadir. Other risk factors such as viral load, last CD4+ count, and use salvage therapy were not found to be significant (Table 1).

Discussion

Worldwide, studies evaluating HIV-1 patients infected vertically describe mostly a pediatric population¹⁷⁻¹⁹, with scarce reports about young adults and their disease progression²⁰. To our knowledge is the first Brazilian cohort evaluating exclusively young adults, which included more than 50% of vertical HIV infections notified from 1987 to 1999 in the region.

HIV-1 infection in the pediatric population has a distinct pattern of disease progression, ranging from a fast progression to AIDS and high mortality in the first two years of life to an intermediate and a slow progression^{2,21}. Patients included in this analysis probably reflect the benign pattern, and host and viral features are most likely associated with this slower progression.

Currently, pediatricians are providing care to a higher number of HIV-1 children at risk of acquiring HIV, then infected by HIV. In this analysis, some patients were diagnosed by the age of 10 or later. A clear implication of this finding is that, in order to diagnose early infection, pediatricians may need to be especially wary²². Data about CDC classification and age at HIV-1 diagnosis is similar to other Brazilian cohorts including young children, showing a common, but adverse past¹⁷⁻²⁰. In this cohort, the median CD4+ count at last observation did not differ from pediatric studies, despite the difference in age^{17,18,23}. However, CD4+ nadir was higher, and it may have been crucial to survival.

All patients were advised to take cART (a departure from the studies that included younger children^{17,23}) not only because mortality decreased after ART introduction in the pediatric population, but also because they presented moderate/severe disease at diagnosis. In addition, they were in regular follow-up in the adult Infectious Disease Division, thus following Brazilian guidelines for adults. Considering the less-than-optimal treatment history, fewer than half were taking salvage regimens, and virological control was not different from the ones with initial therapy schemes, suggesting low rates of adhesion in the past and the maintenance of first line therapy as an option in the future. In Europe, virological failure is higher among children than in adults, leading to a need for drug options, such as maraviroc, and salvage therapy²³.

A lack of virological suppression associated with improper ART adherence is related to viral resistance. In children, the rate of resistance is 2-3 times higher than in adults, and treatment failure is present after a median period of 60 months taking cART²⁴. Although in this study the frequency of salvage schemes was not high, concerns around virological control, optimized treatment and good adherence should always be present.

There is extensive documentation of the distribution of HIV-1 subtypes in southern Brazil^{13,25}. A previous report showed a prevalence of 27% clade C in adults (≥ 13 years) and 46% in children (< 13 years)¹³. In addition, C subtype has a stronger preference for location in the female genital mucosa, which can be associated with vertical transmission¹². Data in this study show adolescents infected with HIV-1 by vertical transmission predominantly with subtype C viruses.

Regarding the subtype B, the presence of B' variant is consistent with other studies that show that higher frequencies of these isolates appear quite restricted to Brazil²⁶⁻²⁹. The association of subtype C and R5 tropism, considering all patients have been infected for an extensive period of time, is also reported by other authors that indicate the occurrence of X4 or dual tropic virus appears to be rare in this clade^{11,30}. A conserved nature of HIV-1 C subtype V3 sequence may reduce the possibility of coreceptor switch in these viruses, which may explain the low prevalence of X4-tropic in this population³¹. Nevertheless, a study conducted in India, which included only HIV-1 subtype C perinatally infected patients, showed a higher prevalence of X4-tropic strains in an older population³². Analyzing the viral tropism and subtype B, the virus proportion of R5, X4 or dual tropic were all similar, in line with other studies that report about 50% of infections with this clade, and X4 usage subsequently emerging over time^{31,32}.

Data concerning HIV-1 coreceptor tropism in perinatally infected patients are heterogeneous. Most studies have found a significant association between X4 strains and lower CD4+ count and higher viral load^{6,17}. However, in this study, there was only a significant association between X4-tropic viruses and CD4+ nadir and age.

The impact of HLA alleles and immune activation was not evaluated, representing a limitation to this study. However, almost half the patients, at last observation, did not achieve virological control and still presented immunological control good enough to prevent opportunistic infection. This was related to virological features in a benign pattern of disease progression.

These findings contribute to better knowledge regarding pediatric AIDS, and while the treatment limitations thrust upon the described group, it should not be repeated in perinatally HIV-infected children nowadays. The follow-up of chronic conditions in adolescents is challenging³³, and HIV stigma worsens this scenario. An early rule-out of cART options makes adherence even harder^{24, 34, 35}. The health-care team attending HIV adolescents must take all of this into consideration, and turn what could be a burden into a welcoming environment where they feel safe and help them through this phase full of uncertainties.

