

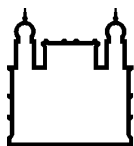
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ANÁLISE DO USO DIFERENCIAL DOS CORRECEPTORES DE  
ENTRADA PELOS SUBTIPOS B (VARIANTE PANDÊMICA E  
BRASILEIRA) E SUB-SUBTIPO F1 DO HIV-1 BASEADA NA REGIÃO  
V3 E A POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM POSIÇÕES DE PROTEÍNAS  
REGULATÓRIAS E ACESSÓRIAS

JÚLIA GUIMARÃES BARCELLOS DE ABREU

Rio de Janeiro  
Maio de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*JÚLIA GUIMARÃES BARCELLOS DE ABREU*

Análise do uso diferencial dos correceptores de entrada pelos subtipos B (variante pandêmica e brasileira) e sub-subtipo F1 DO HIV-1 baseada na região V3 e a possível associação com posições de proteínas regulatórias e acessórias

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

**Orientadora:** Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2020

Abreu, Júlia Guimarães Barcellos de.

Análise do uso diferencial dos correceptores de entrada pelos subtipos B (variante pandêmica e brasileira) e sub-subtipo F1 do HIV-1 baseada na região V3 e a possível associação com posições de proteínas regulatórias e acessórias / Júlia Guimarães Barcellos de Abreu. - Rio de Janeiro, 2020.

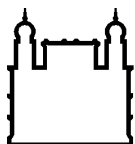
107 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Monick Lindenmeyer Guimarães.

Bibliografia: f. 68-87

1. HIV. 2. Tropismo. 3. Patogênese. 4. Diversidade. 5. Genética. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*AUTOR: JÚLIA GUIMARÃES BARCELLOS DE ABREU*

Análise do uso diferencial dos correceptores de entrada pelos subtipos B (variante pandêmica e brasileira) e sub-subtipo F1 do HIV-1 baseada na região V3 e a possível associação com posições de proteínas regulatórias e acessórias

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Natalia Motta de Araújo – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

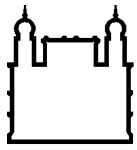
**Prof. Dr.** Tulio Machado Fumian (IOC/FIOCRUZ)

**Prof. Dr.** André Felipe Andrade Santos (UFRJ)

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Fernanda de Bruycker noqueira (IOC/FIOCRUZ) – Suplente

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Luciana Jesus da Costa (UFRJ) – Suplente

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2020



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.**

A todos os cientistas, professores e  
profissionais de saúde

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo auxílio financeiro que tornou esse trabalho possível.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e agregarem nesse momento importante.

Aos meus pais, Susie Barcellos e Renato Abreu, por terem me dado todo o apoio e estímulo para chegar até aqui, por terem perseverança de investir na minha educação e formação, dentro e fora da sala de aula. E, hoje, mais do que nunca, por serem exemplos da importância da saúde pública e do Sistema Único de Saúde, em tempos de pandemia. À minha irmã, Lívia Guimarães, por sempre torcer por mim e compreender todas as concessões que tive que fazer.

A toda minha família, que me mostrou desde cedo que o conhecimento é como uma escada e participou por tantas vezes desses degraus. Subo mais este graças a vocês. Vocês são a melhor torcida para motivação nesse trabalho, sempre ouvindo minhas lamúrias sobre os desafios e me estimulando para continuar, mesmo com as adversidades. Em especial à minha avó Jorgina, que todos os dias que me encontrava, perguntava: “E aí, qual descoberta você fez?”. Como minha alfabetizadora, você torna possível eu estar aqui, vovó.

A Bruno Figueira, por ter me apoiado e acompanhado com muita compreensão a minha trajetória de perto desde o momento da escolha da faculdade até a sua conclusão, e, agora, durante todo o período do mestrado. Ninguém acompanhou tanto a minha jornada acadêmica quanto você, sempre me ajudando em ocasiões difíceis, presente nas conquistas e me convencendo a nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada por ser parte da minha vida.

À minha orientadora Dra. Monick Lindenmeyer Guimarães pela oportunidade e confiança depositada em mim desde o início do projeto. Obrigada por todos os ensinamentos, por estar sempre à disposição, por se esforçar sempre para que tivéssemos a melhor execução possível desse trabalho, mesmo com todas as adversidades que enfrentamos. Obrigada por sempre me apoiar em minhas decisões e acrescentar na minha vida profissional e pessoal.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, que sempre estiveram dispostos a ajudar, com o que quer que fosse, e ofereceram ótimas contribuições ao trabalho, bem como exemplos enquanto pesquisadores durante esse período. Em especial à Carmem Gripp e Sylvia Teixeira, por todos os conselhos e ajudas. Ao técnico Carlos de Jesus, por toda colaboração no trabalho e no dia a dia do laboratório, com muita seriedade e competência, sempre.

Aos meus amigos do Laboratório de Aids e Imunologia Molecular, que sempre ajudam uns aos outros para melhorarmos nossos desempenhos, seja na bancada, seja na escrita. Oferecem momentos de descontração quando cabível e de seriedade quando necessário. Obrigada Diogo Gama, Karine Venegas, Nathalia Ramos e, em especial, Rayana Mendes, que dividiu comigo todos os momentos nessa jornada desde a bancada até as discussões da dissertação no ponto de ônibus.

A todo o corpo docente da Biologia Parasitária, que permitiu excelentes aulas e eventos durante todo esse processo de formação, com certeza sou uma profissional diferente depois dessa formação. A capacitação de recursos humanos feita pelo programa é, de fato, de excelência. Obrigada pela oportunidade.

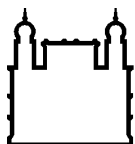
Ao Instituto Oswaldo Cruz e a Fundação Oswaldo Cruz, por todo seu histórico e contínuo papel fundamental na saúde pública do Brasil. Ainda mais em tempos de pandemia, faz-se notável o trabalho do Instituto, principalmente o Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo. Mais ainda, o trabalho intenso realizado por Biomanguinhos na produção incansável de testes diagnósticos.

A todos os profissionais da saúde que hoje se encontram envolvidos diretamente com a pandemia. Toda a rede multidisciplinar que torna o fluxo de trabalho no hospital funcional. Médicos, Enfermeiros, Biomédicos, Biólogos, Farmacêuticos, Nutricionistas, Psicólogos, Assistentes Sociais, Fisioterapeutas. Seus exemplos de força e altruísmo são essenciais. Meu objetivo, enquanto pesquisadora, é ajudar ao máximo a solucionar os problemas da ponta e da saúde no Brasil.



*Basta que os pesquisadores olhem pela janela e se deparem com a carência das comunidades que nos cercam para se certificarem do quanto nosso trabalho é importante. Sempre trabalhei com foco na doença, no doente e na carência da nossa população*

**Hermann Schatzmayr**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

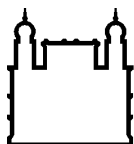
### ANÁLISE DO USO DIFERENCIAL DOS CORRECEPTORES DE ENTRADA PELOS SUBTIPOS B (VARIANTE PADÊMICA E BRASILEIRA) E SUB-SUBTIPO F1 DO HIV-1 BASEADA NA REGIÃO V3 E A POSSÍVEL ASSOCIAÇÃO COM POSIÇÕES DE PROTEÍNAS REGULATÓRIAS E ACESSÓRIAS

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Júlia Guimarães Barcellos de Abreu

Muitos estudos demonstram que diversos aspectos da infecção pelo HIV, como a progressão para doença e patogênese, podem ser afetados pela sua alta diversidade genética. No início da infecção, nota-se o uso preferencial do correceptor CCR5 para entrada do vírus na célula e, ao decorrer da progressão para aids, cerca de 40% dos vírus do subtipo B do HIV-1 fazem a troca para uso do correceptor CXCR4. Já foi demonstrado que esse uso pode variar de acordo com o subtipo viral. Contudo, há poucos estudos avaliando a relação dos subtipos/variantes prevalentes no Brasil com tropismo. Ensaio genotípicos de predição de tropismo são baseados na sequência da alça V3 da glicoproteína 120 (*gp* 120) do envelope viral, que é o sítio de ligação com o receptor da célula hospedeira. Além disso, estudos recentes sugeriram que variação na conservação de amino ácidos de algumas posições em outros genes poderiam estar associadas ao tropismo viral. Assim, no presente estudo, visamos avaliar um conjunto de indivíduos HIV-1 cronicamente infectados dos subtipos B, variantes pandêmica ( $B_{PAN}$ ) e brasileira ( $B_{BR}$ ), e F1 para determinar a influência do subtipo/variante e de substituições de aminoácidos em outras proteínas virais com o tropismo pelos correceptores CCR5 e CXCR4. Para isso, realizamos um estudo transversal, analisando a região C2V3 da *gp*120, com amostras de 159 pacientes em falha terapêutica, previamente genotipadas de acordo com a região da polimerase viral como F1 ( $n=35$ ) ou B ( $n=124$ ). Em um total de 124 amostras foi possível realizar as etapas de amplificação e sequenciamento do genoma viral com sucesso. Baseada na análise filogenética, confirmamos que 76 (61,3%) pacientes estavam infectados por cepas  $B_{pol}/B_{env}$ , 17 (13,7%)  $B_{pol}/B_{BR}env$ , 25 (20,2%)  $F1_{pol}/F1_{env}$ , 3 (2,4%)  $F1_{pol}/B_{env}$  e 3 (2,4%)  $B_{pol}/F1_{env}$ . A predição do tropismo foi obtida utilizando a plataforma Geno2Pheno. Foram classificadas 43,04% das sequências  $B_{PAN}$  como não-R5 trópicas, corroborando dados da literatura, enquanto porcentagens menores foram observadas para as sequências  $B_{BR}$  (29,42%) e F1 (14,28%), sendo a frequência menor neste grupo estatisticamente significativa quando comparada ao grupo  $B_{PAN}$  não-R5 ( $p= 0.0062$ ). A fim de verificar abundância em posições de aminoácidos na região Vif-Rev associadas com tropismo, foi analisado um subconjunto de amostras de cada um dos subtipos/variantes com tropismo R5 ou não-R5, juntamente com sequências brasileiras obtidas da base de dados de HIV de Los Alamos. Algumas posições nas proteínas analisadas apresentaram subtipo-especificidade, sendo algumas dessas em sítios relevantes para a atividade da proteína. As análises corroboraram maior conservação em posições previamente descritas como relacionadas ao tropismo em Tat e Vpr, no entanto, nenhuma apresentou assinaturas típicas correlacionadas com a troca do correceptor em todos os subtipos estudados. No entanto, para a proteína Vif, a posição 45 apresentou troca do aminoácido ácido glutâmico em R5 para tirosina em não-R5 na variante  $B_{BR}$ , levando a sugestão de possível impacto na atividade de inibição da APOBEC. E para a proteína Vpu, vimos correlação nas posições 6 (tirosina R5 para isoleucina não-R5 em  $B_{BR}$ ) e 35, que apresentou troca de aminoácido arginina R5 para serina não-R5 no subsubtipo F1, posição relevante na zona de ligação com o CD4. Portanto, nossos achados corroboram que as estratégias evolutivas para o uso do correceptor podem variar de acordo com o subtipo viral, e que outras regiões genômicas virais podem estar associadas a esse processo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ANALYSIS OF DIFFERENTIAL ENTRY CORECEPTOR USE BY HIV-1 SUBTYPE B (PANDEMIC AND BRAZILIAN VARIANTS) AND SUB-SUBTYPE F1 BASED ON THE V3 REGION AND POSSIBLE ASSOCIATION WITH POSITIONS IN REGULATORY AND ACCESSORY PROTEINS

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Júlia Guimarães Barcellos de Abreu

Many studies have shown that various aspects of HIV infection, such as disease progression and pathogenesis, can be affected by its high genetic diversity. At early stages of infection, it's noticed that the virus preferably uses coreceptor CCR5 to enter the host cell, and through the progression to AIDS, around 40% of HIV-1 subtype B viruses switch to using coreceptor CXCR4. It has been previously demonstrated that different use of coreceptors may vary according to the viral subtype. Yet, there are still few studies evaluating this link between the subtypes/variants prevalent in Brazil and their differential coreceptor use. Genotypic assays for tropism prediction are based on the sequence of the V3 loop of the viral envelope glycoprotein 120 (*gp120*), which is the binding site with the host cell coreceptor. Moreover, recent studies have suggested that variations in amino acid conservation of some positions in other genes could also be associated with viral tropism. Thus, in this work, we aimed to analyse a set of HIV-1 chronically infected individuals from subtype B, pandemic and Brazilian ( $B_{BR}$ ) variants, and F1 to determine the influence of the subtype/variant on the CCR5 or CXCR4 tropism, as well as, to analyse the impact of amino acid substitutions in other viral proteins on that tropism. We performed a transversal study including 159 patients facing treatment failure, previously genotyped according to the polymerase region as F1 ( $n=35$ ) or B ( $n=124$ ). A total of 124 samples were successfully amplified and sequenced. Based on the phylogenetic envelope analysis, we confirmed that 76 (61,3%) of those were *B<sub>pol</sub>/B<sub>env</sub>*, 17 (13,7%) were *B<sub>pol</sub>/B<sub>BR</sub>env*, 25 were *F1<sub>pol</sub>/F1<sub>env</sub>*, 3 were *F1<sub>pol</sub>/B<sub>env</sub>* and 3 were *B<sub>pol</sub>/F1<sub>env</sub>*. Coreceptor tropism prediction was obtained using the platform Geno2Pheno. 43,04% of  $B_{PAN}$  sequences were classified as non-R5 tropic, in accordance with previous studies, whilst lower percentages were found in  $B_{BR}$  (29,42%) and of F1 (14,28%) sequences ( $p= 0.0204$ ). When compared to the  $B_{PAN}$  percentage of non-R5 tropism, the results for  $B_{BR}$  were not statistically divergent ( $p= 0.4161$ ), whereas the results for F1 were highly significant ( $p= 0.0062$ ). In order to search for amino acid abundance associated with tropism in the Vif-Rev region, we analysed a subgroup of samples from each of the subtypes/variants according to the R5 or non-R5 tropism, along with Brazilian sequences obtained from Los Alamos HIV database. Some positions of the analysed proteins presented subtype-specificity, some of those in relevant sites for protein activity. Analysis corroborated highest conservation in positions previously described as tropism related in Tat and Vpr, however, none of them presented typical signatures correlated with coreceptor switch for all the studied subtypes. On the other hand, for the Vif protein, position 45 presented amino acid substitution, from glutamic acid in R5 to tyrosine in non-R5 for the  $B_{BR}$  variant, suggesting possible impact on APOBEC inhibition activity. For protein Vpu, we found correlation with tropism for positions 6 (tyrosine in R5 to isoleucine in non-R5 for  $B_{BR}$ ) and 35, which presented substitution of amino acid arginine in R5 to serine in non-R5 for subsubtype F1, relevant position of the binding region to CD4. Thus, our findings conclude that evolutive strategies of coreceptor use could vary according to the viral subtype and that other viral genomic regions could be associated to this process.

# ÍNDICE

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. A epidemiologia do HIV/aids .....	1
1.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).....	3
1.3. O genoma do HIV .....	4
1.4. Ciclo de replicação do HIV .....	10
1.5. Origem e diversidade genética do HIV .....	12
1.6. Epidemiologia molecular do HIV-1 .....	15
1.6.1 No mundo.....	15
1.6.2. No Brasil.....	17
1.7. A história natural da infecção pelo HIV-1.....	19
1.8. Terapia antirretroviral (TARV) .....	21
1.9. Caracterização biológica do HIV-1: tropismo e regiões associadas	22
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
2.1 Objetivo geral .....	28
2.2 Objetivos específicos: .....	28
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
3.1. Casuística .....	29
3.2. Extração de DNA .....	29
3.3. Amplificação por <i>nested</i> PCR das regiões estudadas .....	30
3.3.1. Amplificação por <i>nested</i> PCR da região C2V3 da gp120 do envelope viral.....	30
3.3.2. Amplificação por <i>nested</i> PCR da região Vif-Rev .....	30
3.4. Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR .....	32

3.5. Análise, edição das sequências e determinação dos subtipos virais .....	33
3.6. Predição genotípica dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4..	33
3.7. Análise das regiões Vpr e Tat .....	34
4. RESULTADOS .....	36
4.1. Subtipagem das amostras com base na região C2V3 do envelope viral.....	36
4.2. Análise do genotropismo de acordo com o subtipo/variante viral .....	41
4.3. Avaliação de assinaturas tropismo-específicas de Vif a Rev	42
5. DISCUSSÃO .....	59
6. CONCLUSÃO .....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa global do número de pessoas vivendo com HIV no ano de 2018. ....	2
Figura 2. Representação esquemática do vírion maduro do HIV-1.....	4
Figura 3. Representação esquemática do genoma do HIV-1 relativo ao HXB2 (número de acesso K03455) .....	5
Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária da gp120. ....	7
Figura 5. Ciclo de replicação do HIV-1 .....	12
Figura 6. Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e das formas recombinantes circulantes com base em amostras coletadas entre 2010 e 2015.....	16
Figura 7. Distribuição dos subtipos e CRFs predominantes do HIV-1 por região geográfica no Brasil.....	18
Figura 8. História natural da infecção pelo HIV-1 .....	20
Figura 9. Proposta da distribuição das populações R5 e X4 trópicas ao longo da progressão da aids baseado no subtipo B .....	23
Figura 10. Logos demonstrativos da região Vpr do HIV-1 baseada no subtipo B do HIV-1 .....	25
Figura 11. Posições em Tat estatisticamente divergentes entre X4 e R5 do HIV-1 subtipo B .....	26
Figura 12. Regiões estudadas no genoma do HIV-1.....	31
Figura 13. Esquema representativo da estratégia de diluição limite .....	35
Figura 14. Análise filogenética preliminar da região C2V3 do envelope viral (~564bp, posição 6817-7381 relativa ao HXB2) das sequências de HIV-1 .....	37
Figura 15. Análise de Bootscan para detecção de possível evento de recombinação na região C2V3 do envelope viral do HIV-1 de sequências que se agruparam em ramo a parte na árvore filogenética.....	39
Figura 16. Análise filogenética da região do envelope viral (~564bp, posição 6817-7381 relativa ao HXB2) das amostras de HIV-1.....	40
Figura 17. Análise do genotropismo das amostras de acordo com o subtipo/variante .....	41
Figura 18. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Rev entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.....	44

Figura 19. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Tat entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.....	47
Figura 20. Comparação da abundância dos aminoácidos nas posições 7 e 23 da proteína Tat de acordo com o subtipo/variante .....	49
Figura 21. Comparação da abundância dos aminoácidos nas posições 57 e 60 da proteína Tat de acordo com o subtipo/variante .....	50
Figura 22. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Vif entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.....	51
Figura 23. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Vpr entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.....	54
Figura 24. Comparação da abundância em logo dos aminoácidos nas posições 36, 37, 41, 89 e 96 da proteína Vpr de acordo com o subtipo/variante.....	56
Figura 25. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Vpu entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.....	57

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de sequenciamento.....	32
Tabela 2. Amostras amplificadas e sequenciadas na região C2V3 de acordo com o subtipo da região <i>pol</i> .....	36
Tabela 3. Amostras amplificadas e sequenciadas na região Vif-Rev de acordo com o grupo. ....	42
Tabela 4. Abundância dos aminoácidos por posições investigadas da proteína Rev.....	45
Tabela 5. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Tat.....	47
Tabela 6. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Vif.....	52
Tabela 7. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Vpr.....	55
Tabela 8. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Vpu.....	57
Tabela 9. Posições associadas ao tropismo por proteína em cada grupo estudado .....	59



## LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celcius
µL	Microlitro
A	Alanina
aids	Acquired Immunodeficiency Syndrome/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (sida)
APOBEC	Enzima editora de mRNA Apolipoproteína B
B <sub>BR</sub>	Variante do subtipo B com motivo GWGR no topo da alça V3 da gp120
B <sub>PAN</sub>	Variante pandêmica do subtipo B
BST-2	Molécula de ancoragem (Bone Marrow Stromal Antigen 2)
C	Cisteína
CA	Capsídeo viral
CCR5	CC-chemokine receptor 5/ Receptor de alfa-quimiocina tipo 5
CD4	Cluster of differentiation 4/ Cluster de Diferenciação 4
CD8	Cluster of differentiation 8/ Cluster de Diferenciação 8
cDNA	DNA complementar
CRF	Circulant Recombinant Form/ Forma RecombinanteCirculante
CXCR4	CXC-chemokine receptor 4/Receptor de beta-quimiocina tipo 4
D	Aspartato (ácido aspártico)
DEPC	Diethyl pyrocarbonate/ Dietil-pirocarbonato
DNA	Deoxyribonucleic acid/ Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfatado
E	Glutamato (ácido glutâmico)
ECL2	Second extracellular loop/ segunda alça extracelular dos correceptores
<i>env</i>	Gene que codifica a proteína do envelope do HIV
F	Fenilalanina
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Glicina

G2	Fase do ciclo celular entre a duplicação do DNA e o início da divisão celular
<i>gag</i>	Gene do grupo antígeno específico do HIV, que codifica as proteínas estruturais do Capsídeo, Nucleocapsídeo e Matriz
GALT	Tecido Linfóide Associado Ao Intestino
gp41	Glicoproteína 41 (41kD)
gp120	Glicoproteína 120 (120kD)
gp160	Glicoproteína 160 (160kD)
H	Histidina
HIV	Human Immunodeficiency Virus/ Vírus da Imunodeficiência Humana
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HIV-2	Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 2
HXB2	Sequência de referência do subtipo B do HIV-1
I	Isoleucina
IN	Integrase
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
K	Lisina
kb	Quilobase
kD	Quilodalton
L	Leucina
LTR	Long Terminal Repeats / Repetições terminais longas
M	Metionina
MA	Matriz Viral
MHC-I	Major histocompatibility complex / Complexo principal de Histocompatibilidade de Classe I
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
N	Asparagina
<i>nef</i>	Gene que codifica a proteína Nef
nm	Nanômetro

OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Prolina
p7	Proteína 7/proteína do Núcleocapsídeo
p6	Proteína 6
p17	Proteína 17/proteína da Matriz
p24	Proteína 24/ proteína do Capsídeo
PCR	Polymerase Chain Reaction/ Reação em Cadeia da Polimerase
PIC	Complexo de Pré-Integração
pmol	Picomol
PNGs	Protein N-glycosylation /sítios de N-glicosilação de proteína
<i>pol</i>	Gene que codifica as enzimas virais Transcriptase Reversa, Protease e Integrase
PR	Protease
PVHIV	Pessoas Vivendo com HIV
Q	Glutamina (glutamida)
R	Arginina
R5	Vírus com tropismo pelo correceptor CCR5
R5X4	Vírus duo-trópico
<i>rev</i>	Gene que codifica a proteína Rev
<i>rev1</i>	Primeiro exon do gene <i>rev</i>
<i>rev2</i>	Segundo exon do gene <i>rev</i>
RNA	Ribonucleic Acid/ Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNA <sub>pol</sub> II	Enzima RNA polimerase 2
RNAse H	Enzima que catalisa clivagem do RNA por hidrosilação
RRE	Rev Responsinve Element / Elemento Responsivo De Rev
RT	Transcriptase reversa
S	Serina
s	Segundos
SIV	Simian Immunodeficiency Virus/ Vírus da Imunodeficiência Símia
SIVcpz	SIV que infecta chinpanzés ( <i>Pan troglodytes troglodytes</i> )