Acknowledgments

The authors thank GlaxoSmithKline for providing tropism assay during the follow-up of some patients. The authors are also grateful to the Academic Publishing Advisory Center (*Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica, CAPA* - www.capa.ufpr.br) of the Federal University of Paraná for assistance with English language editing.

Table 1. Distribution of viral coreceptor tropism and associations with host and virological parameters

Characteristics	R5 (n=39) (%)	X4 ¹ (n=16) (%)	P value
Sex			0.77
Male	21(54)	10 (62,5)	
Median Age ² (years) (IQR)	18 (16-19)	19 (18-21)	0.02
Subtypes			0.03
B	10 (26)	8 (50)	
C	26 (67)	5 (31)	
Other	3 (8)	2 (12)	
Not identified	0	1 (6)	
Median Treatment exposure (years) (IQR)	13 (9-15)	15 (9.25 -16)	0.34
Salvage regimens ²			
No	27	11	1.00
Median CD4+ TC Nadir (cells/mm ³) (IQR)	341 (156-458)	137 (23.25-266.5)	0.03
Median last CD4+ TC ² (cells/mm ³) (IQR)	612 (448-777)	463 (220.5-761.5)	0.31
Viral Load ² median log copies/ml (IQR)	3.01(1.6-4.06)	1.66(1.6-3.36)	0.13

¹X4 – X4 tropic virus and Dual/Mix tropic, ²at the time of the genotropism test

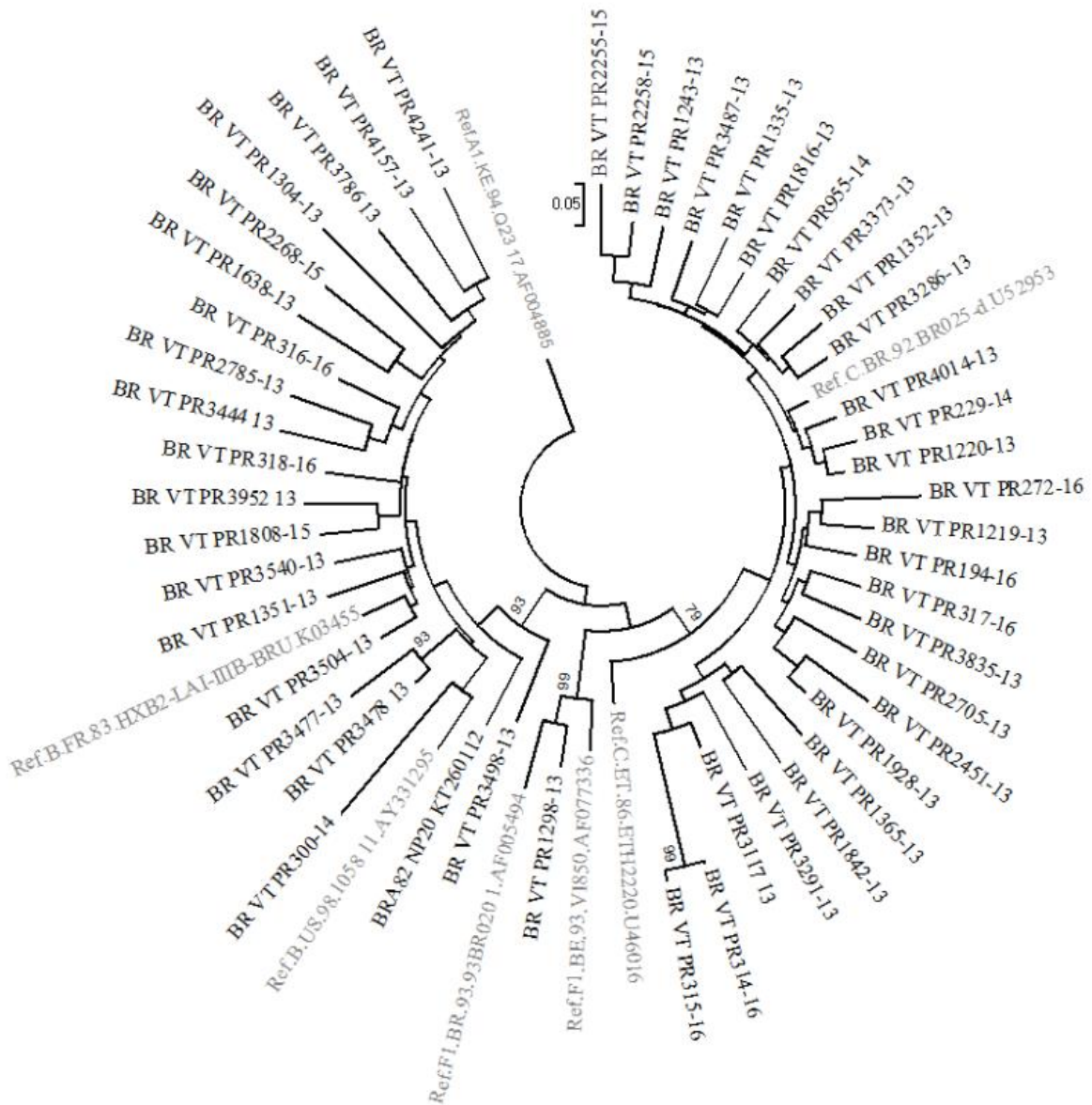
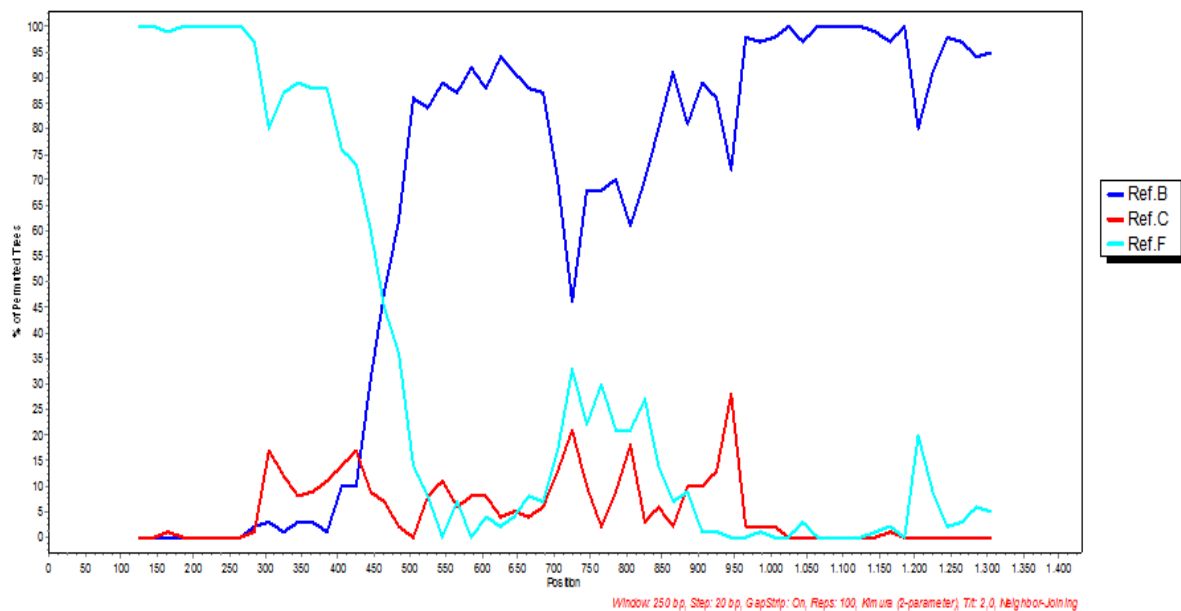


Figure Legend

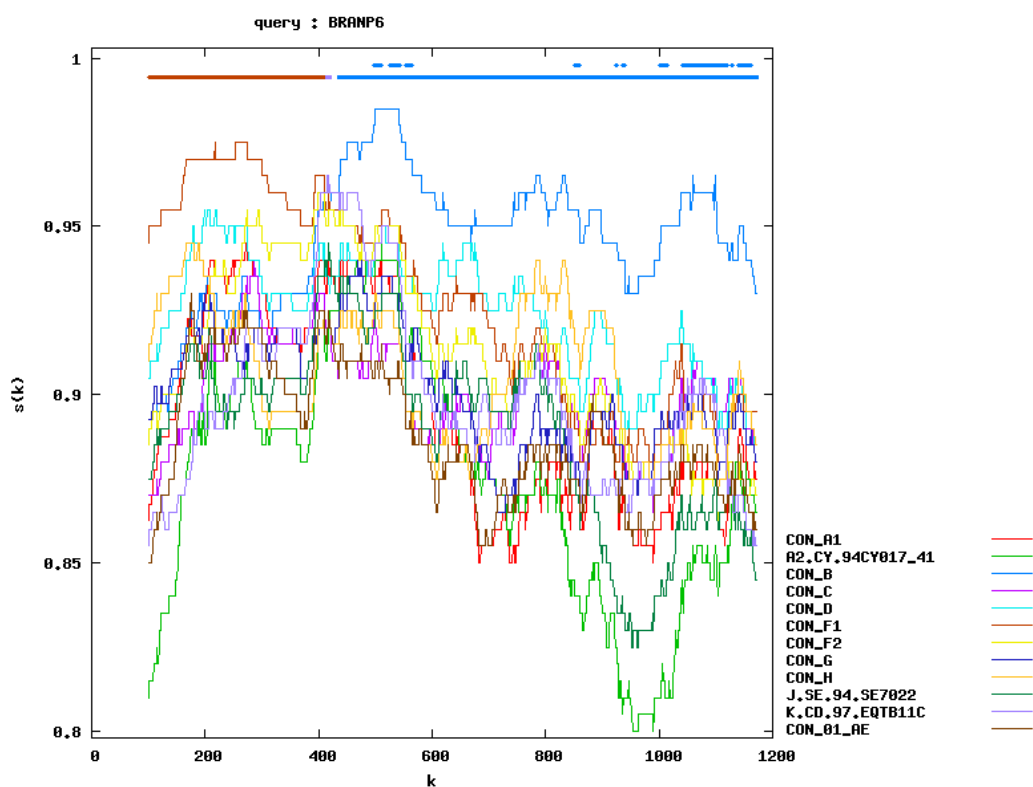
Figure 1. Maximum likelihood phylogenetic tree for the env gene from Vertical Transmission group patients. Reference sequences were obtained from the Los Alamos National Laboratory database (<http://www.hiv.lanl.gov>) and are shown in gray. Numbers at branch nodes refer to the bootstrap support (only values greater than 75% are shown). 1,000 replicates. Bar, 0.05 nucleotide substitutions per site.