SIVgor	SIV que infecta gorilas ( <i>Gorilla gorilla</i> )
ssRNART(+)	Duas fitas simples de RNA com polaridade positiva e DNA intermediário
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Treonina
TAR	Trans-Activation Response Element/ Elemento De Resposta Transativadora
TARV	Terapia antirretroviral
<i>tat</i>	Gene que codifica a proteína Tat do HIV
<i>tat1</i>	Primeiro exon do gene <i>tat</i>
<i>tat2</i>	Segundo exon do gene <i>tat</i>
TBE	Tampão composto por Tris, ácido bórico e EDTA
T CD4 <sup>+</sup>	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>
T CD8 <sup>+</sup>	Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>
UNAIDS	Jointed United Nations Programme on HIV/AIDS / Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
URF	Formas recombinantes únicas
V	Valina
<i>vif</i>	Gene que codifica a proteína Vif do HIV
<i>vpr</i>	Gene que codifica a proteína Vpr do HIV
<i>vpu</i>	Gene que codifica a proteína Vpu do HIV-1
<i>vpx</i>	Gene que codifica a proteína Vpx do HIV-2
W	Triptofano
X4	Vírus com tropismo pelo correceptor CXCR4
Y	Tirosina

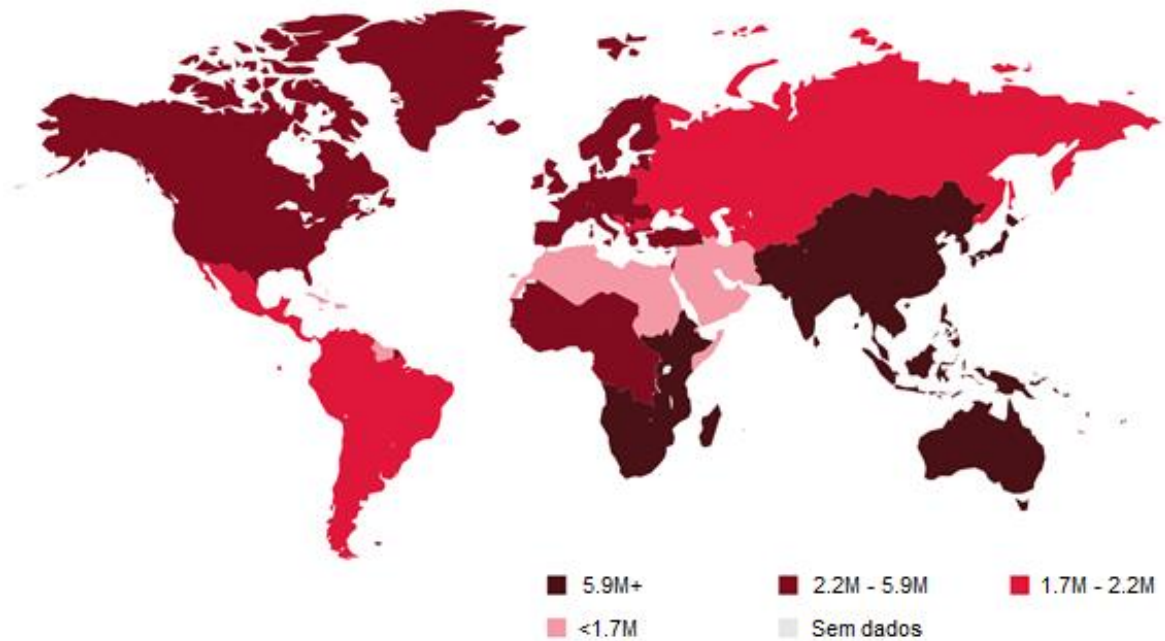
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. A epidemiologia do HIV/aids

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids) (Coffin et al., 1986). A aids é um importante agravo de saúde pública e socioeconômico mundial, acometendo principalmente países em desenvolvimento (UNAIDS, 2019).

No ano de 2018, segundo relatórios do Programa das Nações Unidas para HIV/aids (UNAIDS), foi estimado que 37,9 milhões de pessoas estavam infectadas pelo HIV no mundo, com 1,7 milhão de novas infecções. Desde o início da epidemia, 74,9 milhões de pessoas foram infectadas pelo HIV e 32 milhões de pessoas morreram de doenças relacionadas à aids. Em 2018, ocorreram cerca de 770 mil óbitos em todo o mundo, em comparação com 1,7 milhão em 2004 e 1,2 milhão em 2010, representando diminuição da mortalidade relacionada à aids em 33% desde 2010. Os números de novas infecções apresentaram diminuição de 40% desde o pico alcançado em 1997 e de 16% desde 2010. Graças ao sucesso da terapia antirretroviral (TARV), que promoveu o aumento na expectativa de vida devido à redução da morbidade e mortalidade, o número de indivíduos vivendo com HIV aumentou. Até junho de 2019, cerca de 24,5 milhões de pessoas vivendo com HIV tinham acesso à TARV (UNAIDS, 2019).

A África sub-saariana é a região que apresenta o maior número de casos da epidemia (figura 1). O número de pessoas vivendo com HIV foi de 20 milhões, com cerca de 800 mil casos novos e 310 mil mortes relacionados à aids no ano de 2018. O número de casos novos diminuiu em 28% e o número de óbitos diminuiu em 44% com relação ao ano de 2010, no entanto, a região ainda apresenta mais de 50% do número de casos globais (UNAIDS, 2019).



**Figura 1. Estimativa global do número de pessoas vivendo com HIV no ano de 2018.** (adaptado de UNAIDS, 2019. Disponível em: [www.aidsinfo.unaids.org](http://www.aidsinfo.unaids.org))

Na América Latina, 1,9 milhão de pessoas viviam com HIV em 2018 (figura 1). Dessas, 100 mil foram casos novos. Isso representou um aumento de 7% da incidência quando comparado ao ano de 2010, sendo que os maiores aumentos ocorreram no Brasil (21%), Costa Rica (21%), Bolívia (22%) e Chile (34%). Enquanto declínios foram observados em El Salvador (48%), Nicarágua (29%) e Colômbia (22%). Em 2018, 35 mil pessoas morreram por causas relacionadas à aids, o que mostra uma diminuição de 14% com relação a 2010 (UNAIDS, 2019).

O Brasil concentra mais de 1/3 do número de pessoas vivendo com HIV na América Latina. No período de 1980 a junho de 2019, um total de 966.058 casos de aids foram detectados no país. Em 2018, foram notificados 43.941 novos casos de HIV e 37.161 casos de aids, com uma taxa de detecção de 17,8/100.000 habitantes. Desde o ano de 2012, foi possível observar uma diminuição na taxa de detecção de aids no Brasil, representando decréscimo de 16,8%. Ainda no ano de 2018, foram registrados 10.980 óbitos relacionados à aids, um decréscimo de 22,8% entre 2014 e 2018. Essa diminuição na detecção de casos de aids e óbitos relacionados ao agravo tem sido mais acentuada desde dezembro de 2013 quando o programa do Sistema Único de Saúde

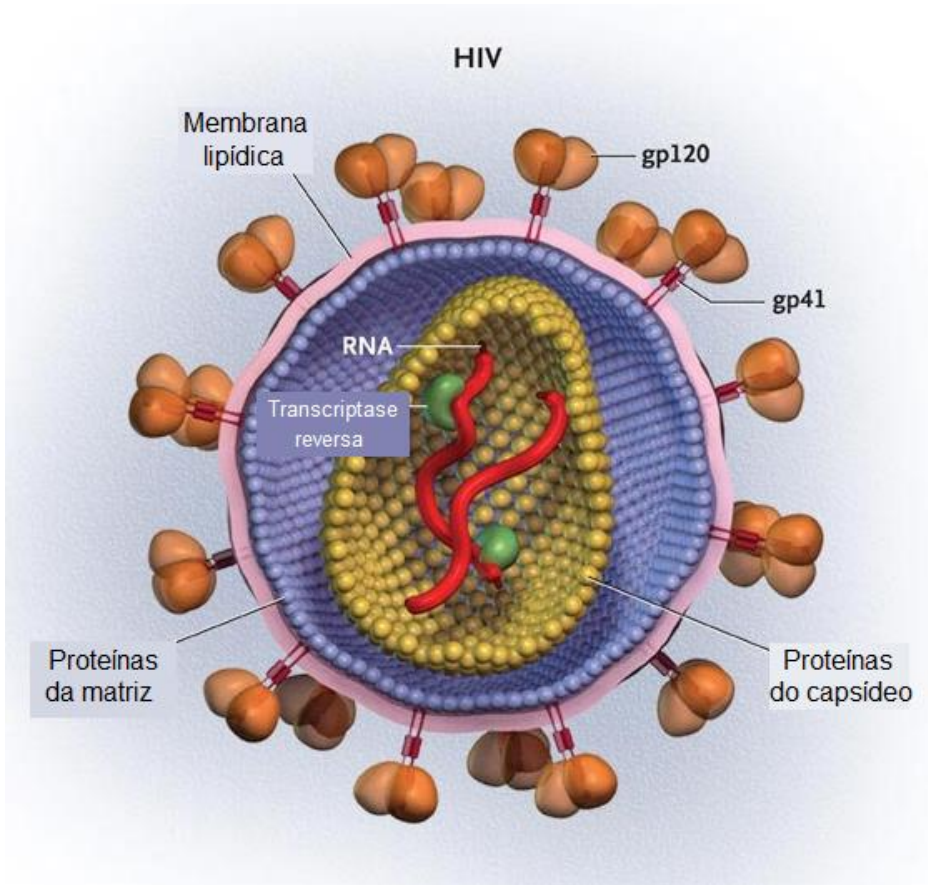
(SUS), passou a garantir o tratamento para todas as pessoas vivendo com HIV (PVHIV), independentemente da carga viral (Boletim Epidemiológico, 2019). A detecção dos casos de HIV e aids não é homogênea entre as regiões do Brasil. No ano de 2018, dos 43.941 casos de infecção pelo HIV, 5.084 (11,6%) foram na região Norte, 10.808 (24,6%) na região Nordeste, 16.586 (37,7%) na região Sudeste, 7.838 (17,8%) na região Sul e 3.625 (8,2%) na região Centro-Oeste. Em 2018 o número de casos de aids por 100.000 habitantes foi de 16 na região Sudeste, 22,8 na região Sul, 17,3 na região Centro-Oeste. As regiões Norte e Nordeste apresentaram tendência de crescimento: em 2018 foram de 25,1 (Norte) e 15,8 (Nordeste), representando aumentos de 21,8% e 17%, respectivamente quando comparados a 2008 (Boletim Epidemiológico, 2019)

## **1.2. O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)**

O HIV é um retrovírus citopático não-oncogênico, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Lentivirus*. A família *Retroviridae* caracteriza-se por possuir a enzima transcriptase reversa, capaz de retrotranscrever o RNA viral para uma cópia de DNA, que então pode se integrar ao genoma do hospedeiro. O gênero *Lentivirus* é associado a infecções crônicas e persistentes no hospedeiro, sendo encontrado em várias espécies de mamíferos (Coffin et al., 1986; Luciw, 1996; Sharp & Hahn, 2011). O HIV é classificado em dois tipos, HIV-1 e HIV-2, sendo o HIV-1 responsável pela pandemia de aids.

A partícula viral madura do HIV é esférica e envelopada, apresentando 110 nm de diâmetro e simetria icosaédrica. A estrutura mais externa do vírus corresponde ao envelope, o qual se origina da bicamada lipídica da célula hospedeira no processo de brotamento dos vírions (figura 2). No envelope viral encontram-se a glicoproteína de superfície gp120 e a glicoproteína transmembranar gp41, que são codificadas pelo gene envelope (*env*) e representam importante função nas etapas de adsorção, fusão e entrada do vírus na célula hospedeira (figura 2) (Nakai & Goto 1996). Internamente ao envelope, encontra-se a matriz viral (MA), constituída da proteína p17, codificada pelo grupo antígeno específico, gene *gag*. Essa proteína é essencial na integridade

do vírion e tem participação importante na sua maturação, incorporando ao mesmo as glicoproteínas do envelope (figura 2) (Luciw, 1996). O capsídeo viral (CA) apresenta estrutura cônica e é constituído pela proteína p24 (Marx et al., 1988). Em seu interior, encontram-se o nucleocapsídeo, as enzimas virais (protease, transcriptase reversa e integrase) e as proteínas acessórias, que estão intimamente ligadas a duas fitas de RNA (figura 2) (Luciw, 1996).



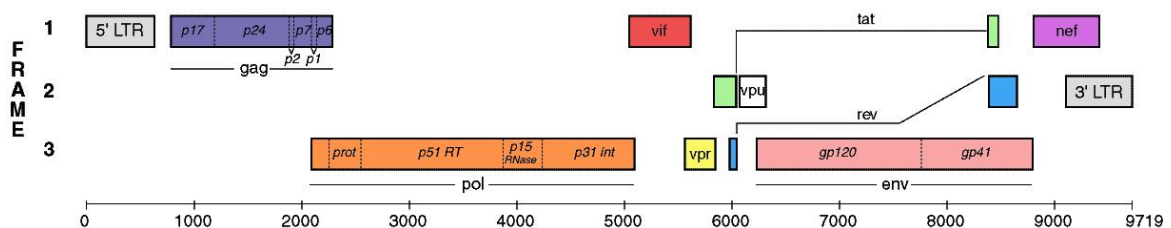
**Figura 2. Representação esquemática do vírion maduro do HIV-1.** (traduzido de Johnston & Fauci, 2008)

### 1.3. O genoma do HIV

Como os demais retrovírus, o HIV possui duas fitas simples de RNA com polaridade positiva, que são retrotranscritos em DNA complementar, o qual se integra no DNA do hospedeiro, ou *ssRNA-RT(+)*. Cada fita de RNA do HIV contém aproximadamente 9,7 kilobases (kb) de tamanho, com fases de leitura aberta que codificam as proteínas virais (Feinberg et al. 1986; Goto, et al, 1998)



O genoma do HIV é composto por nove genes: *gag* e *env* (que codificam proteínas estruturais), *pol* (codifica as enzimas virais necessárias à replicação, comuns a todos os membros da família *Retroviridae*), *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef* (genes acessórios do HIV-1) (figura 3). Quando tratado do HIV-2 os genes acessórios são *vif*, *vpr*, *vpx* e *nef*. Nas extremidades 5' e 3' do genoma proviral do HIV são encontradas repetições terminais longas ou *Long Terminal Repeats* (LTR), onde localizam-se as principais sequências promotoras para a transcrição dos genes virais. Apesar dessas regiões não codificarem proteínas, elas exercem funções importantes como a participação na retrotranscrição, promovendo a interação do RNA molde com o cDNA, e na integração ao genoma da célula hospedeira. A transcrição do genoma do HIV pode ocorrer em três fases de leitura distintas, podendo haver, assim, genes interpostos e/ou alternados, dentro dos mesmos 9,7 kb, diferente da maioria de outros vírus que apresentam uma leitura única contínua de seu genoma (figura 3) (Cherrington & Ganem, 1992; Engelman & Cherepanov, 2012; Freed, 2001).



**Figura 3. Representação esquemática do genoma do HIV-1 relativo ao HXB2 (número de acesso K03455).** (adaptado de Los Alamos National Laboratory, 1998; baseado em Korber et al., 1998)

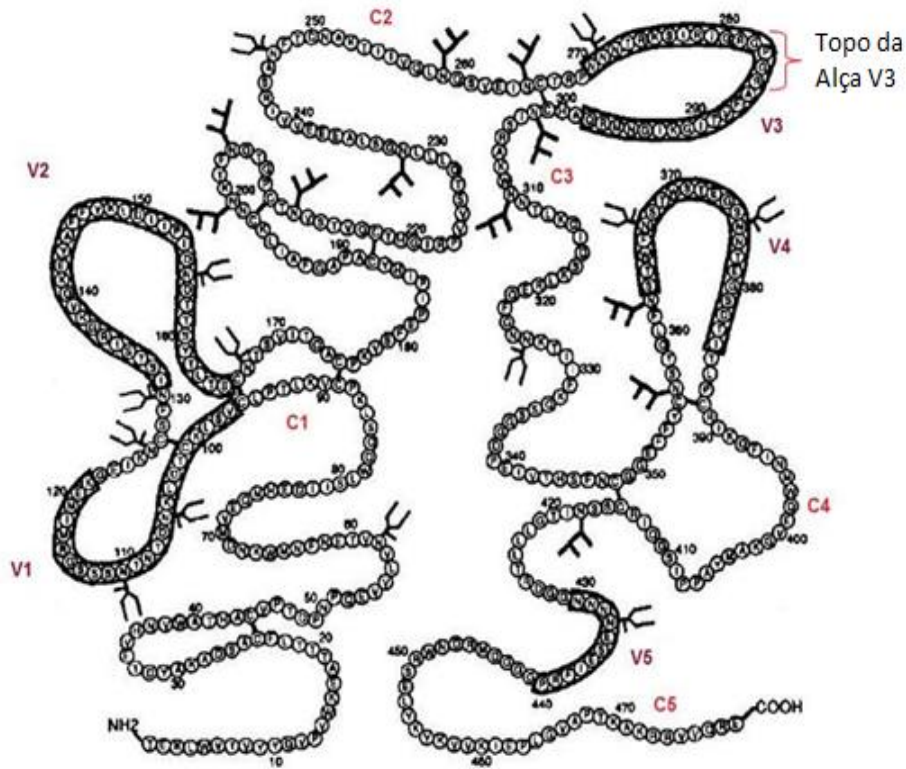
O gene *gag* (grupo antígeno específico) é o primeiro gene do quadro de leitura, localizado na terminação 5' do genoma do HIV. O gene codifica uma poliproteína precursora de 55 kD, denominada p55. A enzima protease cliva essa poliproteína em quatro proteínas estruturais: p17 (matriz), p24 (capsídeo), p7 (nucleocapsídeo) e p6 (revisado por Freed, 2001). Essas proteínas tem como principais funções a proteção do material genético viral e das enzimas necessárias à replicação, formação da estrutura funcional do vírus para empacotamento do RNA viral, direcionamento das partículas nascentes para a superfície da célula hospedeira e estimulação da liberação de novas partículas virais (Göttlinger, 2001)

O gene *pol* é transcrito em RNA mensageiro (RNAm) bicistrônico, ou seja, RNAm que codifica duas proteínas, sendo, portanto, transcrito juntamente com *gag*. No entanto, esse RNAm apresenta apenas um códon de iniciação, referente à *gag*, assim, *pol* é traduzida fusionada a *gag*, formando um precursor *gag-pol*. A protease, oriunda do gene *pol*, cliva-o separando os polipeptídeos *gag* e *pol*, sendo então uma enzima indispensável na produção da partícula madura. Essa poliproteína precursora (p160 *gag/pol*) quando clivada pela protease gera as enzimas virais: protease (PR - p10), envolvida nos processos de clivagem e maturação; transcriptase reversa (RT - p66/p51), envolvida na retrotranscrição; e integrase (IN - p31), envolvida na integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro (revisto por Freed, 2001) .

O gene *env* (envelope) codifica uma poliproteína precursora denominada *gp160*, traduzida no retículo endoplasmático da célula hospedeira. Após isso, é encaminhada para o Complexo de Golgi onde é glicosilada e clivada por proteases celulares em duas glicoproteínas: a glicoproteína de superfície 120 (*gp120*) e a glicoproteína transmembranar 41 (*gp41*). Tais glicoproteínas são cruciais nas etapas de adsorção e fusão do vírus à célula hospedeira, respectivamente (Goto et al., 1994, 1998) .

A *gp120* é composta por cinco regiões constantes (C1 a C5), e cinco regiões variáveis (V1 a V5) (figura 4). Os domínios V1 e V2 são ligados através de pontes dissulfeto, formando a alça V1/V2. Os demais domínios variáveis, V3, V4 e V5, formam alças independentes (Cicala et al., 2010; Yolitz et al., 2018). A *gp120* interage com alta afinidade com o receptor CD4 da célula hospedeira, o que leva a alterações conformacionais desta glicoproteína, expondo a alça V3, a qual irá interagir com a segunda alça extracelular, ou *extracellular loop 2* (ECL2) do correceptor (Sterjovski et al., 2011; Tyssen et al., 2010). Os correceptores são receptores de quimiocina, preferencialmente o CCR5 e/ou CXCR4. Sendo esta interação com o receptor e o correceptor essenciais para entrada do vírus na célula hospedeira. A região V3 é constituída por 35 aminoácidos, que são os principais associados à especificidade do correceptor de uso (De Jong et al., 1992; Morris et al., 1994) e variações genéticas nesta região já foram relacionadas com o uso diferencial de correceptores pelos vírus, tal como a presença de aminoácidos básicos arginina (R) e lisina (K) nas posições 11 e/ou 25 que tem sido associada com o uso do correceptor CXCR4

(Fouchier et al., 1992; De Jong et al., 1992). Algumas características da gp120 do HIV-1 foram correlacionadas com o tempo de progressão para a aids, como o comprimento das regiões variáveis, a diversidade total de aminoácidos e o número de sítios de glicosilação (PNGs) (Derdeyn et al., 2004; Rong et al., 2007; Archary et al., 2010). As interações da gp120 com receptor e correceptor promovem mudanças conformacionais na glicoproteína transmembranar gp41, responsável também por ancorar o complexo gp120/gp41 na membrana, levando à exposição do domínio catalizador da fusão entre a bicamada lipídica do envelope viral e da célula hospedeira, assim promovendo a entrada do vírus na célula (Chan et al., 1997; Caffrey et al., 1998).



**Figura 4. Representação esquemática da estrutura secundária da gp120.** Em vermelho, as demarcações das porções variáveis (V1-V5) e constantes (C1-C5). Em destaque, o topo da alça V3 onde se encontra a substituição da prolina pelo triptofano, que distingue a variante B" do subtipo B comum (adaptado de Leonard et al., 1990)

O gene *tat* (proteína transativadora de transcrição) é um dos fatores regulatórios essenciais para a expressão genética do HIV. O gene se localiza em duas regiões, com o exon maior *tat-1*, em torno de 72 aminoácidos, e o exon menor *tat-2*, em torno de 86 aminoácidos. Ocorre, então, um processo de *splicing* alternativo do RNA, do qual obtém-se o RNA mensageiro final com as duas

sequências de exons, que serão traduzidos na proteína final Tat. Assim que esta é transportada para o núcleo, ela se liga ao elemento TAR RNA, o qual apresenta uma estrutura de grampo e forma uma protuberância necessária para ligação e ação da Tat. Assim, a Tat age ativando a iniciação da transcrição e alongamento do promotor LTR, evitando que o sinal de poliadenilação 5' LTR AATAAA cause a terminação prematura da transcrição. Além disso, ela promove a fosforilação da RNAPol II do hospedeiro, aumentando os níveis de transcritos virais no interior da célula (revisto por Freed et al., 2001). Tat extracelular pode ser encontrada e até absorvida por células em cultura, que poderia levar a ativações em outras células infectadas (Ensoli et al., 1993). Alterações na conformação da Tat levam a diferentes impactos na otimização da transcrição (Das et al., 2011) A Tat tem sido grande alvo de estudos nos últimos anos, desde que estratégias à nível transcricional começaram a ser exploradas como perspectiva de cura (Deeks, 2012; Kim et al., 2018; Méndez et al., 2018; Mousseau & Valente, 2012). Todos os esforços nesse contexto ainda estão em fase de estudos *in vitro* e em animais, desse modo, a ampliação de conhecimentos sobre a Tat e o mecanismo de transcrição do HIV-1 é altamente relevante para aperfeiçoar essas intervenções (Rice, 2017).

O gene *rev* codifica um fator de exportação nuclear, a proteína Rev. Essa proteína é originada após *splicing* alternativo entre os exons *rev-1* (menor) e *rev-2* (maior) e *nef*, que forma o segundo RNAm bicistrônico do HIV, de onde serão traduzidas as proteínas finais Rev e Nef. As sequências de RNAm dos dois genes possuem códons de iniciação e terminação, dispensando processos de clivagens subsequentes, diferentemente do gene *pol*. A proteína Rev age se ligando ao RRE, elemento responsivo de Rev, o qual é codificado pela região env do HIV-1, e promove a estabilização e exportação dos transcritos virais sem *splicing* e contendo RRE do núcleo para o citoplasma da célula, permitindo assim a tradução e expressão das proteínas estruturais (revisto por Delgado, 2011). Rev é considerada a proteína regulatória mais funcionalmente conservada entre os *Lentivirus*. A Rev está primariamente localizada no citoplasma, no entanto transita rapidamente entre o núcleo e o citoplasma, garantindo a otimização desse transporte durante todo o ciclo de replicação viral (Kuiken et al., 2011; Los Alamos National Laboratory, 1998)

O gene *vif* origina a proteína Vif (fator de infectividade viral), que apesar de não ser necessária na montagem e liberação de vírions, tem papel importante na infectividade dos mesmos. Na ausência de Vif, as partículas virais produzidas apresentam comprometimento de infectividade (Strebel, 2003; Strebel et al., 1988). Vif interage com a proteína de defesa antiviral da célula humana, APOBEC3G, inibindo seu efeito (revisto por Delgado, 2011).

O gene *vpr* codifica a proteína Vpr, que tem como principais funções a estimulação da expressão gênica, inibição do crescimento celular e indução da diferenciação celular (Cohen et al., 1990), já foi demonstrado que a proteína localizada no núcleo e induz a pausa na fase G2 do ciclo celular através de hiperfosforilações, que garante um ambiente favorável à replicação viral (Amini et al., 2004; Matsuda et al., 2006); essa ainda promove o transporte do complexo viral pré-integração ao núcleo imediatamente depois da entrada do vírus na célula, o que diferencia o HIV-1 da maioria dos retrovírus (revisto por Delgado, 2011).

O gene *vpu* está presente no HIV-1, mas não no HIV-2. *Env* e *vpu* são expressos a partir do mesmo RNAm bicistrônico, no qual ambos possuem códons de iniciação, dispensando, processos de clivagens subsequentes. Este é traduzido na proteína de membrana Vpu, que é fator importante na regulação do metabolismo celular. Vpu está associado à maturação do envelope, no entanto, não é encontrado no vírion. Tem como principal função promover a liberação dos novos vírions, ao inibir a ação de um fator de restrição celular chamado teterina, que impede a liberação de partículas virais. Vpu internaliza as moléculas de BST-2/teterina na membrana através de interações transmembranares direcionando-as para o lisossomo onde promove sua degradação. Vpu também promove a regulação negativa do CD4, aumentando o tráfego de proteínas para degradação, levando ao aumento da oligomerização e mudanças nas correntes iônicas das membranas celulares, resultando na modificação do tráfego de proteínas na membrana e alteração na sua integridade e seletividade. Além de regular outros fatores celulares como a expressão de MHC-I (González, 2015).

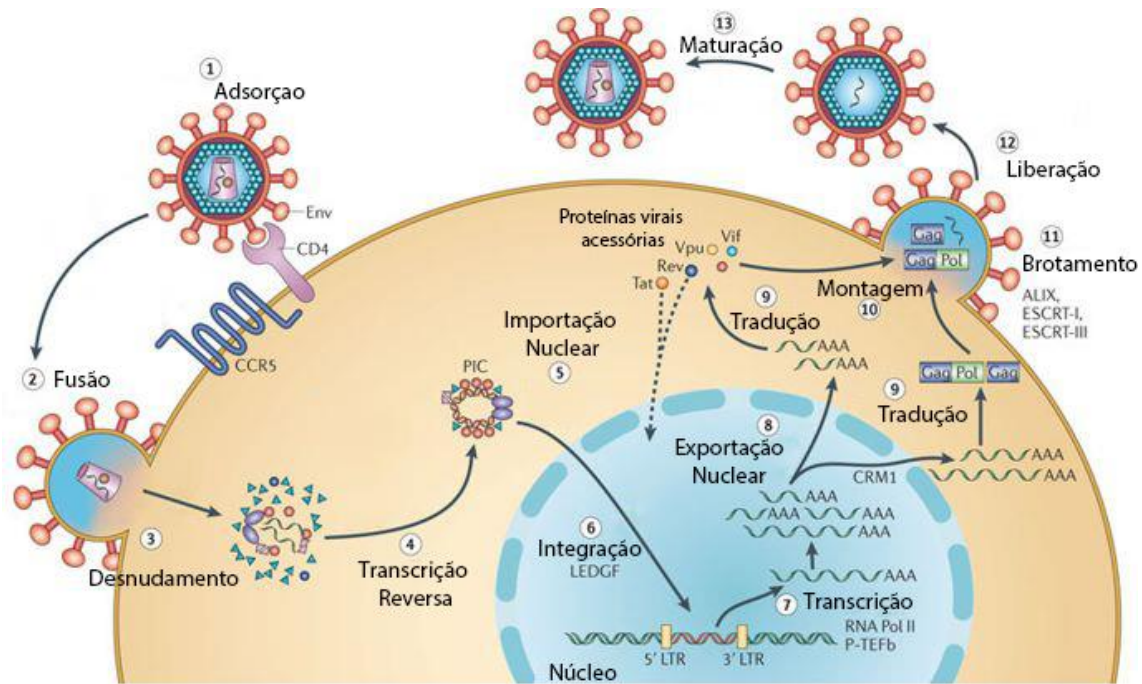
O gene *nef* codifica a proteína Nef, proveniente da tradução do RNAm bicistrônico com o gene *rev*. Nef é a maior proteína acessória do HIV-1, que tem sido alvo de diversos estudos já que participa de múltiplas funções. Nef não

apresenta atividade enzimática, porém interfere em diversas funções celulares devido à sua capacidade de interagir com muitos fatores do hospedeiro. As atividades mais características de Nef resultam da habilidade da proteína de se conectar com a maquinaria de tráfego celular e a alteração na sinalização celular (Basmaciogullari & Pizzato, 2014). Dentre suas principais funções, Nef, assim como Vpu, induz a regulação negativa da expressão do receptor CD4 e de moléculas de MHC classe I na superfície das células infectadas (Collins et al., 1998), o que pode representar um mecanismo de escape importante ao evadir um ataque mediado por células T CD8<sup>+</sup>. Esta promove aumento da infectividade viral, modulando vias intracelulares de ativação, e mantendo assim, altos níveis de replicação viral no hospedeiro (Basmaciogullari & Pizzato, 2014).

#### **1.4. Ciclo de replicação do HIV**

A infecção pelo HIV-1 tem início com a adsorção das partículas virais na superfície de células do hospedeiro que expressam o receptor CD4, através da interação deste com a glicoproteína do envelope viral *gp120* (figura 5\_etapa1). A molécula CD4 está presente em células do sistema imunológico como linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células dendríticas, monócitos/macrófagos, células da micróglia do sistema nervoso central (revisto por Gomez & Hope, 2005; Engelman & Cherepanov, 2012). Ao se ligar ao receptor CD4, a *gp120* sofre mudança conformacional e expõe a alça V3, que se associa a receptores de quimiocinas, CCR5 e/ou CXCR4 que servem como correceptores para a entrada do vírus na célula (figura 5, etapa1) (Clapham & Weiss, 1997). Essas ligações desencadeiam mudanças conformacionais na *gp120* e na *gp41*, levando a exposição da *gp41*, resultando na fusão entre o envelope viral e a bicamada lipídica da célula hospedeira e, conseqüentemente na entrada do vírus na célula (figura 5, etapa2) (Sattentau & Moore, 1991). Assim, o conteúdo do capsídeo é liberado no citoplasma (Leavitt et al., 2005), onde ocorre o processo de dissociação estrutural (desnudamento) e o RNA genômico e as enzimas virais são liberados na célula (figura 5, etapa 3). Recentemente, Burdick et al, 2020 sugerem que o desnudamento do vírus ocorre dentro do núcleo, próximo aos sítios de integração no DNA do hospedeiro (Burdick et al., 2020). Ainda no

citoplasma, inicia-se a atividade da enzima transcriptase reversa, que sintetiza uma molécula de DNA a partir do RNA viral (cDNA). Enquanto isso ocorre, através da sua subunidade RNase H, a degradação do RNA do híbrido DNA-RNA e a síntese da fita de DNA complementar é realizada pela atividade DNA polimerase RNA dependente da enzima transcriptase reversa (figura 5, etapa 4). Após o processo de transcrição reversa, ocorre a formação do complexo de pré-integração (PIC). Ele consiste em proteínas virais (incluindo a integrase) e do hospedeiro, e o cDNA viral sintetizado. A proteína Vpr se associa com o PIC contendo o cDNA, aumentando sua afinidade à maquinaria de importação nuclear (figura 5, etapa 5). O DNA viral é, então, transportado ao núcleo, e através da atividade da enzima integrase, ele é integrado ao genoma do hospedeiro e passa a ser denominado provírus (figura 5, etapa 6). O provírus tem tendência de manter-se em estado latente na célula infectada, sem produzir novos vírus até ser ativado por um evento mitogênico. Quando a célula é ativada, o HIV-1 utiliza-se da maquinaria biossintetizadora celular (Frankel & Young, 1998) para a transcrição do RNA viral (figura 5, etapa 7) que é posteriormente exportado para o citoplasma pela proteína Rev (figura 5, etapa 8), onde ocorre a tradução de proteínas (figura 5, etapa 9). As proteínas virais Tat e Rev traduzidas nessa etapa retornam ao núcleo aumentando a ativação da transcrição e a exportação desses transcritos, intensificando o processo replicativo a cada ciclo logaritmicamente, em uma alça de retroalimentação positiva (Engelman & Cherepanov, 2012). Após isso, ocorre a montagem (figura 5, etapa 10), brotamento (figura 5, etapa 11) e a liberação de novas partículas de HIV-1 (figura 5, etapa 12). Essas, então, passarão pelo processo de maturação a partir da enzima protease, dando origem ao vírion maduro de HIV-1 (figura 5, etapa 13) (Freed, 2001).



Nature Reviews | Microbiology

**Figura 5. Ciclo de replicação do HIV-1.** (1) Adsorção do HIV-1 à célula hospedeira a partir da interação da *gp120* com o receptor CD4 e o correceptor; (2) Fusão e entrada do vírus na célula por endocitose mediada pela *gp41*; (3) Desnudamento do capsídeo e liberação do seu conteúdo no citoplasma, em Burdick et al, 2020, há demonstração que esse desnudamento possa ocorrer dentro do núcleo, próximo aos sítios de integração; (4) Transcrição reversa do RNA viral em cDNA (5) Formação do PIC e importação nuclear desse complexo auxiliado pela proteína Vpr (6) Integração do DNA proviral ao DNA da célula hospedeira a partir da enzima integrase (7) Transcrição dos genes virais, ativada pela proteína Tat resultando na síntese de RNAm (8) Exportação nuclear desses RNAm auxiliada pela proteína Rev (9) Tradução das proteínas virais. As proteínas virais Tat e Rev traduzidas nessa etapa retornam ao núcleo aumentando a ativação da transcrição e a exportação desses transcritos, intensificando o processo replicativo (10) Montagem do vírion imaturo no citoplasma, inserção das proteínas de superfície e transmembranares na membrana plasmática da célula hospedeira (11) Brotamento do vírion imaturo a partir de exocitose, incorporando a bicamada lipídica da célula hospedeira (12) Liberação do vírion imaturo; (13) Maturação do vírion (adaptado de Engelman & Cherepanov, 2012)

### 1.5. Origem e diversidade genética do HIV

Os HIV tipo 1 (HIV-1) e tipo 2 (HIV-2), assim como os seus respectivos grupos originaram-se de eventos transmissão zoonótica distintos do Vírus da Imunodeficiência Símia, o SIV, de primatas não-humanos para humanos. Estes eventos ocorreram no início do século XX, a partir de mutações do SIV, que deram origem ao HIV, que passou a ser capaz de infectar o homem.



Os tipos de HIV são classificados nos grupos geneticamente distintos M, N, O e P do HIV-1 e os grupos A-G do HIV-2. Os quatro grupos do HIV-1 representam diferentes introduções de primatas não-humanos para humanos: os grupos M (*major*) e N (Novo) teriam sido resultado da introdução pelo SIVcpz; e os grupos O (*Outlier*), e P de introduções por SIVcpz (lentivirus que infecta chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes*) e SIVgor (lentivirus que infecta gorilas *Gorilla gorilla*) (Simon et al., 1998; Roques et al., 2004; Plantier et al., 2009; Tebit & Arts, 2011; D'Arc et al., 2015). Enquanto os grupos de HIV-2, seriam originários do SIVsm (lentivirus que infecta macacos *Sooty mangabey*).

Regiões africanas de habitat natural dos chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* foram demonstradas como coincidentes de áreas onde os grupos de HIV-1 já foram descritos; bem como regiões habitadas por macacos *Sooty mangabey* com regiões endêmicas para o HIV-2, corroborando evidências dessa transmissão zoonótica (Gao et al., 1999; Ejikeugwu et al., 2018). O HIV-1 é responsável pela pandemia de aids, enquanto o HIV-2 é endêmico em alguns países da África (Clavel et al., 1986; Alaeus, 2000).

Uma das principais características do HIV é sua alta variabilidade genética. Tal diversidade decorre de diversos mecanismos moleculares. Um desses fatores é o alto número de erros da enzima transcriptase reversa devido à ausência de atividade de reparo no momento da retrotranscrição do RNA viral em DNA, o que leva a incorporação de substituições, deleções e inserções de nucleotídeos (Roberts et al., 1988; Zhang et al., 2010; Hu & Hughes, 2012). Outros fatores importantes que contribuem para a alta diversidade do HIV incluem: a elevada taxa de replicação viral e a alta susceptibilidade a eventos de recombinação (Robertson et al., 1995). Os eventos de recombinação são processos comuns aos retrovírus, devido a existência de duas fitas de RNA em um mesmo compartimento e pela capacidade da transcriptase reversa em se transferir de uma fita de RNA para outra durante a retrotranscrição (Yu et al., 1998). Essa recombinação pode ocorrer entre genomas do mesmo subtipo, entre dois ou mais subtipos e até entre grupos diferentes de HIV-1 (Stein et al., 2004).

Devido a essa alta variabilidade genética, a classificação do HIV é complexa. O grupo M é o mais prevalente no mundo, sendo responsável por 90% da epidemia global de aids, e devido a sua variabilidade genética, é classificado filogeneticamente em dez subtipos: A, B, C, D, F G, H, J, K e L

(Robertson, 2000; Yamaguchi et al., 2019). Os subtipos A e F são ainda divididos em sub-subtipos: A1-A7, F1-F2 (Triques et al., 1999; Gao et al., 2001; Meloni et al., 2004; Vidal et al., 2006; Désiré et al., 2018). Em 2018, Désiré e cols. propõem que os subtipos B e D, sejam classificados como B/D, com a divisão em sub-subtipos B, D1, D2 e D3 (Désiré et al., 2018). A variabilidade genética varia de acordo com a região genômica avaliada, apresentando regiões mais conservadas e mais variáveis, podendo chegar a 35% entre os distintos subtipos na região do envelope viral (Korber et al., 2001). Além da variedade de subtipos e sub-subtipos virais, os eventos de recombinação entre os diferentes subtipos levam a geração de formas recombinantes circulantes (CRFs) e formas recombinantes únicas (URFs) (Robertson et al., 1995, 2000). Assim como para a descrição de um grupo ou subtipo, para a descrição de um CRF é necessário que sejam sequenciados pelo menos dois genomas completos e um parcial de vírus obtidos de indivíduos distintos que não sejam relacionados epidemiologicamente. Para ser considerado um novo CRF, essas três sequências devem apresentar o mesmo padrão de recombinação ao longo do genoma do vírus (Robertson, 2000). No caso de formas recombinantes entre subtipos encontradas em apenas um indivíduo infectado, essas são denominadas URFs. Os genomas recombinantes são atualmente responsáveis por pelo menos 20% das infecções por HIV-1 no mundo (Hemelaar, 2019). Até fevereiro de 2020, foram descritas e depositadas no banco de Los Alamos 101 CRFs (Hemelaar, 2019; HIV Sequence Database, 2020).

Essa diversidade genética global do HIV-1 é um grande obstáculo para o desenvolvimento de vacinas, já que para que uma vacina contra o HIV seja mundialmente eficaz, ela deve proteger contra os diferentes subtipos e formas recombinantes. Com isso, o desenvolvimento, os testes e implementações de vacinas contra o HIV dependem de um conhecimento atual e preciso da distribuição molecular nas diferentes regiões do mundo, uma vez que sequências imunogênicas devem ter a maior proximidade possível com as sequências virais circulantes na área de interesse (Dan H. Barouch & Korber, 2010; Gaschen et al., 2002). Além disso, a diversidade do HIV também pode ter grande impacto na progressão da aids, no diagnóstico, testes de carga viral, desenvolvimento de resistência aos antirretrovirais, bem como a resposta ao

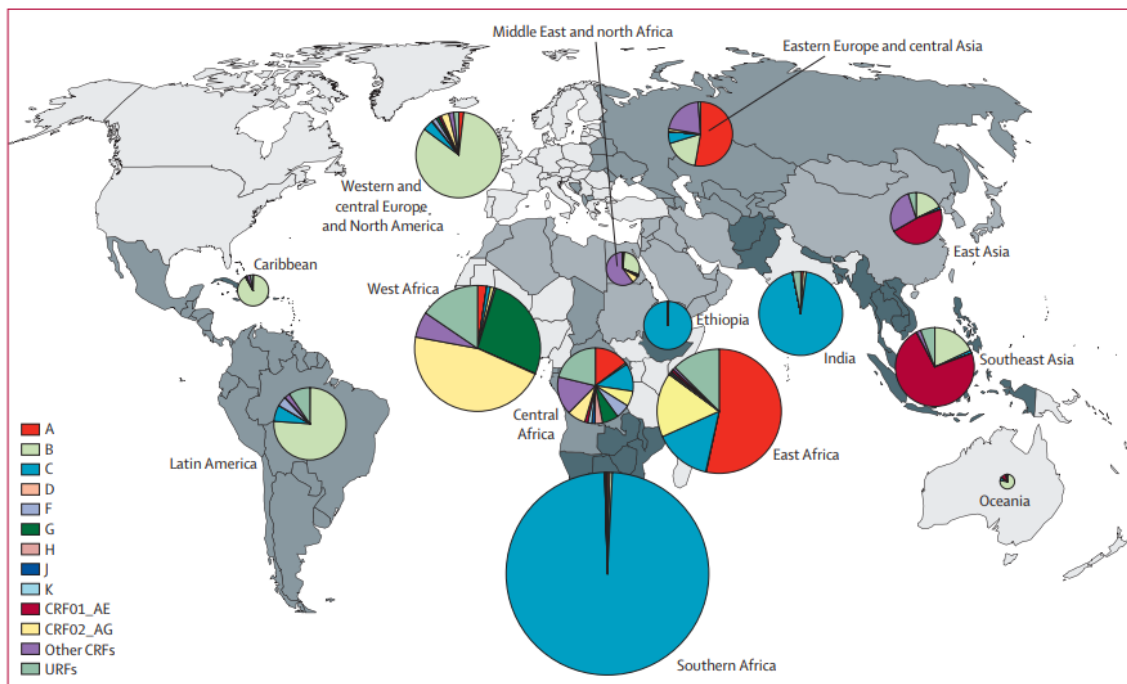
tratamento antirretroviral (Gregson et al., 2016; Hemelaar et al., 2019; Stone et al., 2018).

## 1.6. Epidemiologia molecular do HIV-1

### 1.6.1 No mundo

Os subtipos de HIV-1 se distribuem globalmente de maneira extremamente heterogênea (figura 6).

Em estudo recente foi analisada essa distribuição molecular com base num compilado de diversos estudos publicados com amostras de HIV-1 coletadas em diferentes regiões geográficas e países no período de 1990 a 2015, separando as análises de tendências em quatro períodos de tempo (1990-99, 2000-04, 2005-09 e 2010-15). No período mais recente, o subtipo C foi responsável por cerca de 46% das infecções de HIV no mundo. Na África Subsaariana, o subtipo C foi responsável por mais da metade das infecções. O subtipo B foi responsável por cerca de 12% de todas as infecções, seguido do subtipo A (10,3%), CRF02\_AG (7,7%), CRF01\_AE (5,3%), subtipo G (4,6%), subtipo D (2,7%) e os subtipos F, H, J e K juntos somaram 0,9%. Outras CRFs foram responsáveis por 3,7% das infecções, levando a porcentagem do total de CRFs a 16,7% das infecções. As URFs representaram 6,1% das infecções, que somadas às CRFs resultam em 22,8% de infecções por formas recombinantes. A distribuição dos subtipos e formas recombinantes mudou ao longo do tempo tanto nos países, quanto nas regiões e globalmente. No mundo, comparando-se os períodos de 2010-2015 ao período de 2005-09, houve um aumento do subtipo B, diminuição dos subtipos C e G e da CRF02\_AG, e os subtipos A e D se mantiveram estáveis. A CRF01\_AE, outras CRFs e as URFs aumentaram, mostrando uma tendência ao aumento na proporção global de recombinantes ao longo do tempo (figura 6) (Hemelaar et al., 2019).