APÊNDICE 4 – AVALIAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO NUCLEOTÍDICA EM AMOSTRA HIV-1 REGIÃO PR/RT

A



B



FONTE: A autora (2017)

NOTA: Perfil de recombinação de amostra do grupo LTNP recombinante BF, na região PR/RT, , por análise de *bootscanning*, obtido pelo programa *SimPlot* 3.5.1 (A) e *RIP* (B).

APÊNDICE 5 – DETERMINAÇÃO DO TROPISMO VIRAL PELA FERRAMENTA *GENO2PHENO*(coreceptor)

A

III. Aligned V3 region

Consensus B: TGT ACA AGA GGC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATA GGA GGA GGG AGA GGA TTT TAT ACA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA GAA GGA CAT TGT
 Query: C T R P N N N T R K S I H I G P G R A F Y T T G E I I G D I R Q A H C
 TGT ACA AGA GGC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATA GGA GGA GGG AGA GGA TTT TAT ACA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA GAA GGA CAT TGT

IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	The CXCR4-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) should not be administered!	2.8%	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!	4%	

The significance level was set to: 10% false positive rate

B

III. Aligned V3 region

Consensus B: TGT ACA AGA GGC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATA GGA GGA GGG AGA GGA TTT TAT ACA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA GAA GGA CAT TGT
 Query: C T R P N N N T R K S I H M G P G A A F Y A - G E I I G D I R Q A H C
 TGT ACA AGA GGC AAC AAC AAT ACA AGA AAA AGT ATA CAT ATA GGA GGA GGG AGA GGA TTT TAT ACA ACA GGA GAA ATA ATA GGA GAT ATA AGA GAA GGA CAT TGT

IV. Coreceptor prediction

Model	Prediction	FPR	Remarks
Clonal	Only the CCR5-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) could work.	83%	
Clinical	Only the CCR5-coreceptor can be used. CCR5-antagonists like Maraviroc (Celsentri/Selzentry) could work.	99.6%	

The significance level was set to: 10% false positive rate

FONTE: A autora (2017).

NOTA: Resultado de predição de tropismo pela plataforma *Geno2Pheno* (coreceptor) (Lengauer et al., 2007). A: amostra LTNP vírus tropismo com X4/R5 ou X4, B: Amostra LTNP vírus tropismo R5.

LEGENDA: FPR: taxa de falso positivo

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná - HCUFPR

PROJETO DE PESQUISA

Título: Estudo da variabilidade genética do HIV-1 em pacientes não progressor por longo tempo

Área Temática:

Pesquisador: Sonia Mara Raboni

Versão: 2

Instituição: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CAAE: 03004912.7.0000.0096

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 43652

Data da 22/06/2012

Apresentação do Projeto:

Adequado

Objetivo da Pesquisa:

Ja comentado

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ja avaliado

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Avaliado

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos estao presentes

Recomendações:

Por aprovação sem pendências.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da Pesquisa. Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É obrigatório trazer ao CEP/HC uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi aprovado, para assinatura e rubrica. Após, xerocar este TCLE em duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma para o participante da pesquisa.

CURITIBA, 26 de Junho de 2012

Assinado por:

Renato Tambara Filho