**Figura 6. Distribuição global dos subtipos de HIV-1 e das formas recombinantes circulantes com base em amostras coletadas entre 2010 e 2015. (Hemelaar, 2019)**

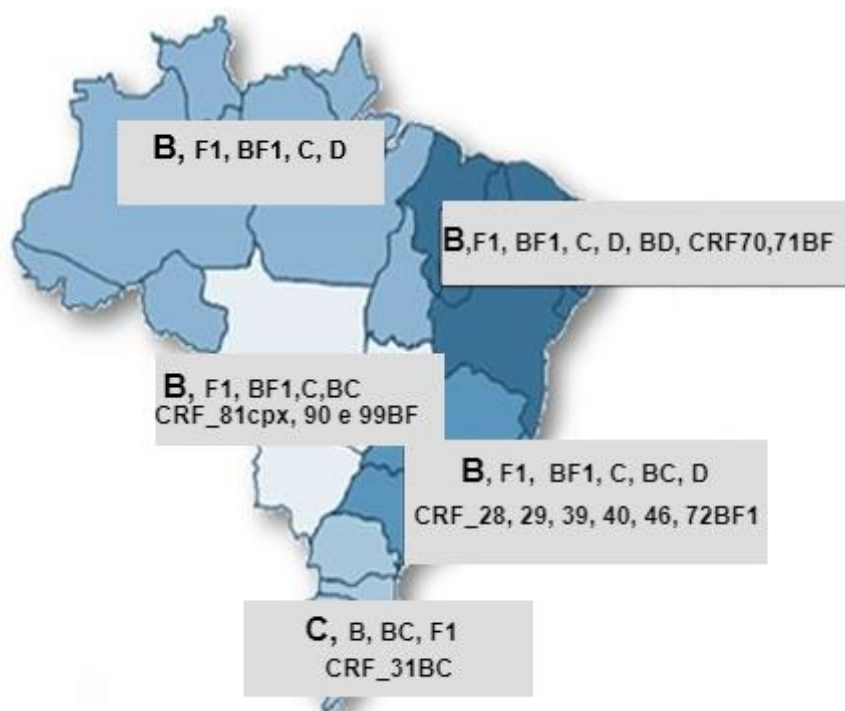
O subtipo B é amplamente distribuído e é o subtipo mais prevalente na Europa, nas Américas e na Oceania, sendo um dos subtipos mais estudados (Hemelaar et al., 2019). Na América Latina, há uma intensa circulação dos subtipos B (76%), C (7,3%), sub-subtipo F1 (4,4%) e recombinantes BF1 (Hemelaar et al., 2019). O sub-subtipo F1 já foi detectado na maioria dos países da América Latina, como na Argentina (Aulicino et al., 2007), Bolívia (Velarde-Dunois et al., 2000), Uruguai (Hierholzer et al., 2002) e no Brasil, onde possui maior prevalência (Morgado et al., 1994, 1998). No entanto, estudos já demonstraram que ocorre uma provável superestimação desses casos F1, com muitos dos casos, quando analisados por mais de uma região genômica ou genoma completo, na verdade, se tratando de formas recombinantes BF1 (Aulicino et al., 2012; Bello et al., 2010; Guimarães et al., 2012; Hierholzer et al., 2002; Marques et al., 2018). Em demais países, o subtipo F é majoritariamente detectado como forma recombinante (Hemelaar et al., 2019). Na América Latina, se destacam as formas recombinantes CRF\_12BF encontradas na Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia; CRF17\_BF na Argentina; CRF38\_BF no Uruguai e CRF44\_BF no Chile (Aguayo et al., 2008; Aulicino et al., 2011, 2012; Bello et al., 2010; Carr et al., 2001; Guimarães et al., 2012; Ruchansky et al., 2009)

### **1.6.2. No Brasil**

A epidemiologia molecular do HIV no Brasil é representada predominantemente pelo subtipo B, seguido pelos subtipos F1, C e formas recombinantes BF1 e BC (figura 7) (Louwagie et al., 1994; Morgado et al., 1994; Morgado et al., 1998; Vicente et al., 2000; Guimarães et al., 2002; Brindeiro et al., 2003; Couto-Fernandez et al., 2005; Brígido et al., 2007, 2011; Pessoa et al., 2014; Reis et al., 2017, 2019). Casos de infecções por subtipos D, A e CRF022\_AG também já foram descritos no país (Morgado et al., 1998; Couto-Fernandez et al., 2006; Caride et al., 2000; Pires et al., 2004; Machado et al., 2009; Cardoso et al., 2010). No entanto, a região Sul apresenta um perfil de distribuição de subtipos diferente do restante do país, apresentando uma predominância do subtipo C, principalmente no estado de Santa Catarina, representando 50-80% dos casos, sendo o estado com maior prevalência; e no estado do Rio Grande do Sul, representando entre 30-45% dos casos (Brindeiro et al., 2003; Brígido et al., 2007, 2011; Locateli et al., 2007; Raboni et al., 2010; Simon et al., 2010; Bello et al., 2012; Delatorre et al., 2013; Gräf & Pinto, 2013; Gräf et al., 2016). O subtipo C é seguido do subtipo B e recombinantes BC (principalmente CRF31\_BC) e baixa prevalência de F1 (Guimarães et al., 2002; Soares et al., 2005; Santos et al., 2006; Gräf et al., 2013). O Paraná ainda apresenta uma proporção maior do subtipo B (50-70%), seguido pelo subtipo C (20-30%) e recombinantes BC (~15%) (figura 7) (Ferreira et al., 2008; da Silva et al., 2010; Toledo et al., 2010; Raboni et al., 2010; Gräf & Pinto, 2013).

A região Sudeste apresenta a maior incidência de casos de aids do país e segue o padrão molecular descrito para maior parte do território nacional, com subtipo B predominante (75-80%), seguido do sub-subtipo F1 (10-15%), o qual a prevalência que pode chegar a 24,4% , dependendo da região genômica e do grupo analisado (Guimarães et al., 2002), recombinantes BF1 (4 a 10%), e em menor proporção pelo subtipo C (2-8%) (figura 7) (Sabino et al., 1994; Morgado et al. 1998; Tanuri et al., 1999; Brindeiro et al., 2003; Pires et al., 2004; Cabral et al., 2006; Barreto et al., 2006; Sá-Ferreira et al., 2007; Sanabani et al., 2010; Brígido et al., 2011; Sanabani et al., 2011; Alencar et al., 2013; Gräf, 2013). No Brasil, já foram descritas, baseadas em genomas completos, doze formas recombinantes circulantes, sendo 10 dessas CRFs BF1. Foram descritas na

região Sudeste: CRF28\_BF, CRF29\_BF, CRF39\_BF, CRF40\_BF CRF46\_BF e CRF72\_BF; Nordeste: CRF70\_BF e CRF71\_BF; Centro-Oeste: CRF81\_cpx, CRF90\_BF e CRF99\_BF; e Sul: CRF31\_BC (figura 7) (Morgado et al., 2002; De Sá Filho et al., 2006; Santos et al., 2006; Guimarães et al., 2008; Sanabani et al., 2010; Pessôa et al., 2014a, 2014b; Reis et al., 2017, 2019). Ainda há casos isolados de infecção pelo subtipo D, bem como recombinantes BD, CRF02\_AG, CRF45\_cpx e A (Morgado et al.,1998; Tanuri et al.,1999; Caride et al., 2000; Pires et al., 2004; Cabral et al.,2006; Eyer-Silva & Morgado, 2007; Varella et al., 2008; Delatorre et al., 2012, 2016, 2017).



**Figura 7. Distribuição dos subtipos e CRFs predominantes do HIV-1 por região geográfica no Brasil.** (baseado em Morgado et al., 2002, Santos et al, 2006, De Sá Filho et al.,2006, Guimarães et al., 2008, Sanabani 2010, Pessôa et al., 2014a, 2014b; Reis et al, 2017; Reis et al, 2019)

A partir de sequenciamento do envelope viral de amostras do subtipo B no Brasil, foi possível detectar a existência de uma variante que se caracteriza pela presença do aminoácido Triptofano (W) na posição 16 do topo da alça V3 da *gp120* do envelope viral (Potts et al. 1993; Morgado et al. 1994; Covas et al. 1998), em substituição ao aminoácido Prolina (P), comum aos isolados de subtipo B predominante nas Américas, inclusive Brasil, e na Europa, sendo esta denominada B" ou B<sub>BR</sub>. Esta alteração leva a uma diferente conformação de estrutura secundária (Morgado et al. 1996) e uma menor susceptibilidade a

neutralização do que a variante B pandêmica (de Almeida et al., 2016). A variante B<sub>BR</sub> do subtipo B representa cerca de 37 a 57% das sequências B e já foi encontrada em todas as regiões do Brasil (Morgado et al. 1996; Vêras et al. 2007; Machado et al. 2009; Pimentel et al. 2013).

### **1.7. A história natural da infecção pelo HIV-1**

A patogênese da infecção pelo HIV-1 e sua história natural são complexas e dependem de diversos fatores relacionados à interação do vírus com o hospedeiro (Epstein et al., 1993). A infecção pelo HIV-1 ocorre a partir do contato de um indivíduo não-infectado com sangue, sêmen, leite materno de um indivíduo infectado. Em torno de duas a quatro semanas a partir dessa exposição, inicia-se a fase aguda da infecção (figura 8). A fase aguda é geralmente caracterizada por intensa replicação viral e alta viremia, apresentando carga viral superior a  $10^7$  cópias de RNA/ml de plasma, e a disseminação do vírus para os linfonodos, tendo como consequência uma considerável depleção do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (figura 8) (Pantaleo & Fauci 1996; Moir, Chun, and Fauci 2011; Deeks 2012). Após a replicação nos linfonodos, o HIV atinge outros tecidos linfóides, particularmente o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) (Piatak et al., 1993). Durante a fase aguda, cerca de 50 a 90% dos indivíduos infectados apresentam sintomas inespecíficos semelhantes à gripe que geralmente incluem febre, fadiga, faringite, dor de cabeça e tem duração de uma semana, aproximadamente (Cohen, et al 1997; Walensky et al. 2001). Em resposta à infecção ocorre um aumento significativo de células TCD8<sup>+</sup> no sangue periférico, o que indica um papel importante dessas células na tentativa de controle inicial da replicação viral (Borrow et al. 1994; Koup et al. 1994; Barouch et al. 2000; Streeck et al. 2009).

Após isso, há um declínio da viremia, com recuperação do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>. A viremia declina até atingir o chamado “*set point*” viral, que marca o início da fase crônica da infecção (figura 8) A contagem de linfócitos TCD4<sup>+</sup> se mantém estável ou sofre declínio gradual durante essa fase (Cohen et al.,1997). A maioria dos indivíduos se mantém assintomática durante a fase crônica, representando um longo período de latência clínica (figura 8). No entanto, os níveis de viremia não são totalmente controlados, apesar de serem

baixos (Pantaleo & Fauci, 1996). O efeito citopático prolongado do vírus sobre as células infectadas, bem como de decorrentes mecanismos imunológicos como a apoptose e citotoxicidade, levam a destruição destas células e, assim, resulta numa grande depleção de células TCD4<sup>+</sup>. Com isso, essas células atingem níveis inferiores a 200 células/mm<sup>3</sup>, geralmente, após um período de três a dez anos. Associada à depleção, ocorrem processos de exaustão imune que levam à queda de anticorpos neutralizantes e resposta específica de linfócitos. Ocorre, com isso, um novo aumento da replicação viral, levando aos sintomas da fase de aids (figura 8). Dessa forma, a síndrome é caracterizada por uma acentuada imunossupressão, que, conseqüentemente, torna o indivíduo infectado susceptível a infecções oportunistas (como tuberculose, toxoplasmose, criptosporidiose), neoplasias secundárias e manifestações neurológicas. Na ausência da terapia antirretroviral, esses sintomas culminam no óbito do indivíduo (figura 8) (Cohen et al,1999; Kahn & Walker 1998; Alcamí and Coiras 2011). Com a introdução da TARV, o curso clínico da infecção pelo HIV é alterado.

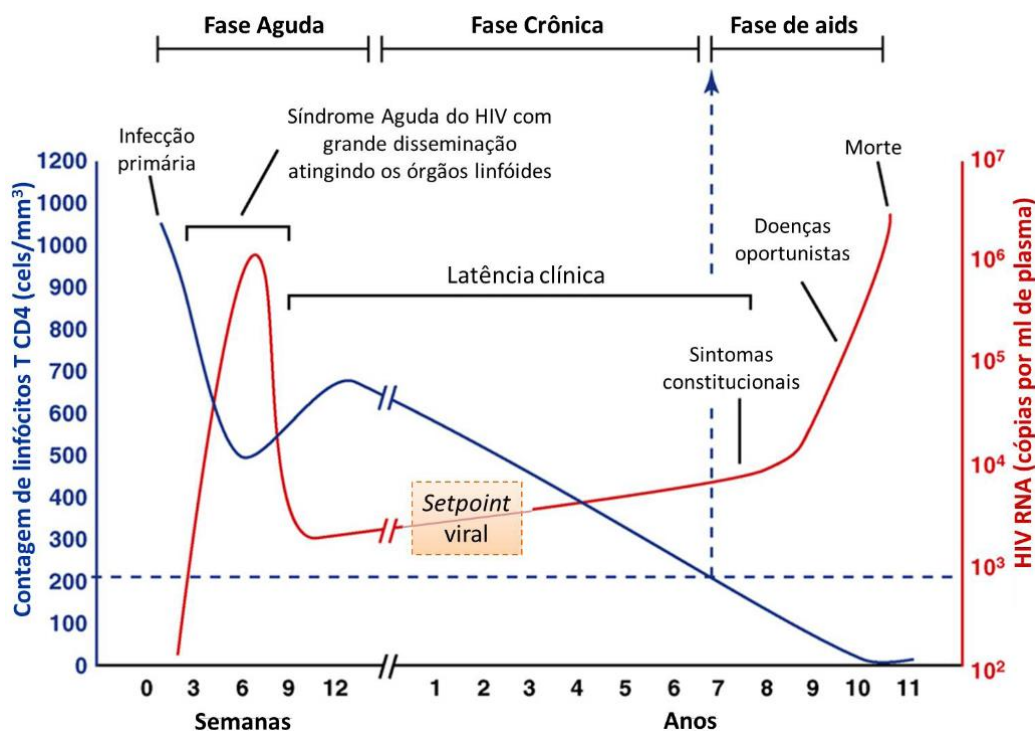


Figura 8. História natural da infecção pelo HIV-1. (Adaptado de An and Winkler 2010)



## 1.8. Terapia antirretroviral (TARV)

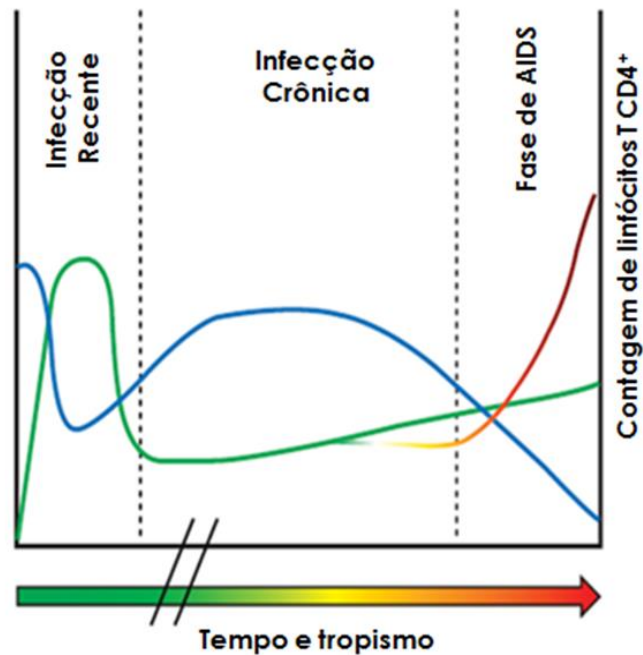
Os fármacos que compõem a TARV atuam na inibição de diferentes etapas do ciclo replicativo do vírus, proporcionando o reestabelecimento e/ou manutenção da resposta imune, que leva ao aumento da sobrevivência e qualidade de vida dos indivíduos vivendo com HIV (Ford et al., 2018; Grubb et al., 2014; Mayer et al., 2004; Oguntibeju, 2012). Desde 2013, a OMS passou a recomendar a política de “test and treat” (testar e tratar), a qual estimula a testagem precoce e preconiza a imediata introdução da TARV, tão logo haja confirmação da infecção pelo HIV (OMS, 2013). Esta política foi inicialmente proposta diante de contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> menor ou igual a 500 células/uL e, em 2015, aperfeiçoada, recomendando que a TARV seja iniciada independentemente dos valores de carga viral e contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do indivíduo (OMS, 2015). Essa medida impactou positivamente o cenário das PVHIV, promovendo melhor reconstituição do sistema imune, diminuição na diversidade dos reservatórios virais e, ainda, a diminuição da transmissão do HIV (Chihana et al., 2018; Leite et al., 2019; UNAIDS, 2019).

Atualmente, há seis classes de antirretrovirais: os inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa e os inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa, que atuam na enzima viral transcriptase reversa e inibem a formação do DNA proviral (Kakuda, 2000; Grobler et al., 2007; Holec et al., 2017; Rai et al., 2018); os inibidores de protease, que bloqueiam a atividade da enzima protease, impedindo a clivagem das poliproteínas e resultando em vírions imaturos e não infectivos (Ghosh et al., 2016); os inibidores da integrase, que inibem a integração do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira através do bloqueio da enzima viral integrase (Adams et al., 2012; Di Santo, 2014; van der Galiën et al., 2019); inibidor de fusão, que atua como antagonista da gp41 (LaBonte et al., 2003; Fung & Guo, 2004; Lobritz et al., 2010; Rullo et al., 2019); e antagonista do correceptor CCR5, que inibe a ligação da alça V3 da gp120 com esse receptor e, conseqüentemente, bloqueia a entrada do vírus na célula (Lobritz et al., 2010; Rullo et al., 2019).

## 1.9. Caracterização biológica do HIV-1: tropismo e regiões associadas

Os isolados virais de HIV-1 podem ser classificados biologicamente de acordo com o uso preferencial do correceptor de quimiocina para entrada na célula, que determina o tropismo por determinado tipo celular. Denomina-se R5 trópicos os vírus que utilizam somente o correceptor CCR5, geralmente mais expressos por linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados e macrófagos. Já os vírus X4 trópicos, utilizam o correceptor CXCR4 que é expresso usualmente por células T de linhagem e linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naive*. Aqueles com capacidade de utilizar simultaneamente os correceptores CCR5 e CXCR4 são denominados vírus R5X4 trópicos. Uma fração significativa de linfócitos TCD4<sup>+</sup> de memória expressam ambos os correceptores CCR5 e CXCR4 (Bleul et al. 1997; Berger et al, 1999; Lee et al. 1999; Thielen et al. 2010). Os vírus R5 são menos patogênicos, já os vírus X4 apresentam alta capacidade replicativa e levam a uma progressão mais rápida para doença (De Jong et al. 1992; Fouchier et al. 1992; Alkhatib et al. 1996; Franca et al. 2011; Almeida et al. 2014).

De acordo com a história natural da infecção pelo HIV-1, durante a fase aguda verifica-se a prevalência de variantes R5 e a emergência de vírus X4 em estágios mais avançados da infecção (figura 9). A mudança de tropismo de CCR5 para CXCR4 está geralmente associada ao aumento da carga viral e diminuição de células TCD4, levando assim, a uma progressão rápida para a aids (figura 9) (Berger et al, 1999; Brumme et al. 2005; Thielen et al. 2010; Verhofstede et al. 2012; Almeida et al. 2014; Arif et al. 2017). A maioria dos estudos de tropismo foi realizada em coortes com predomínio de subtipo B e relatam que entre 40% e 50% dos indivíduos fazem troca de R5 para X4 ao longo da progressão para a aids e aproximadamente 40% permanecem R5 ao longo da infecção (Berger et al., 1999; Brumme et al., 2005). Entretanto, alguns estudos já detectaram no início da infecção uma prevalência que varia de 4 a 16% de vírus X4 (De Mendoza et al. 2008; Frange et al., 2009; Huang et al. 2009)



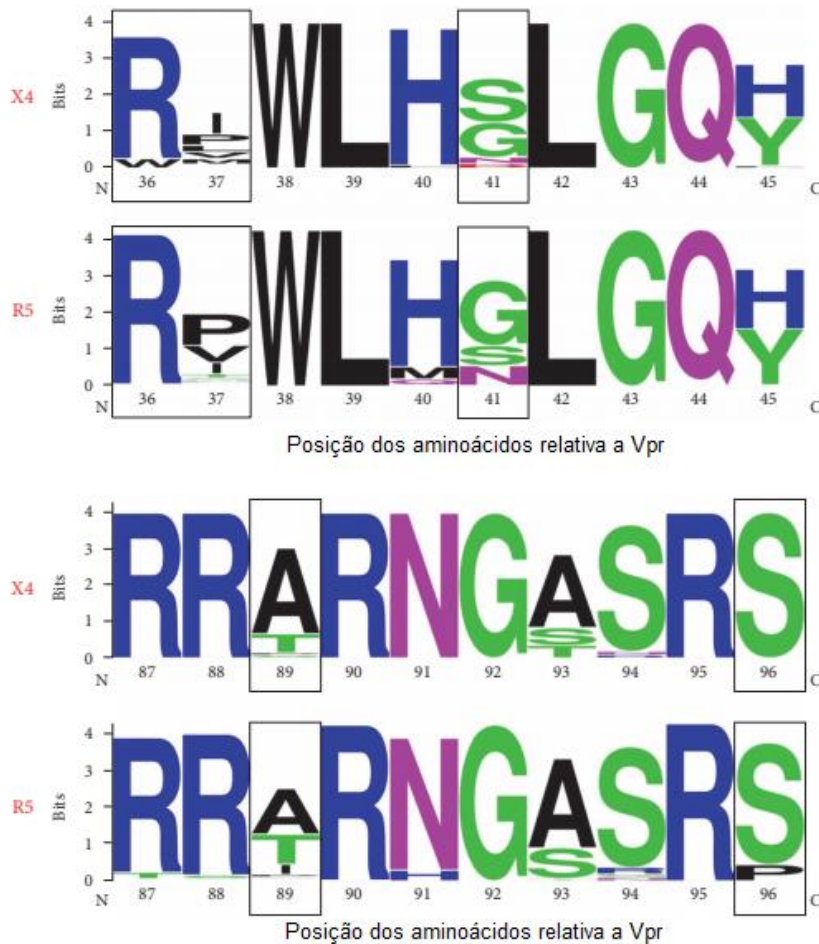
**Figura 9. Proposta da distribuição das populações R5 e X4 trópicas ao longo da progressão da aids baseado no subtipo B.** Contagem de linfócitos T CD4+ (azul), população de HIV-1 R5 trópica (verde), população de HIV-1 duo-trópica (amarelo), população de HIV-1 X4 trópica (vermelho) (adaptado de Verhofstede et al., 2012)

Com relação a variante B<sub>BR</sub> o tema é controverso; já foi descrito uso exclusivo do correceptor CCR5 por essas variantes (Leal et al., 2008), entretanto, em outro estudo foram encontradas variantes X4 no início da infecção (Sucupira et al., 2012). Alguns estudos demonstraram uma grande proporção de vírus X4 em recém infectados pelo subtipo D (Kaleebu et al., 2007; B. T. Korber et al., 1994). Outros demonstraram que infectados pelo subtipo C utilizam majoritariamente o correceptor CCR5, sendo rara a ocorrência de variantes X4 mesmo após a progressão para doença (Cilliers et al., 2003; Coetzer et al., 2006, 2011). Desta forma, os subtipos podem desenvolver estratégias distintas na utilização do correceptor de entrada (Borm et al., 2016; Cashin et al., 2013; Coetzer et al., 2011; Jakobsen et al., 2013), demonstrando a importância de se estudar as possíveis diferenças entre aqueles circulantes no Brasil, principalmente a variante B<sub>BR</sub> tipicamente brasileira e o sub-subtipo F1 que carecem de informações.

Após o desenvolvimento do Maraviroque, um fármaco antagonista de CCR5, para o qual apenas indivíduos com vírus R5 são elegíveis, que é utilizado na terapia de resgate no Brasil desde de 2013, o interesse no estudo dos correceptores de entrada e no comportamento dos vírus R5 e X4 ao longo da

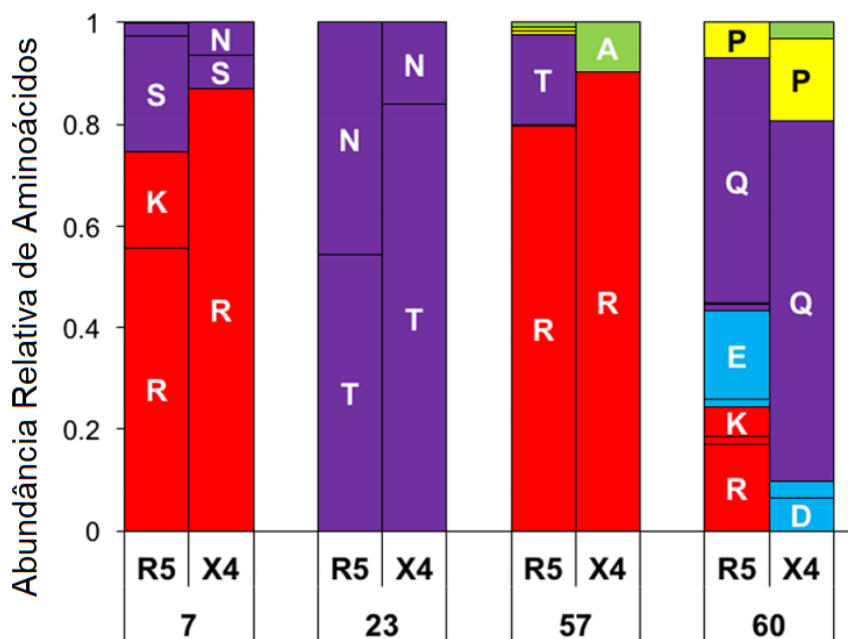
infecção pelo HIV têm aumentado. Assim, a determinação do tipo de correceptor utilizado pelo vírus é de extrema importância para que a eficácia do tratamento seja monitorada.

A dinâmica da transição que determina a seleção dos vírus X4 a partir da infecção primária por vírus R5 tem sido amplamente estudada. Variações genéticas na alça V3 da *gp120* do envelope viral, tais como presença de aminoácidos básicos arginina (R) e lisina (K) nas posições 11 e 25 e a substituição de resíduos negativamente carregados por outros de carga positiva ao longo da alça, demonstram influência na troca do uso do correceptor CCR5 para CXCR4 pelos vírus ao decorrer da infecção (Coetzer et al., 2006). Diversos ensaios genotípicos já foram desenvolvidos para predição do uso do correceptor de entrada pelo HIV-1 e se baseiam na sequência da alça V3 da *gp120* do envelope viral. No entanto, tem sido descrito o envolvimento de outras regiões genômicas além da V3 na escolha do correceptor, como as regiões V1/V2 e C4 da *gp120* (Labrosse et al., 2001; Suphaphiphat et al, 2007; Santos-Costa et al, 2014) e mais recentemente do Tat, LTR e Vpr (Antell et al, 2016, 2017). Apesar dessas proteínas não estarem diretamente associadas à entrada do vírus na célula, já foi descrito que Vpr é essencial na replicação em macrófagos (Kogan & Rappaport 2011; Kogan et al. 2013) e possível coevolução entre Vpr e V3 do envelope, sugerindo funcionalidade tipo específica (Antell et al., 2017). Em estudo recente foi descrita troca do consenso de aminoácidos nas posições 37 e 41 desta proteína quando sequências de vírus R5 e X4 eram comparadas, bem como alteração na abundância nas posições 36, 89 e 96, conforme visualizado na figura 10 (Antel et al., 2017).



**Figura 10. Logos demonstrativos da região Vpr do HIV-1 baseada no subtipo B do HIV-1. Abundância das sequências analisadas para as regiões 36–45 e 87–96. As posições relatadas como estatisticamente divergentes estão destacadas em caixas pretas. Estes resultados foram obtidos a partir da divergência de Jensen-Shannon (adaptado de Antell et al, 2017).**

No estudo de Antell e cols. 2016, diferentes abundâncias de aminoácidos nas posições 7, 23, 57, 60 em Tat foram verificadas em vírus R5 em comparação com X4, de acordo com a figura 11. Estes achados sugerem que a evolução de HIV-1 R5 para X4 requer adaptação a nível de controle transcripcional em adição à ligação do correceptor e entrada na célula (figura 11) (Antell et al., 2016).



**Figura 11. Posições em Tat estatisticamente divergentes entre X4 e R5 do HIV-1 subtipo B.** Abundância das posições relatadas como estatisticamente divergentes (7, 23, 57, 60) a partir da análise de divergência de Jensen-Shannon. Aminoácidos foram coloridos de acordo com suas propriedades químicas como: carregados positivamente (vermelho), carregados negativamente (azul), polar não carregado (roxo), hidrofóbico (verde) e não classificados (amarelo) (adaptado de Antel et al, 2016).

### 1.10. Justificativa

No Brasil, a epidemia de HIV-1 é composta majoritariamente pelos subtipos B, F1, C, recombinantes BF1 e BC (Potts et al., 1993; Morgado et al., 1994; Louwagie et al., 1994; Vicente et al., 2000; Guimarães et al., 2002; Morgado et al., 2002; Brindeiro et al., 2003; Couto-Fernandez et al., 2005; Brigido et al., 2011; Pessôa et al, 2014). Além destes, observamos a presença de uma variante do subtipo B, denominada B<sub>BR</sub>, a qual está presente em 37 a 57% das amostras B brasileiras, mas possui baixa prevalência fora do país (Morgado et al., 1994, 1998, Covas et al., 1998, Pimentel et al., 2013). Uma prevalência que pode chegar a 24,4%, dependendo da região genômica e do grupo analisado (Guimarães et al., 2002), é verificada para o sub-subtipo F1, o qual apresenta prevalência mundial menor do que 1% (Hemelaar et al., 2018), sendo assim de suma relevância o estudos de isolados que compõem a epidemia brasileira para melhor conhecimento dos mesmos.

O HIV pode ser classificado biologicamente de acordo com o tipo de correceptor de entrada na célula hospedeira (Berger et al., 1999). De acordo com a história natural da infecção pelo HIV-1, estudos com o subtipo B demonstraram que durante a fase aguda verifica-se a prevalência de variantes R5 e ao longo da infecção entre 40% a 50% dos vírus fazem troca de R5 para X4, geralmente associada a uma progressão mais rápida para aids (Berger et al., 1999; Brummer et al., 2005; Thielen et al., 2010). Com relação a variante B<sub>BR</sub> o tema é controverso; já foi descrito uso exclusivo do correceptor CCR5 por essas variantes (Leal et al., 2008), entretanto, também foram encontradas variantes X4 no início da infecção (Sucupira et al., 2012). Alguns estudos demonstraram uma grande proporção de vírus X4 em recém infectados pelo subtipo D (Korber et al., 1994; Kaleebu et al., 2007). Outros demonstraram que infectados pelo subtipo C utilizam majoritariamente o correceptor CCR5, sendo rara a ocorrência de variantes X4 mesmo após a progressão para doença (Cilliers et al., 2003, Coetzer et al., 2011). A reduzida incidência de vírus X4 nesses indivíduos pode ser atribuída ao fato deste requerer mais mutações tanto na região V3 como em outras regiões da gp120 em comparação com o subtipo B. Desta forma, os subtipos podem desenvolver estratégias distintas na utilização do correceptor de entrada (Coetzer et al., 2011; Jakobsen et al., 2013) demonstrando a importância de se estudar as possíveis diferenças entre aqueles circulantes no Brasil, principalmente a variante B<sub>BR</sub> tipicamente brasileira e o sub-subtipo F1 que carecem de informações.

Diversos ensaios genotípicos já foram desenvolvidos para determinação do uso do correceptor de entrada pelo HIV-1 e se baseiam na sequência da alça V3 da gp120 do envelope viral, onde ocorre a ligação com o correceptor. No entanto, tem sido descrito o envolvimento de outras regiões genômicas além da V3 na escolha do correceptor, como as regiões V1/V2 e C4 da gp120 (Labrosse et al., 2001, Santos-Costa et al, 2014, Suphaphiphat et al, 2007) e mais recentemente do Tat, LTR e Vpr (Antell et al, 2016, 2017). Vpr é uma proteína acessória do HIV-1 com vários papéis na replicação viral, sendo essencial na replicação de macrófagos (Kogan and Rappaport, 2011), sugerindo funcionalidade tipo específica, e possível coevolução com V3 do envelope (Antell et al, 2017). Tat não está diretamente associada à entrada do vírus na célula, contudo é um dos fatores regulatórios essenciais para a expressão genética do

HIV, responsável por ativar a transcrição e alongamento do promotor LTR. Em dois estudos recente foram descritas seleção em alguns aminoácidos, levando a diferenças de proporção destes nas proteínas Vpr e Tat, quando sequências de vírus R5 e X4 do subtipo B eram comparados (Antel et al., 2016, 2017). Estes achados sugerem que a evolução de HIV-1 R5 para X4 requer adaptação a nível de controle transcricional em adição à ligação do correceptor e entrada na célula e que esta pode ser decorrente dos diferentes alvos celulares durante o curso de uma infecção produtiva (Antel et al., 2016). Como ambos os estudos se basearam apenas em amostras do subtipo B, torna-se necessário avaliar se o mesmo padrão se repete nos demais subtipos e para as variantes do subtipo B. Dessa forma, avaliamos neste estudo se os subtipos/variantes do HIV-1 prevalentes no Brasil possuem estratégias distintas de uso do correceptor de entrada e, se outros genes além da região V3 do envelope estariam associados a esse tropismo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar o genotropismo e possíveis assinaturas correlacionadas ao tropismo nos genes regulatórios e acessórios em indivíduos HIV-1 cronicamente infectados pelo subtipo B, variante B<sub>BR</sub>, e sub-subtipo F1.

### **2.2 Objetivos específicos:**

- Subtipar o HIV-1 com base na região C2V3 do envelope viral;
- Determinar a possível influência dos subtipos B (variantes B<sub>PAN</sub> e B<sub>BR</sub>) e F1 do HIV-1 no uso dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4;
- Avaliar a influência de trocas de aminoácidos nas proteínas Vif, Vpr, Vpu, Rev e Tat de acordo com o subtipo e uso do correceptor.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Casuística**

Este é um estudo transversal com a utilização de amostras biológicas estocadas que fazem parte do biorrepositório do Laboratório de aids e Imunologia Molecular - IOC/FIOCRUZ e foram encaminhadas ao laboratório através da rede nacional de genotipagem da resistência do HIV-1 (RENAGENO). A casuística é composta por indivíduos HIV-1 positivos em uso da terapia antirretroviral combinada, e com falha virológica (carga viral  $\geq 1000$  cópias/mL) no momento da coleta. Analisamos 159 amostras previamente classificadas através de análise filogenética da região da polimerase viral (PR/RT) como do subtipo B ou sub-subtipo F1, a fim de obtermos 30 amostras classificadas como B, 30 amostras B<sub>BR</sub> e 30 amostras F1 na região do envelope viral (C2V3). A autorização para utilização deste material biológico com vista a genotipagem da região alvo deste estudo foi prevista no adendo submetido e aprovado pelo CEP no projeto “Análise da dinâmica de transmissão e disseminação do HIV-1 e da prevalência de mutações de resistência aos antirretrovirais no estado do Rio de Janeiro”, CEP: CAAE 03925112.0.0000.5248.

#### **3.2. Extração de DNA**

A extração do material genético foi feita a partir de amostras de sangue total, por método cromatográfico em colunas de sílica, através do kit de extração QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, Alemanha) utilizando-se 200  $\mu$ L seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi identificado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até utilização.

### **3.3. Amplificação por *nested* PCR das regiões estudadas**

#### **3.3.1. Amplificação por *nested* PCR da região C2V3 da gp120 do envelope viral**

Visando realizar a caracterização do subtipo e análise de tropismo, utilizamos a técnica de *nested* PCR para amplificação da região C2V3 da gp120 do envelope viral. Essa técnica consiste na realização de duas reações de PCR subsequentes com dois pares de iniciadores. Foram utilizados os iniciadores externos ED5/ED12 (6557-7811 posição relativa ao HXB2) para a primeira reação e os internos ED31/ED33 (6817-7381 posição relativa ao HXB2) para a segunda reação. O fragmento interno resultante dessa amplificação possui 564 pares de base (pb) (figura 12).

Para a primeira reação de PCR de cada amostra, utilizamos a enzima Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, EUA) com os seguintes reagentes: 5 µL do Tampão Buffer 10X da enzima; 2,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 0,7 µL de dNTP (25 mM); 0,7 µL de cada iniciador (25 pmol/µL); 35,4 µL de água DEPC e 0,3 µL (1,5U) da enzima. Adicionamos, então, 5 µL de DNA da amostra à essa solução.

Após o preparo, os tubos contendo as reações foram colocados no termociclador. As reações foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) com a seguinte ciclagem de PCR: 1 ciclo de 94°C por 2min, 35 ciclos de 94°C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 2 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min.

Para a segunda reação de amplificação, transferimos 5 µL do produto da primeira reação, mantendo as mesmas concentrações dos reagentes e a mesma ciclagem. Para a visualização da amplificação do fragmento alvo, foram aplicados 5 µL do produto da segunda reação de PCR com 1 µL do corante GelRed (20X) e 1 µL do tampão de corrida. A corrida de eletroforese ocorreu durante 90 minutos a 80 volts, utilizando o TBE 1X como tampão de corrida.

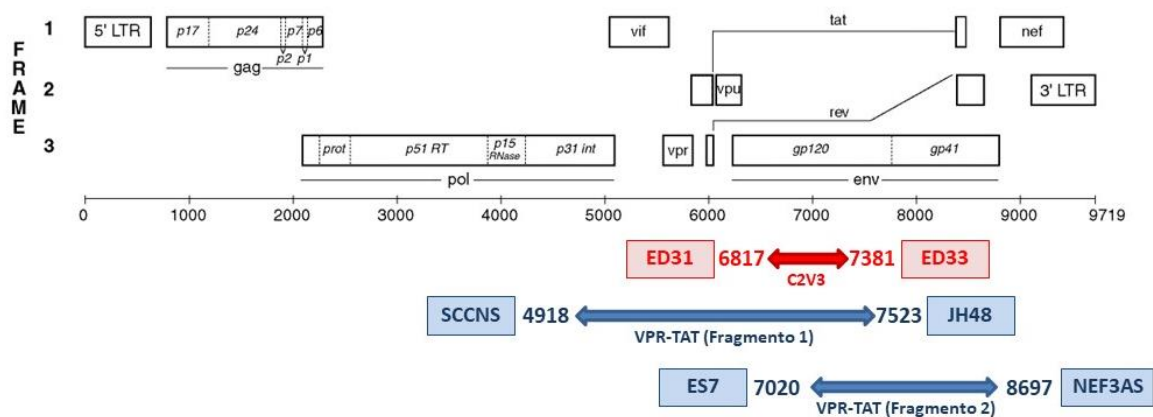
#### **3.3.2. Amplificação por *nested* PCR da região Vif-Rev**

Para a verificação de assinaturas nos genes *vpr* e *tat*, que possam estar associadas ao tropismo viral, inicialmente nos propusemos a realizar a técnica

de *nested* PCR para um único fragmento compreendendo toda a região de Vif a Rev. No entanto, enfrentamos diversos problemas metodológicos e optamos por utilizar dois fragmentos sobrepostos. Para o primeiro fragmento, foram utilizados os iniciadores externos SCCOS/ES8 (4841-7657 posição relativa ao HXB2) e os internos SCCNS/JH48 (4918-7523 posição relativa ao HXB2). O fragmento interno resultante dessa amplificação possui 2605 pb. Para o segundo fragmento, foram utilizados os iniciadores externos JH44/NEF6AS (6974-9036 posição relativa ao HXB2) e internos ES7/NEF3AS (7020-8697 posição relativa ao HXB2). O fragmento interno resultante dessa amplificação possui 1677 pb (figura 12).

Utilizamos a enzima Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA Polymerase (Invitrogen, EUA), para obter maior fidelidade, com os seguintes reagentes para cada amostra: 10 µL do Tampão Buffer 5X da enzima; 1 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1 µL de dNTP (25 mM); 1 µL de cada um dos iniciadores (25 pmol/µL), 30,5 µL de água DEPC e 0,5 µL da enzima (1U). Adicionamos 5 µL de DNA da amostra.

Após o preparo, os tubos contendo as reações foram colocados no termociclador. As reações foram realizadas no termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) com a seguinte ciclagem de PCR: 1 ciclo de 98°C por 2min, 35 ciclos de 98°C por 30s, temperatura de anelamento de 55°C para o fragmento 1 e 57°C para o fragmento 2 por 45s, 72°C por 2 min, e 1 ciclo de 72°C por 10 min. Para a segunda reação, transferimos 5 µL do produto da primeira reação, mantendo a mesma concentração dos reagentes.



**Figura 12. Regiões estudadas no genoma do HIV-1.** Representação do genoma do HIV-1 com os fragmentos da reação final de PCR da região C2V3 (vermelho) e Vpr-Tat (azul).

### 3.4. Purificação e sequenciamento dos produtos de PCR

Os produtos da segunda reação do PCR de cada fragmento estudado foram purificados utilizando-se o kit Illustra™GFX™PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, UK) através de colunas de purificação, seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram submetidos à reação de sequenciamento utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, EUA). Para o sequenciamento da região C2-V3, utilizamos os iniciadores ED31, ED33 e/ou ENV04AS. Para o fragmento 1 Vpr-Tat, utilizamos os iniciadores SCCNS, MMINT6, VPR1S, VPR1AS, ED3, ED3AS, VPU1S, VPU1AS, ED5, ENV01AS, ENV03AS, JH48. Para o fragmento 2 Vpr-Tat, utilizamos os iniciadores ED33, ED33S, ES7, ED14, SCDOS, JH35, JH38, JH44, NEF3AS, NEF6AS, SCDOS. As amostras foram sequenciadas na Plataforma de Sequenciamento do IOC/FIOCRUZ.

**Tabela 1. Primers utilizados nas reações de sequenciamento**

<b>Primers</b>	<b>Sentido</b>	<b>Sequência</b>	<b>Posição relativa ao HXB2*</b>
ED31	Senso	CCTCARYCATWACACARGCYTGCCAAAG	6817kb
ED33	Anti-senso	TTRCARTAGAAAAATTCYCCTC	7381kb
EN04AS	Anti-senso	ATTTCTRGGTCCCCTCCTGA	7336kb
SCCNS	Senso	CAAATTTCCGGGTTTATTACAGGGACA	4890kb
MMINT6	Senso	GGGATGTGTACTTCTGAACTT	5213kb
VPR1S	Senso	GAAGCTGTYAGACAYTTTCC	5643kb
VPR1AS	Anti-senso	GGAAARTGTCTRACGCTTC	5662kb
ED3	Senso	GTTAGGCATYTCCTATGGCAG	5956kb
ED3AS	Anti-senso	CCTGCCATAGGARATGCCTAA	5977kb
VPU1S	Senso	AGAGCAGAAGACAGTGGCAA	6206kb
VPU1AS	Anti-senso	TTGCCACTGTCTTCTGCTCT	6225kb
ED5	Senso	ATGGGATCAAAGCCTAAARCCATGTG	6557kb
ENV03AS	Anti-senso	TTTAGGCTTTGATCCCAT	6574kb
ENV01AS	Anti-senso	CTTTGGACARGCYTGTGTWATGRYTGAGG	6845kb
JH44	Senso	ACAGTRCARTGYACACATGG	6954kb

ES7	Senso	CTGCTGTAAATGGCAGTCTAG	6999kb
JH48	Anti-senso	RATGGGAGGRGYATACA	7541kb
ED14	Anti-senso	TGYCTGGAGCTGYTTRATGCCCCAGAC	7958kb
ED33S	Senso	GAGGRGAATTTTTCTAYTGAA	7360kb
SCDOS	Senso	TTGAACCAYTAGGARTAGCACCCAC	7696kb
JH35	Anti-senso	CACTTCTCCAATTGTCCITCA	7668kb
JH38	Anti-senso	GGTGARTATCCCTKCCTAAC	8365kb
NEF3AS	Anti-senso	TTCTATAAYYCTATCTGTCCC	8717kb
NEF6AS	Anti-senso	GTCATTGGTCTTAAAGGYAC	9035kb

\* HXB2- sequência de referência do subtipo B do HIV-1.

### 3.5. Análise, edição das sequências e determinação dos subtipos virais

As sequências correspondentes às regiões de estudo foram editadas utilizando o software SeqMan do programa DNASTAR Lasergene 11.0. Posteriormente, as sequências consenso de cada amostra foram alinhadas no programa MEGA 7.0, juntamente com sequências de referência correspondentes aos diferentes subtipos de HIV-1 obtidas do banco de dados de Los Alamos (<http://hiv.lanl.gov>). A análise filogenética com o método de distância de agrupamentos de vizinhos (Neighbor-Joining) e o modelo de substituição Tamura-Nei foram utilizados para a determinação dos subtipos de HIV-1 no mesmo programa. Para a detecção de possíveis recombinações, usamos a análise de *bootscan* do programa Simplot 3.5.1.

### 3.6. Predição genotípica dos correceptores CCR5 e/ou CXCR4

A predição do uso do correceptor foi realizada com base na sequência de aminoácidos da região V3 da gp120 do envelope viral utilizando a plataforma Geno2pheno [correceptor], com falso positivo igual a 10%, conforme as Orientações Europeias de Testes de Tropismo.

### 3.7. Análise das regiões Vpr e Tat

No programa Mega 7.0 foi feito o alinhamento e tradução das sequências para a análise das posições quanto ao uso diferencial do correceptor entre cepas X4 e R5 no subtipo B pandêmico..

Para compor a análise e aumentar o espaço amostral, realizamos a busca de sequências no *database* de Los Alamos. Foram incluídas todas as sequências brasileiras, de subtipos puros B e F1, totalizando 249 sequências B e 25 sequências F1. Foi realizado o alinhamento das mesmas no programa MEGA 7.0, do qual foram retiradas as sequências com muitos códons de parada (sequências defectivas) ou indeterminações (dificultando a análise de algumas posições que poderiam ser relevantes). A árvore filogenética foi gerada para a confirmação dos subtipos e verificação de possíveis sequências do mesmo paciente, que quando encontradas, foram excluídas para que apenas uma sequência por indivíduo fosse utilizada. As amostras B<sub>BR</sub> foram reconhecidas a partir do motivo GWGR no alinhamento de aminoácidos. As sequências obtidas de bancos de dados, juntamente com as sequências geradas neste trabalho, foram submetidas ao Geno2Pheno como descrito no item 5.6 e divididas em diferentes alinhamentos de acordo com os genes *vif*, *tat1*, *tat2*, *vpr*, *vpu*, *rev1* e *rev2*, o subtipo e tropismo. Uma vez realizado o alinhamento e a separação por gene, obtivemos 42 alinhamentos (sete genes X seis grupos -B<sub>PAN</sub>, B<sub>BR</sub> e sub-subtipo F1 divididos em R5 e não-R5).

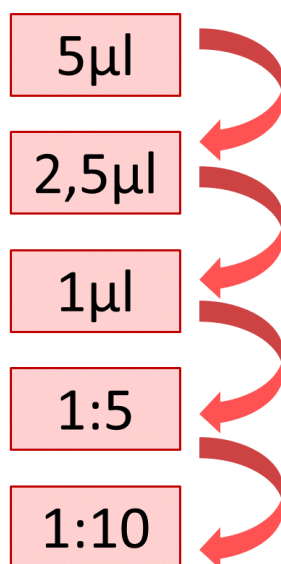
Os alinhamentos foram, então, traduzidos para aminoácidos com a utilização do Mega 7.0. A partir dessa tradução, foi obtida a sequência consenso de aminoácidos para cada um dos 42 alinhamentos a partir do programa Geneious, considerando o valor de 0.90 de identidade para determinar o aminoácido consenso de cada posição. Por fim, as sequências consenso para cada grupo foram alinhadas e comparadas, à procura de posições que apresentaram diferença entre os grupos R5 e os grupos X4 nos distintos subtipos/variantes.

Para o Vpr inspecionamos na sequência consenso as posições 37 e 41 (Antell et al.,2017) e com relação ao gene Tat analisamos as posições 7, 23, 57, 60 (Antell et al., 2016), além de buscar por quaisquer outras posições que

apresentassem relevância. Para os demais genes, analisamos as sequências consenso, inspecionando se há alguma assinatura.

### 3.8. Diluição limite

A diluição limite foi realizada para as amostras que apresentaram presença de mais de uma quasiespécie, resultando em problemas na leitura da sequência. Foram utilizadas as seguintes estratégias até a obtenção da sequência pura: após problemas com o resultado do PCR com 5  $\mu\text{L}$  de amostra, repetimos com 2,5  $\mu\text{L}$ ; em ocorrendo novamente o problema, utilizamos 1  $\mu\text{L}$ ; depois a diluição da amostra em 1:5 e, por fim, 1:10 (figura 13).



**Figura 13. Esquema representativo da estratégia de diluição limite.** As setas demonstram a ordem das repetições da reação de PCR, gradativamente diluindo a amostra a cada tentativa, a fim de obter a sequência pura.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Subtipagem das amostras com base na região C2V3 do envelope viral

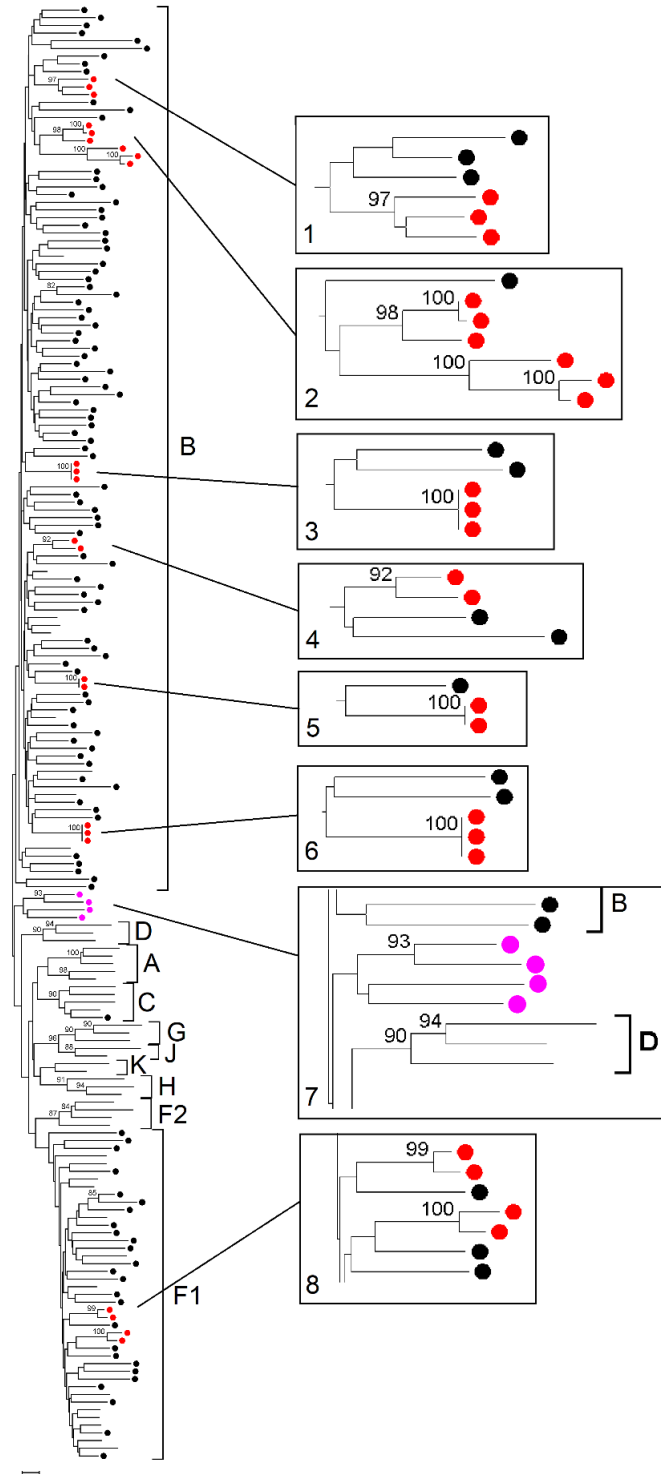
Foram submetidas à amplificação por *nested* PCR da região C2V3 159 amostras, previamente classificadas em *pol* como sendo pertencentes ao subtipo B (n=124) e ao sub-subtipo F1 (n=35). Destas, 153 amostras foram positivas e submetidas à reação de sequenciamento, no entanto, apenas 141 foram sequenciadas com sucesso e submetidas a análise filogenética do envelope (tabela 2).

**Tabela 2. Amostras amplificadas e sequenciadas na região C2V3 de acordo com o subtipo da região *pol***

<b>Classificação <i>pol</i></b>	<b>Análise da região C2V3</b>		
	Amostras submetidas à amplificação	Amostras amplificadas com sucesso	Amostras sequenciadas com sucesso
<b>B</b>	124	118	106
<b>F1</b>	35	35	35
<b>Total</b>	159	153	141

A partir do alinhamento das 141 seqüências geradas neste estudo em conjunto com seqüências de referência dos distintos subtipos, foi construída a árvore filogenética (figura 14).





**Figura 14. Análise filogenética preliminar da região C2V3 do envelope viral (~564bp, posição 6817-7381 relativa ao HXB2) das sequências de HIV-1.** As 141 amostras geradas neste trabalho estão marcadas com círculos. As sequências que apresentaram baixa distância genética com outras analisadas ou que se agruparam com alto valor de *bootstrap*, foram analisadas quanto ao vínculo epidemiológico ou quanto a serem distintas visitas do mesmo paciente e estão destacadas com círculos vermelhos. As sequências que se agruparam em ramos separados (círculo rosa) foram investigadas quanto a probabilidade de recombinação. As demais sequências estão marcadas com círculos pretos. Os ramos das sequências sob investigação estão ampliados e numerados. A análise filogenética foi realizada pelo método de *Neighbor-Joining* e modelo de substituição Tamura Nei. Valores de *bootstrap* para 1000 réplicas acima de 80 estão mostrados nos ramos.

O conjunto de sequências que demonstraram baixa distância genética entre si na árvore foram investigadas, assim como aquelas que se agruparam com alto valor de *bootstrap* e uma distância genética maior em relação as anteriormente descritas. Quando as amostras se mostraram epidemiologicamente relacionadas (mãe e filho; cônjuges; parceiros) ou amostras de diferentes visitas do mesmo paciente, selecionamos apenas uma delas para prosseguir com as análises. Assim, foram investigados os seguintes ramos (figura 14):

1. Sequências investigadas agrupadas com alto valor de *bootstrap*, apesar da distância genética entre estas; como não apresentaram relação epidemiológica, ambas foram mantidas;

2. Sequências investigadas pela baixa distância genética e alto *bootstrap*: no cluster superior, as amostras com valor de *bootstrap* 100 revelaram ser do mesmo paciente, então uma delas foi excluída; no cluster inferior as amostras do ramo mais interno com valor de *bootstrap* 100 revelaram ser do mesmo paciente, e uma delas foi excluída;

3. Sequências investigadas pela baixa distância genética: as três amostras com valor de *bootstrap* 100 revelaram ser do mesmo paciente, duas delas foram excluídas;

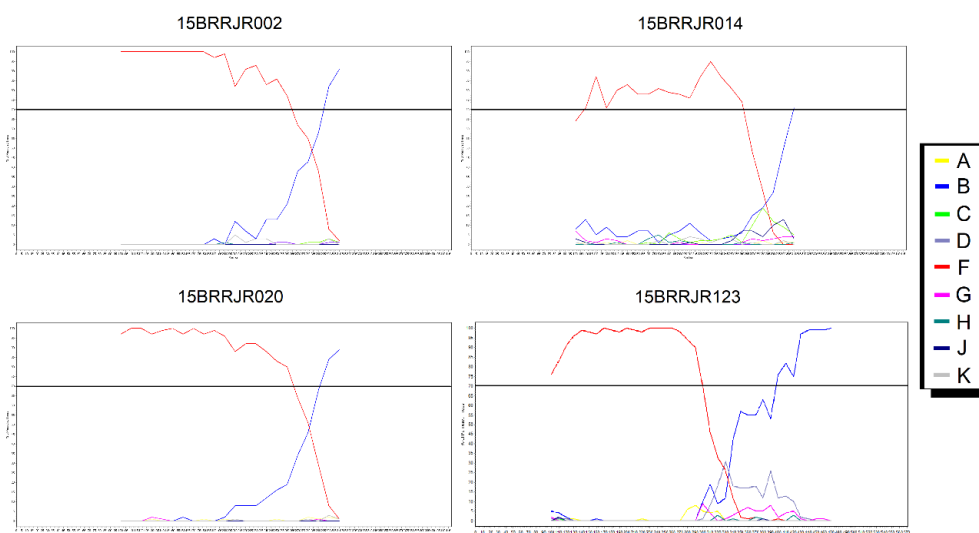
4. Sequências agrupadas com alto valor de *bootstrap* de 92, apesar de não tão curta a distância, foram investigadas por possível relação epidemiológica. Visto que não apresentaram relação epidemiológica, foram mantidas;

5. Sequências investigadas pela baixa distância genética e alto *bootstrap* 100, estas revelaram ser do mesmo paciente, portanto, uma delas foi excluída;

6. Sequências investigadas pela baixa distância genética e alto *bootstrap* (100): as três amostras revelaram serem do mesmo paciente, duas delas foram excluídas;

8. Sequências investigadas pela baixa distância genética e alto *bootstrap*. No cluster superior, as sequências com valor de *bootstrap* 99 revelaram ser do mesmo paciente, então uma delas foi excluída; no cluster inferior as sequências com valor de *bootstrap* 100 revelaram ser do mesmo paciente, e uma delas foi excluída.

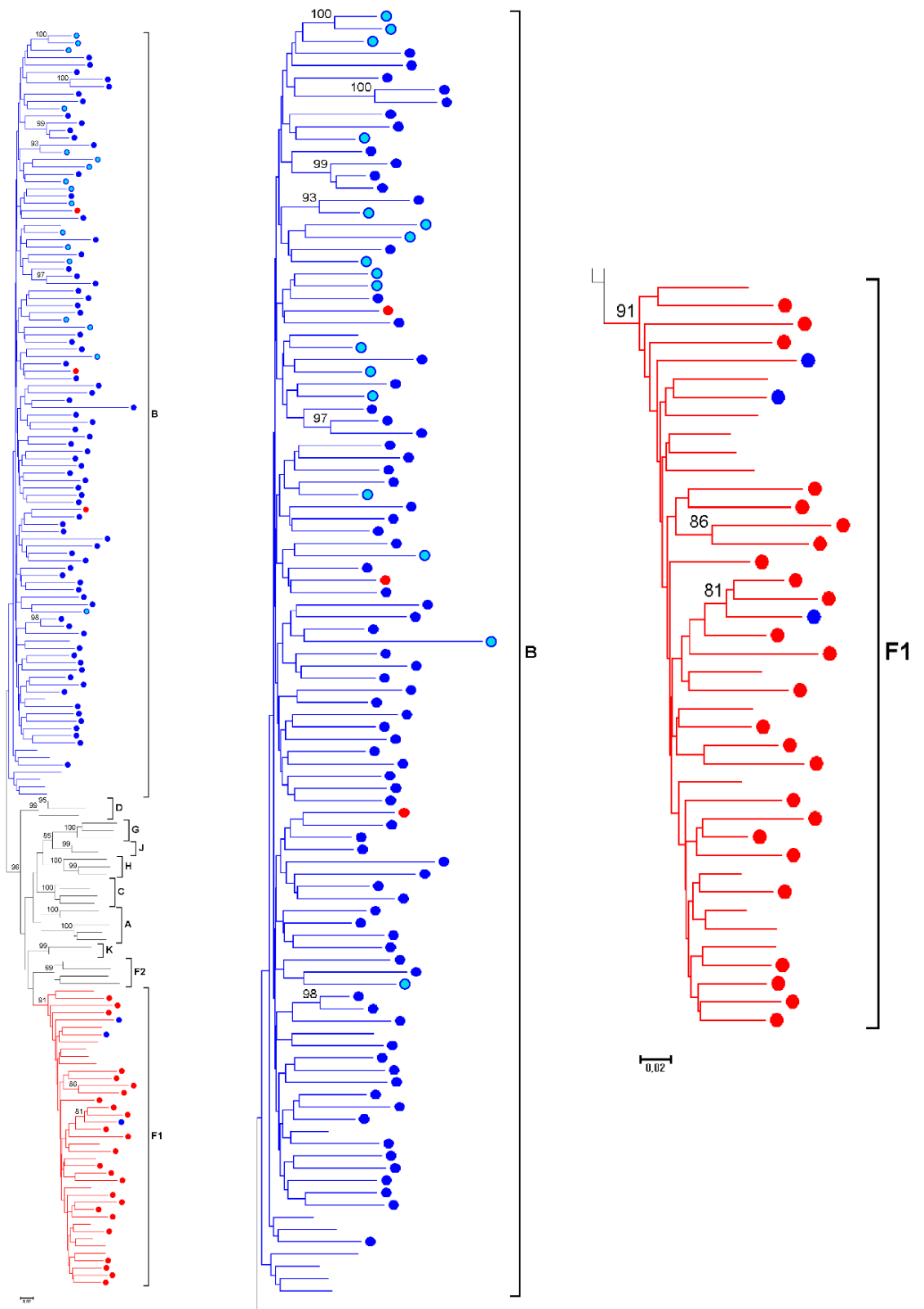
As sequências que se agruparam em ramo à parte dos subtipos foram investigadas quanto possibilidade de recombinação (figura 14, ramo 7). Através da análise de *Bootscan*, as quatro sequências (15BRRJR002, 15BRRJR014, 15BRRJR020 e 15BRRJR123) foram identificadas como recombinantes intragênicas BF<sub>env</sub>, e excluídas das análises posteriores (figura 15).



**Figura 15. Análise de Bootscan para detecção de possível evento de recombinação na região C2V3 do envelope viral do HIV-1 de sequências que se agruparam em ramo a parte na árvore filogenética.** As linhas coloridas representam o grau de similaridade com cada um dos subtipos conforme as cores da legenda. O *cutoff* de 70% das árvores permutadas está marcado com uma linha preta. Todas as quatro amostras apresentaram indícios de recombinação entre os subtipos B (azul) e F (vermelho).

Com isso, foram excluídas no total 17 sequências, sendo uma sequência previamente classificada como F1 e que foi caracterizada como subtipo C no envelope, uma vez que análises do subtipo C não seriam realizadas. Quatro por apresentarem recombinação intragênica BF<sub>env</sub> e 12 por serem de visitas distintas de indivíduos analisados ou epidemiologicamente relacionadas.

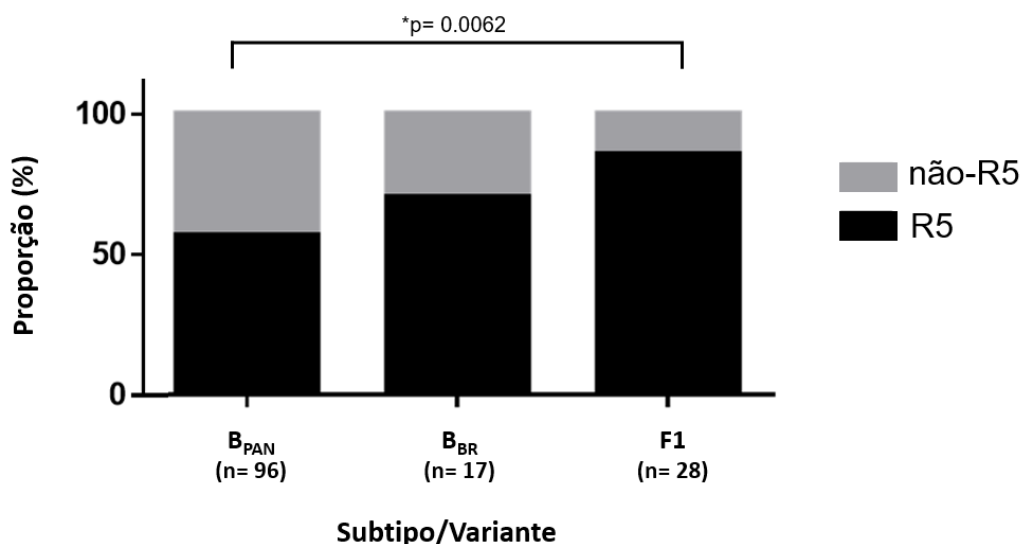
Após a exclusão dessas sequências, foram mantidas 124. A partir destas, foi gerada uma nova árvore filogenética para a região C2V3 do envelope viral (figura 16). Dessas 124 sequências, 76 foram confirmadas como B<sub>pol</sub>//B<sub>PANenv</sub>, 17 B<sub>pol</sub>//B<sub>BRenv</sub>, 3 F1<sub>pol</sub>//B<sub>PANenv</sub>, 25 F1<sub>pol</sub>//F1<sub>env</sub>, e 3 B<sub>pol</sub>//F1<sub>env</sub>. Desse modo, totalizando 79 amostras B<sub>PANenv</sub>, 17 amostras B<sub>BRenv</sub> e 28 amostras F1<sub>env</sub> (figura 16). As amostras B<sub>BR</sub> se agruparam em ramos distintos, sendo sua classificação realizada mediante a presença do motivo GWGR no alinhamento de aminoácidos (figura 16).



**Figura 16. Análise filogenética da região do envelope viral (~564bp, posição 6817-7381 relativa ao HXB2) das amostras de HIV-1.** A classificação prévia de subtipagem pela região da polimerase viral está marcada com círculos, sendo *B<sub>pol</sub>* (azul) e *F1<sub>pol</sub>* (vermelho). Os ramos B estão coloridos de azul e F1 em vermelho. Amostras classificadas como *B<sub>BR</sub>* no alinhamento estão em círculos azul-claro. A análise filogenética foi realizada pelo método de *Neighbor-Joining* e modelo de substituição Tamura-Nei. Valores de *bootstrap* para 1000 réplicas acima de 80 estão demonstrados nos ramos.

## 4.2. Análise do genotropismo de acordo com o subtipo/variante viral

As amostras, então, foram agrupadas de acordo com a classificação do subtipo do envelope e submetidas à plataforma online Geno2pheno, para a predição do tropismo através do genotropismo. Foram separadas em R5, as amostras que demonstravam possível afinidade maior com o receptor CCR5 e não R5, as amostras que demonstravam afinidade maior com o receptor CXCR4 e/ou eram duotrópicas (R5X4). Do total das 124 amostras, 81 (65,33%) se mostraram R5 trópicas, enquanto 43 (34,67%) foram não-R5 trópicas. Para o subtipo  $B_{PAN}env$ , 45 (56,96%) foram R5 trópicas e 34 (43,04%) foram não-R5. Das amostras  $B_{BR}env$ , 12 (70,58%) foram R5 e 5 (29,42%) foram não-R5 trópicas. Do total de amostras  $F1env$ , 24 (85,72%) apresentaram tropismo R5 e 4 (14,28%) foram não-R5 (figura 17). A partir desses dados foram feitas análises estatísticas de contingência, que indicaram que os achados apresentam significância ( $p= 0.0204$ ). Foram, então, comparadas as proporções de R5 e não-R5 dos grupos com o subtipo  $B_{PAN}$ . Não houve significância estatística entre a proporção de não-R5 e R5 no comparativo entre as amostras  $B_{PAN}$  e as amostras  $B_{BR}$  ( $p= 0.4161$ ). Já a proporção de não-R5 observada nas amostras  $F1$  apresentou alta significância estatística em relação àquela verificada nas amostras  $B_{PAN}$  ( $p= 0.0062$ ) (figura 17).



**Figura 17. Análise do genotropismo das amostras de acordo com o subtipo/variante.** Representação gráfica do número de amostras que apresentaram genotropismo R5 (preto) e não-R5 (cinza), conforme os subtipos ( $p= 0.0204$ ). Quando comparados os grupos entre si, não houve significância estatística entre a proporção de não-R5 e R5 no comparativo entre as amostras  $B_{PAN}$  e as amostras  $B_{BR}$  ( $p= 0.4161$ ), já com relação ao comparativo entre  $F1$  e  $B_{PAN}$ , houve alta significância estatística ( $p= 0.0062$ ). Análise de contingência realizada pelos métodos do Chi-quadrado e Teste Exato de Fisher.

### 4.3. Avaliação de assinaturas tropismo-específicas de Vif a Rev

Após a análise de genotropismo da região C2V3, foi possível classificar as amostras em seis diferentes grupos: B<sub>PAN</sub> R5; B<sub>PAN</sub> não-R5; B<sub>BR</sub> R5; B<sub>BR</sub> não-R5; F1 R5; F1 não-R5. Para as análises de possíveis assinaturas tropismo-específicas nesses genes, foram descartadas as seis amostras com subtipo discordante entre a região da polimerase e envelope, para que as análises prosseguissem somente com sequências de subtipo puro.

Foi realizado o PCR da região Vif-Rev das amostras estudadas visando obter sequências de cinco amostras de cada grupo (com exceção do grupo F1 não-R5 para o qual tínhamos detectado somente 4 amostras). De 53 amostras submetidas à amplificação, 22 foram amplificadas e seguiram para o sequenciamento. Um total de 12 amostras foram sequenciadas com sucesso, onde constatou-se que 5 apresentaram perfil recombinante neste fragmento Vif-Rev pela análise do Rega HIV-1e foram excluídas (tabela 3).

Tabela 3. Amostras amplificadas e sequenciadas na região Vif-Rev de acordo com o grupo.

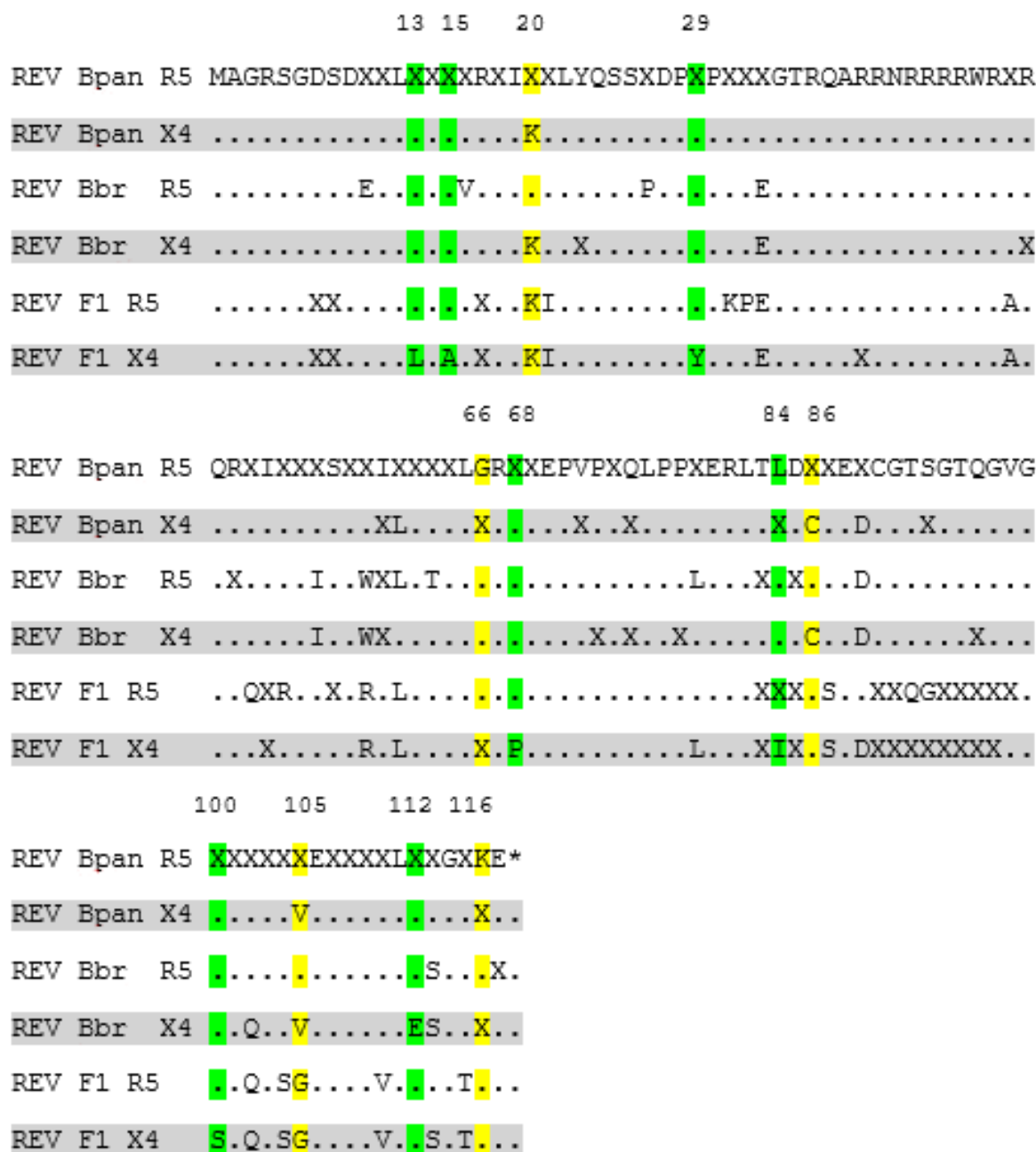
<b>Grupo</b>	<b>Amostras submetidas à amplificação</b>	<b>Amostras amplificadas com sucesso</b>	<b>Amostras sequenciadas com sucesso</b>	<b>Amostras mantidas</b>
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	7	2	0	0
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	12	4	2	1
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	10	5	5	4
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	5	3	2	1
<b>F1 R5</b>	15	4	1	0
<b>F1 não-R5</b>	4	4	2	1
<b>Total</b>	53	22	12	7

Nossas amostras foram unidas às amostras brasileiras disponíveis na plataforma de Los Alamos e separadas nos distintos grupos. Uma nova árvore foi gerada para as amostras de Los Alamos de cada subtipo, a fim de investigar se não havia amostras do mesmo paciente entre elas. Após esta análise, foram obtidas no total 126 sequências brasileiras depositadas em Los Alamos para o grupo B<sub>PAN</sub> R5; 30 sequências do grupo B<sub>PAN</sub> não-R5, somando 31 sequências com a inclusão de uma obtida neste estudo; 38 sequências de Los Alamos para o grupo B<sub>BR</sub> R5, somando 42 sequências; 10 sequências de Los Alamos B<sub>BR</sub> não-R5, somando 11 sequências; 17 sequências F1 R5 de Los Alamos; e 6 sequências de Los Alamos para o grupo F1 não-R5, somando 7 sequências.

As sequências foram alinhadas e separadas por grupo de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3 em cada um dos genes *vif*, *tat1*, *tat2*, *vpr*, *vpu*, *rev1* e *rev2*, devido às diferentes fases de leitura do HIV-1, com alguns desses genes sendo interpostos entre si. Os dois fragmentos relativos a Rev e Tat foram unidos em uma só proteína. Ao alinhar as sequências consenso dos grupos por gene, verificamos algumas assinaturas possivelmente subtipo específicas e tropismo específicas. De forma a avaliarmos estas assinaturas tropismo específicas entre os grupos, utilizamos a sequência consenso B<sub>PAN</sub> R5 como referência para destacarmos as posições que teriam possível diferença entre amostras R5 e não-R5 para um, dois ou os três subtipos investigados em verde, amarelo e azul, respectivamente (figuras 18-25). Essas posições que apresentaram destaque neste comparativo entre as sequências consenso foram investigadas quanto a frequência dos diferentes aminoácidos nas mesmas, a fim de observar as diferenças de abundância nessas posições. Em muitas posições foi possível observar uma tendência a maior abundância de um aminoácido do que outros entre os seis grupos. No entanto, nenhuma das posições apresentou diferença significativa entre os grupos R5 e não-R5 (tabelas 4 a 10).

Para a proteína REV, sete posições foram investigadas quanto ao possível impacto no uso preferencial do correceptor para pelo menos um dos subtipos (13, 15, 29, 68, 84, 100, 112) e cinco posições para dois dos subtipos (20, 66, 86, 105, 116) (figura 18).

# Rev



**Figura 18. Comparação das seqüências consenso de aminoácidos para Rev entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.** Os pontos demonstram semelhança do aminoácido com a seqüência consenso de referência B<sub>PAN</sub>. Os aminoácidos distintos entre os grupos em comparação com a seqüência consenso de referência B<sub>PAN</sub>, estão apresentados. As posições em que verificamos possível diferença entre seqüências R5 e não-R5 para pelo menos um, dois ou os três subtipos investigados foram destacados em verde, amarelo e azul, respectivamente.



Tabela 4. Abundância dos aminoácidos por posições investigadas da proteína Rev

Rev					
Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	13	15	20	29	66
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	L: 85.60%	T: 65.08%	K: 88.10%	P: 76.00%	G: 96.83%
	I: 14.40%	A: 30.16%	R: 11.90%	L: 23.20%	
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	L: 87.10%	T: 53.33%	K: 93.55%	P: 77.42%	G: 90.00%
	I: 12.90%	A: 36.67%	R: 6.45%	L: 16.13%	E: 6.67%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	L: 88.10%	T: 71.43%	K: 78.57%	P: 83.33%	G: 100%
	I: 11.90%	A: 21.43%	R: 21.43%		
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	L: 81.82%	T: 54.55%	K: 100%	P: 81.82%	G: 100%
	I: 18.18%	A: 27.27%		T: 9.09%	
<b>F1 R5</b>	L: 82.35%	A: 82.35%	K: 94.12%	Y: 70.59%	G: 100%
	I: 11.76%	I: 11.76%	N: 5.88%	P: 29.41%	
<b>F1 não-R5</b>	L: 100%	A: 100%	K: 100%	Y: 100%	G: 85.71%
<b>Geral</b>	L ≥ 81.82%	T ≥ 53.33% A ≥ 21.43%	k ≥ 78.57%	P ≥ 76.00% Y ≥ 29.41%	G ≥ 85.71%
Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	68	84	86	100	105
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	P: 68.00%	L 100.00%	C: 89.52%	S: 75.20%	V: 85.60%
	S: 28.00%		S: 7.26%	N: 8.00%	L: 7.20%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	P: 70.97%	L: 80.65%	C: 93.55%;	S: 67.74%	V: 93.55%
	S: 29.03%	I: 16.13%	S: 3.23%	N: 12.90%	G: 3.23
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	P: 78.57%	L: 97.62%	C: 78.57%;	S: 71.43%	V: 75.61%
	S: 14.29%	I: 2.38%	S: 9.52%	D: 9.52%	L: 12.20%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	P: 72.73%	L: 90.91%	C: 90.91%;	S: 72.73%	V: 90.91%
	S: 27.27%	I: 9.09%	S: 9.09%	D: 9.09%	L: 9.09%
<b>F1 R5</b>	P: 88.24%	I: 88.24%	C: 88.24%;	S: 88.24%	G: 94.12%
	L: 11.76%	L: 11.76%	N: 11.76%	N: 5.88%	V: 5.88%
<b>F1 não-R5</b>	P: 100%	I: 100%	C: 85.71%; S: 14.29%	S: 100%	G: 100%
<b>Geral</b>	P ≥ 68.00%	L ≥ 88.24% I ≥ 2.38%	C ≥ 78.57%	S ≥ 67.74%	V ≥ 75.61% G ≥ 3.23%

Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína	
	112	116
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	E: 71.43%	K: 91.20%
	D: 15.08%	E: 8.00%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	E: 74.19%	K: 90.00%
	D: 12.90%	E: 10.00%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	E: 69.23%	K: 95.12%
	D: 20.51%	
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	E: 90.91%	K: 81.82%
	G: 9.09%	R: 9.09%
<b>F1 R5</b>	E: 47.06%	K: 100%
	G: 35.29%	
<b>F1 não-R5</b>	E: 57.14%	K: 100%
	G: 42.86%	
<b>Geral</b>	E≥47.06%	K≥81.82%
	G≥35.29%	

Na linha sinalizada como geral, consideramos o valor de menor ou igual percentual detectado para o aminoácido prevalente na respectiva posição. O segundo aminoácido foi representado quando o mesmo representava um alto percentual para algum dos grupos.

Com relação a análise do gene Rev verificou-se que as posições 13, 20, 66, 68, 100 e 116 destacadas na figura 18, pela análise da tabela 4, apresentavam prevalência de um aminoácido para todos os grupos, e, portanto, devem ser desconsideradas. Já o destaque nas posições 15, 29, 84 e 105 são referentes a substituições subtipo-específicas para o subtipo F1.. Na posição 112 verificamos que o F1 não apresentava um aminoácido majoritário, e sim um alto percentual de ácido glutâmico e glicina, enquanto os demais grupos tinham a glicina como predominante. Ao avaliar a frequência de aminoácidos tropismo-específica nessas posições, nenhuma assinatura foi detectada (figura 18, tabela 4).

A análise dos consensos de aminoácidos para Tat apresentou 10 posições que teriam possível impacto no uso preferencial do correceptor para pelo menos um dos subtipos (7, 9, 36, 59, 67, 69, 81, 94, 96, 101), três posições para dois dos subtipos (42, 60, 71) e uma para os três subtipos (75) (figura 19)

# TAT

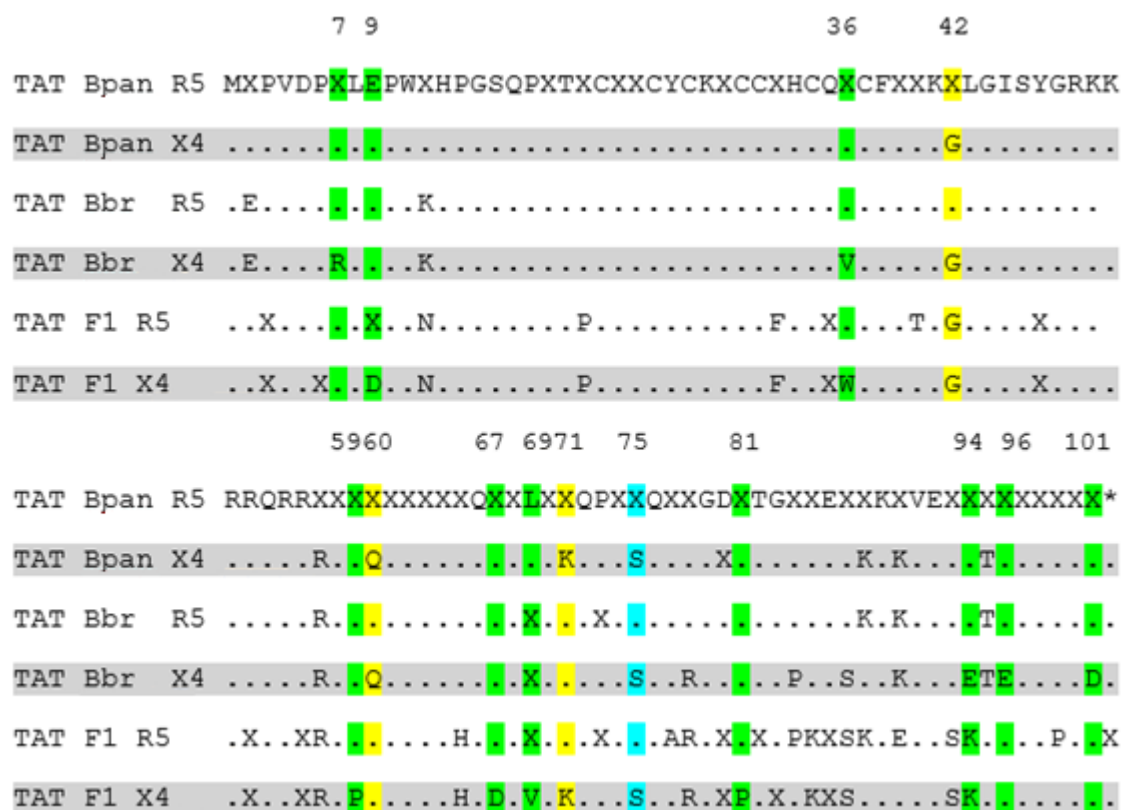


Figura 19. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Tat entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3. Os pontos demonstram semelhança com o aminoácido presente na mesma posição do B<sub>PAN</sub>. As posições que teriam possível diferença entre amostras R5 e não-R5 para pelo menos um, dois ou os três subtipos investigados foram destacados em verde, amarelo e azul, respectivamente.

Tabela 5. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Tat

Grupo	TAT				
	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	7	9	36	42	59
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	R: 80.80% S: 8.80%	E: 98.39% A: 1.61%	V: 86.18% A: 4.07%	G: 81.75% A: 18.25%	P: 73.81% H: 10.32%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	R: 83.33% K: 10.00%	E: 100%	V: 83.87% A: 6.45%	G: 100%	P: 74.19% H: 12.90%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	R: 80.49% S: 14.63%	E: 100%	V: 85.37% K: 7.32%	G: 83.33%; A: 16.67%	P: 83.33% H: 9.52%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	R: 90.91% K: 9.09%	E: 100%	V: 90.91% L: 9.09%	G: 100%	P: 70.00% H: 20.00%
<b>F1 R5</b>	<b>N: 88.24%</b> K: 11.76%	<b>D: 82.35%</b> E: 17.65%	<b>W: 88.24%</b> R: 11.76%	G: 100%	P: 70.59% H: 11.76%;
<b>F1 não-R5</b>	<b>N: 85.71%</b> K: 14.29%	<b>D: 100%</b>	<b>W: 100%</b>	G: 100%	P: 100%
<b>Geral</b>	R ≥ 80.80% N ≥ 85.71%	E ≥ 98.39% D ≥ 82.35%	V ≥ 83.87% W ≥ 88.24%	G ≥ 81.75%	P ≥ 70.00%

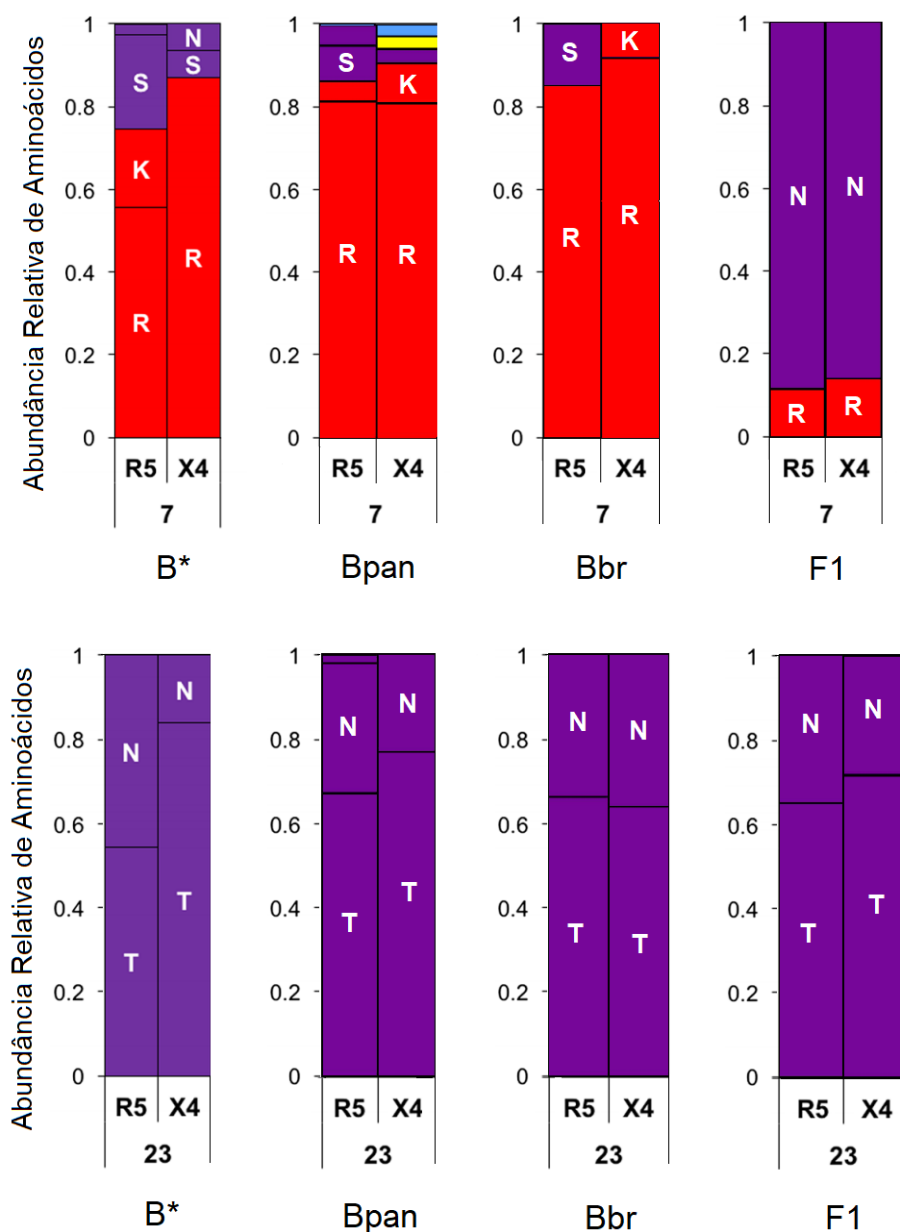
Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	60	67	69	71	75
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	Q: 76.80% P: 11.20%	V: 43.65% A: 26.19%	L: 92.86% P: 4.76%	K: 85.71% E: 11.11%	S: 86.40%; P: 5.60%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	Q: 90.32% K: 9.68%	V: 48.39% D: 22.58%	L: 93.55% P: 3.23%	K: 90.32% E: 6.45%	S: 90.32%; P: 6.45%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	Q: 64.29% K: 9.52%	V: 57.14% A: 19.05%	L: 88.10% P: 4.76%	K: 85.37% N: 7.32%	S: 88.10%; P: 7.14%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	Q: 90.91% R: 9.09%	V: 63.64% A: 27.27%	L: 72.73% P: 18.18%	K: 72.73% E: 27.27%	S: 90.91%; T: 9.09%
<b>F1 R5</b>	Q: 76.47% K: 5.88%	<b>D: 88.24%</b> H: 5.88%	<b>V: 88.24%</b> I: 11.76%	K: 88.24% E: 11.76%	S: 88.24%; P: 11.76%
<b>F1 não-R5</b>	Q: 85.71% H: 14.29%	<b>D: 100%</b>	<b>V: 100%</b>	K: 100%	S: 100%
<b>Geral</b>	Q≥64.29%	V≥43.65% D≥88.24%	L≥72.73% V≥88.24%	K≥72.73%	S≥86.40%

Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína			
	81	94	96	101
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	P: 80.16% Q: 10.32%	E: 81.60% K: 12.80%	E: 87.20% K: 5.60%	D: 50.81% H: 20.16%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	P: 80.65% Q: 12.90%	E: 80.65% K: 12.90%	E: 83.33% A: 6.67%	D: 48.39% H: 25.81%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	P: 85.71% S: 4.76%	E: 83.33% Q: 9.52%	E: 85.71% T: 4.76%	D: 83.33% A: 7.14%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	P: 81.82% Q: 18.18%	E: 90.91% K: 9.09%	E: 90.91% Q: 9.09%	D: 100%
<b>F1 R5</b>	P: 82.35% Q: 17.65%	<b>K: 100%</b>	E: 58.82% K: 29.41%	D: 70.59% A: 29.41%
<b>F1 não-R5</b>	P: 100%	<b>K: 100%</b>	K: 42.86% E: 42.86%	D: 85.71% A: 14.29%
<b>Geral</b>	P≥80.16%	E≥80.65% K≥9.09%	E≥42.86% K≥5.60%	D≥48.39%

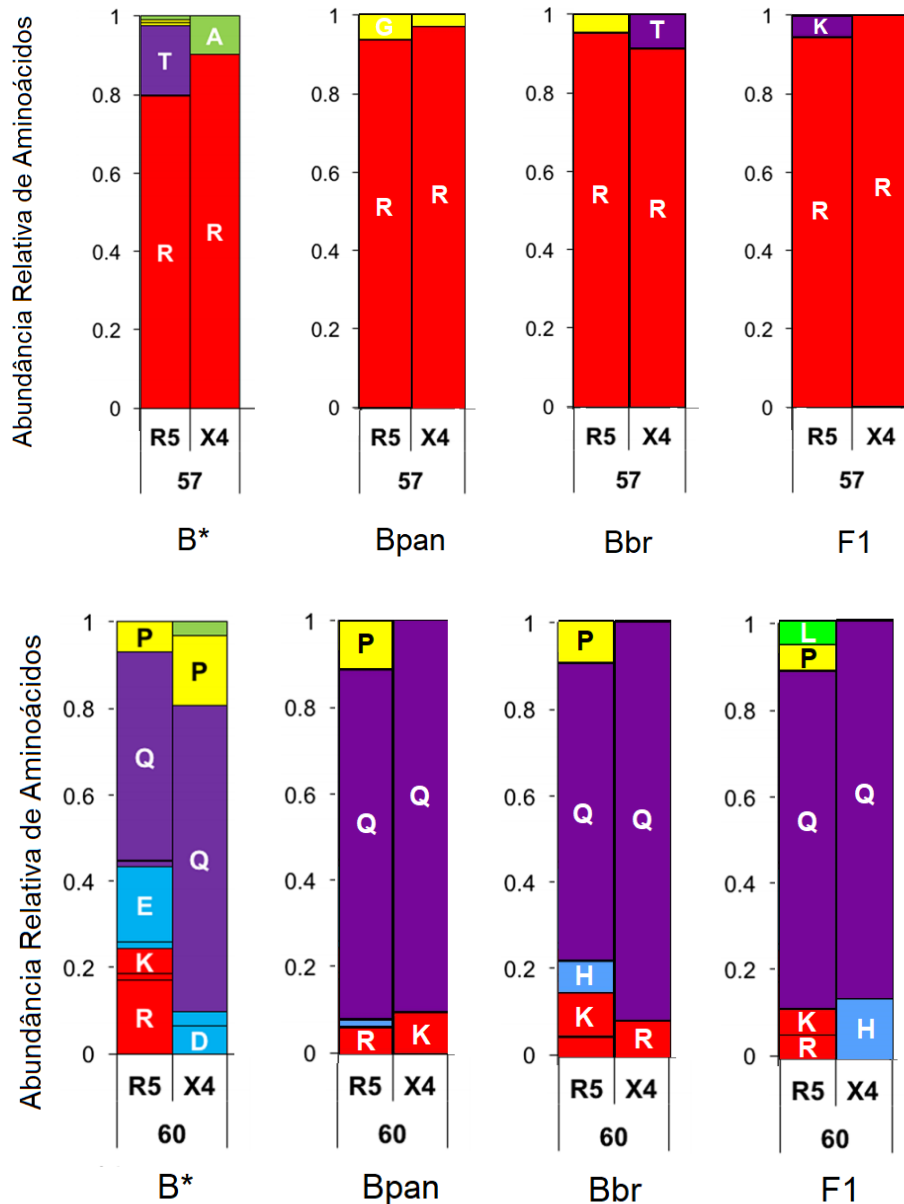
Na linha sinalizada como geral, consideramos o valor de menor ou igual percentual detectado para o aminoácido prevalente na respectiva posição. O segundo aminoácido foi representado quando o mesmo representava um alto percentual para algum dos grupos. Mutações subtipo-específicas encontram-se destacadas em vermelho.

Com relação a análise do gene Tat verificou-se que o destaque nas posições 7, 9, 36, 67, 69 e 94, são referentes a substituições subtipo-específicas do subtipo F1. Não sendo observada nenhuma substituição tropismo-específica. A partir da análise dessas posições destacadas na tabela 5, fizemos então, o comparativo entre as posições com diferenças de abundância evidenciadas por Antel et al, 2016 para os subtipos B (B<sub>PAN</sub> e B<sub>BR</sub>) e F1 brasileiros. Assim, foi observada na posição 7 leve diferença na abundância de aminoácidos que

puddesse ser associada ao tropismo entre o grupo B<sub>BR</sub> (figura 20) na posição 23 para os grupos B<sub>PAN</sub> (figura 20) e na posição 60 para os três grupos (figura 21). Já para posição 57, não observamos diferença de abundância do aminoácido serina entre os grupos R5 e não R5 (figura 21)



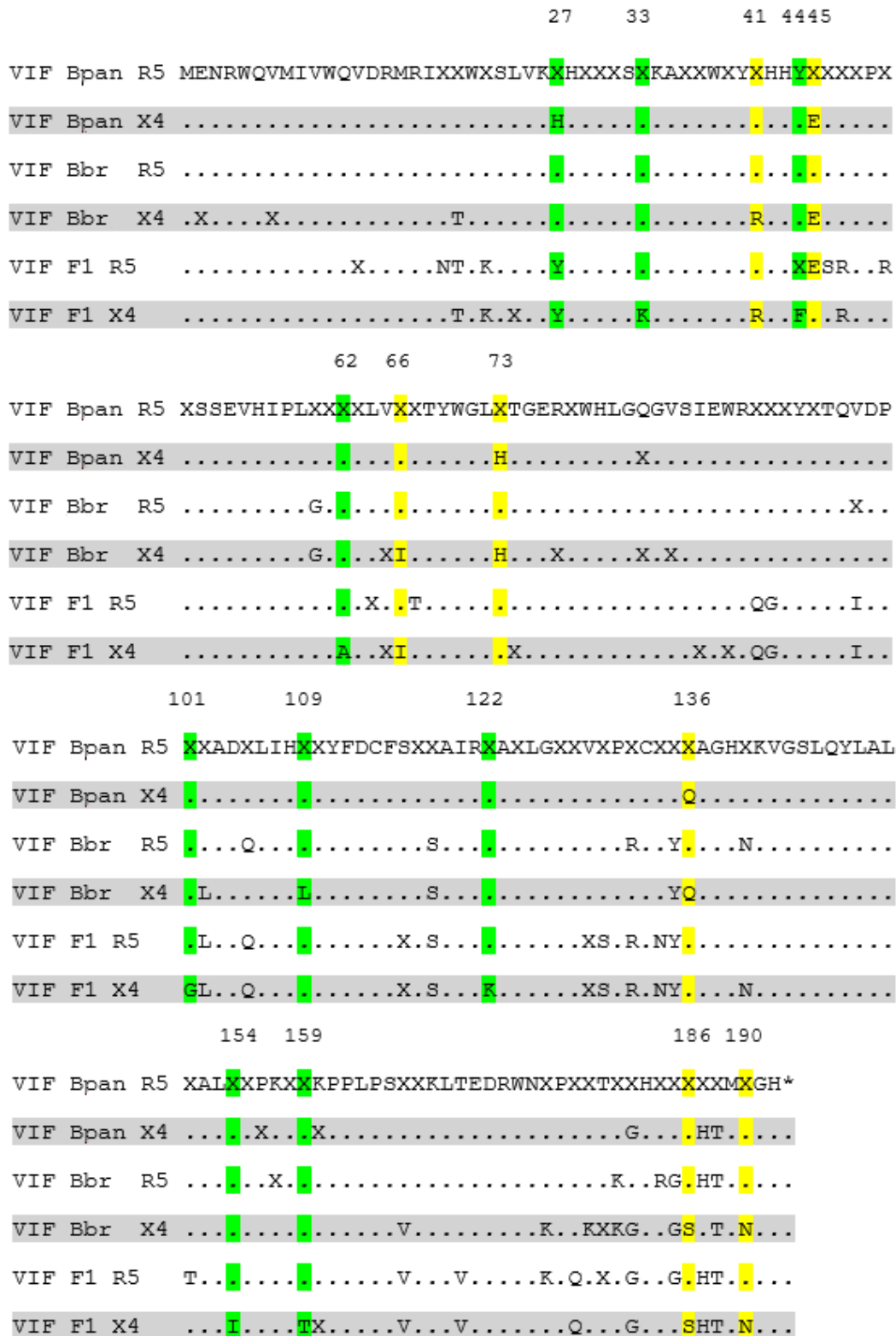
**Figura 20. Comparação da abundância dos aminoácidos nas posições 7 e 23 da proteína Tat de acordo com o subtipo/variente.** Comparação dos dados encontrados no estudo com o previamente descrito para essa posição no subtipo B (B\*). Aminoácidos foram coloridos de acordo com suas propriedades químicas como: carregados positivamente (vermelho), carregados negativamente (azul), polar não carregado (roxo), hidrofóbico (verde) e não classificados (amarelo)



**Figura 21. Comparação da abundância dos aminoácidos nas posições 57 e 60 da proteína Tat de acordo com o subtipo/variante.** Comparação dos dados encontrados no estudo com o previamente descrito para essa posição no subtipo B (B\*). Aminoácidos foram coloridos de acordo com suas propriedades químicas como: carregados positivamente (vermelho), carregados negativamente (azul), polar não carregado (roxo), hidrofóbico (verde) e não classificados (amarelo)

Ao analisar as sequências consenso da proteína Vif, nove posições indicaram possível impacto no uso preferencial do correceptor para pelo menos um dos subtipos (27, 33, 44, 62, 101, 109, 122, 154, 159) e sete posições indicaram esse possível impacto para dois dos subtipos (41, 45, 66, 73, 136, 186, 190). Todas as posições destacadas foram avaliadas quanto a frequência dos aminoácidos e geraram a tabela 6.

# VIF



**Figura 22. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Vif entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.** Os pontos demonstram semelhança com o aminoácido presente na mesma posição do B<sub>PAN</sub>. As posições que teriam possível diferença entre amostras R5 e não-R5 para pelo menos um, dois ou os três subtipos investigados foram destacados em verde, amarelo e azul, respectivamente.

Tabela 6. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Vif

<b>VIF</b>					
Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	27	33	41	44	45
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	H: 70.73% Y: 29.27%	K: 56.45% G: 23.39%	R: 74.19% K: 25.81%	Y: 96.83% F: 3.17%	E: 90.32% D: 6.45%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	H: 96.77% Y: 3.23%	K: 45.16% R: 25.81% G: 25.81%	<b>R: 90.00%</b> K: 10.00%	Y: 96.77% F: 3.23%	E: 90.32% D: 6.45%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	H: 80.95% Y: 19.05%	K: 50.00% R: 33.33%	R: 80.95% K 19.05%	Y: 100%	E: 87.80% Q: 4.88% D: 4.88%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	H: 63.64% Y: 36.36%	G: 54.55% K: 36.36%	<b>R: 90.91%</b> K: 9.09%	Y: 90.91% F: 9.09%	<b>Y: 90.91%</b> F: 9.09%
<b>F1 R5</b>	<b>Y: 100%</b>	<b>K: 88.24%</b> R: 11.76%	R: 88.24% K: 11.76%	<b>F: 70.59%</b> Y: 29.41%	E: 94.12% Q: 5.88%
<b>F1 não-R5</b>	<b>Y: 100%</b>	<b>K: 100%</b>	<b>R: 100%</b>	<b>F: 100%</b>	E: 85.71% Q: 14.29%
<b>Geral</b>	H≥63.64% Y≥3.23%	K≥45.16% G≥23.39%	R≥33.33% K≥9.09%	Y≥29.41% F≥3.17%	E≥85.71%

Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	62	66	73	101	109
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	A: 84.92% D: 5.56%	I: 51.20% V: 48.80%	H: 83.33% L: 8.73%	D: 54.03% N: 20.97%	L: 81.75% M: 8.73%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	A: 77.42% G: 9.68%	I: 64.52% V: 35.48%	H: 93.33% Q: 3.33% L: 3.33%	D: 54.84% N: 16.13% G: 16.13%	L: 80.65% M: 16.13%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	A: 90.24% D: 7.32%	V: 63.41% I: 36.59%	H: 88.10% N: 7.14%	D: 54.76%; N: 23.81%	L: 82.93% Q: 4.88% M: 4.88% I: 4.88%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	A: 81.82% S: 9.09% G: 9.09%	<b>I: 90.91%</b> V: 9.09%	H: 100%	D: 63.64% G: 27.27%	L: 90.91% M: 9.09%
<b>F1 R5</b>	A: 70.59% D: 29.41%	I: 64.71% V: 35.29%	H: 88.24% N: 5.88% L: 5.88%	<b>G: 88.24%</b> D: 11.76%	I: 70.59% R: 11.76% L: 11.76%
<b>F1 não-R5</b>	A: 100%	<b>I: 100%</b>	<b>H: 57.14%</b> <b>L: 28.57%</b>	<b>G: 100%</b>	I: 85.71% T: 14.29%
<b>Geral</b>	A≥70.59%	I≥36.59% V≥35.29%	H≥57.14%	D≥11.76% G≥16.13%	L≥11.76% I≥70.59%



<b>VIF</b>					
<b>Grupo</b>	<b>Posição do aminoácido relativa ao início da proteína</b>				
	122	136	154	159	186
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	N: 52.80%	Q: 88.00%	I: 69.84%	R: 38.71%	S: 84.80%
	K: 20.80%	P: 8.00%	V: 16.67%	I: 27.42%	N: 15.20%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	N: 64.52%	Q: 93.55%	I: 63.33%	T: 35.48%	S: 77.42%
	Q: 16.13%	T: 3.23%	L: 13.33%	R: 29.03%	N: 22.58%
	K: 16.13%	P: 3.23%			
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	N: 69.05%	Q: 85.71%	I: 82.93%	I: 40.48%	S: 73.81%
	K: 14.29%	P: 7.14%	V: 9.76%	R: 30.95%	N: 26.19%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	N: 81.82%	Q: 90.91%	I: 63.64%	I: 45.45%	S: 90.91%
	S: 9.09%	P: 9.09%	V: 27.27%	A: 18.18%	N: 9.09%
	D: 9.09%			T: 18.18%	
<b>F1 R5</b>	<b>K: 76.47%</b>	Q: 88.24%	I: 88.24%	<b>T: 88.24%</b>	S: 87.50%
	N: 11.76%	P: 11.76%	A: 5.88%	A: 11.76%	N: 12.50%
			L: 5.88%		
<b>F1 não-R5</b>	<b>K 100%</b>	Q: 71.43%	I: 100%	<b>T: 100%</b>	S: 100%
		P: 28.57%			
<b>Geral</b>	N≥11.76%	Q≥71.43%	I≥63.33%	R≥29.03%	S≥73.81%
	K≥14.29%			T≥18.18%	I≥27.42%

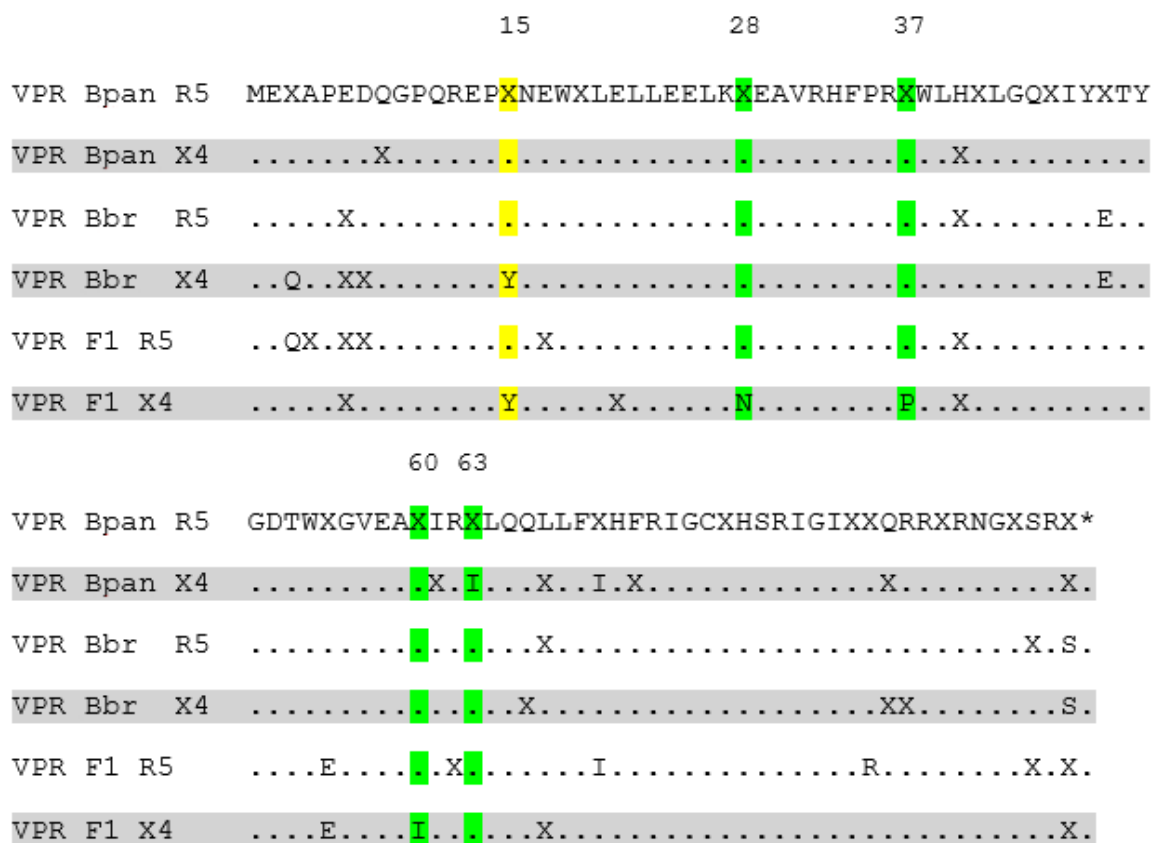
<b>Grupo</b>	<b>Posição do aminoácido relativa ao início da proteína</b>				
	190				
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	N: 79.03%				
	S: 17.74%				
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	N: 86.67%				
	S: 13.33%				
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	N: 85.71%				
	S: 7.14%				
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	N: 90.91%				
	S: 9.09%				
<b>F1 R5</b>	N: 88.24%				
	S: 5.88%				
	D: 5.88%				
<b>F1 não-R5</b>	N: 100%				
<b>Geral</b>	N≥79.03%				

Na linha sinalizada como geral, consideramos o valor de menor ou igual percentual detectado para o aminoácido prevalente na respectiva posição. O segundo aminoácido foi representado quando o mesmo representava um alto percentual para algum dos grupos. Mutações subtipo-específicas encontram-se destacadas em vermelho e tropismo específicas em azul.

Após análise da figura 22 e tabela 6, verificamos que a posição 41 apresentou uma predominância superior a 90% de arginina em todos os grupos

não-R5, enquanto este aminoácido variou de 33,33% (B<sub>BR</sub> R5) a 74,19% (B<sub>PAN</sub> R5) nos grupos R5. Já na posição 45, podemos destacar a presença majoritária 90,91% da tirosina no grupo B<sub>BR</sub> não-R5, enquanto nos demais grupos temos prevalência de ácido glutâmico em valores superiores a 85,71%. Observamos que a posição 66 apresentou uma abundância de isoleucina nos grupos B<sub>BR</sub> e F1 não-R5, enquanto para os demais grupos verificamos proporções similares de valina e isoleucina. Já na posição 73 observamos uma alta prevalência de histidina em todos os grupos, com exceção do grupo F1 não-R5 onde temos 57,14% histidina e 28,58% leucina. No entanto as posições 27, 33, 44, 101,109,122,159 mostraram ser subtipo F1 específicas.

## VPR



**Figura 23. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Vpr entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.** Os pontos demonstram semelhança com o aminoácido presente na mesma posição do B<sub>PAN</sub>. As posições que teriam possível diferença entre amostras R5 e não-R5 para pelo menos um, dois ou os três subtipos investigados foram destacados em verde, amarelo e azul, respectivamente.

Tabela 7. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Vpr

Grupo	VPR				
	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	15	28	37	60	63
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	Y: 80.00% F: 10.40%	S: 56.10% N: 23.58%	P: 44.80% V: 15.20%	I: 69.11% L: 30.89%	I: 67.74% M: 17.74%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	Y: 83.87% H: 9.68%	S: 48.39% R: 25.81%	P: 35.48% I: 16.13% V: 16.13%	I: 74.19% L: 25.81%	I: 90.32% M: 6.45%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	Y: 85.71% H: 7.14%	S: 59.52% R: 21.43%	P: 58.54% I: 12.20%	I: 59.52% L: 40.48%	I: 60.98% T: 19.51%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	Y: 100%	S: 72.73% R: 18.18%	P: 72.73% T: 18.18%	I: 72.73% L: 18.18%	I: 80.00% M: 10.00% T: 10.00%
<b>F1 R5</b>	Y: 82.35% H: 17.65%	N: 52.94% H: 23.53%	P: 88.24% A: 5.88% Q: 5.88%	I: 81.25%; L: 18.75%	I: 56.25% T: 25.00%
<b>F1 não-R5</b>	Y: 100%	N: 100%	P: 100%	I: 100%	I: 85.71% M: 14.29%
<b>Geral</b>	Y≥80.00%	S≥48.39% N≥23.58%	P≥35.48%	I≥59.52%	I≥56.25%

Na linha sinalizada como geral, consideramos o valor de menor ou igual percentual detectado para o aminoácido prevalente na respectiva posição. O segundo aminoácido foi representado quando o mesmo representava um alto percentual para algum dos grupos. Mutações subtipo-específicas encontram-se destacadas em vermelho e tropismo específicas em azul.

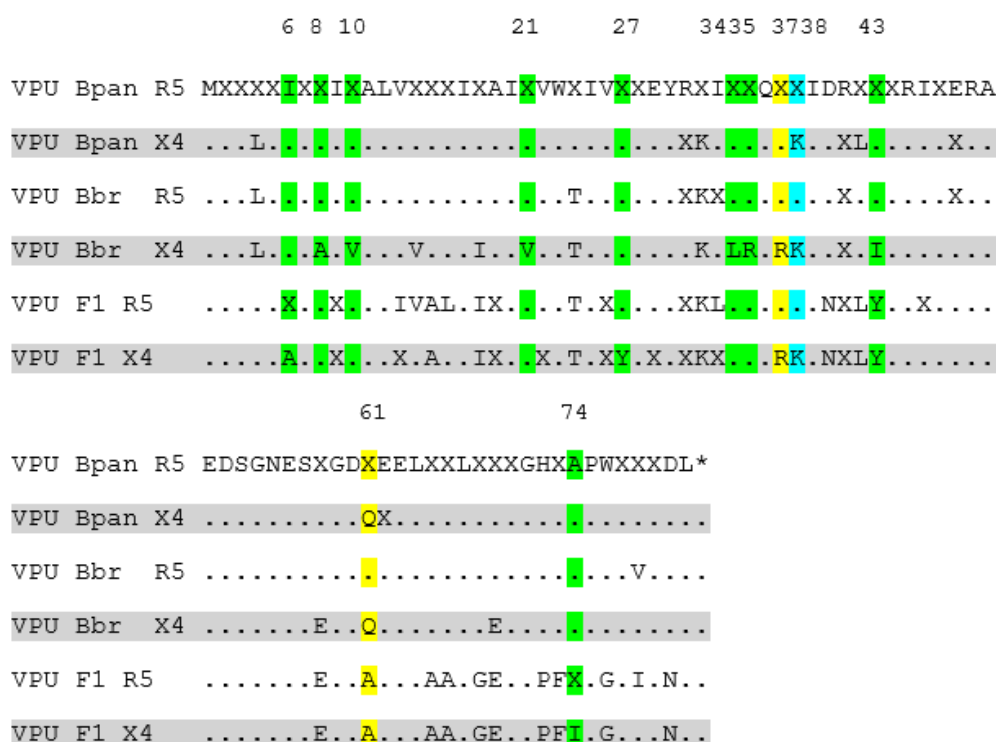
Para Vpr, a análise conjunta da figura 23 e tabela 7 podemos verificar que a posição 28 representa uma posição subtipo-específica para o grupo F1. Enquanto na posição 37 foi possível verificar a abundância maior de prolina nos grupos B<sub>BR</sub> e F1, sendo esta ainda majoritária em ambos os grupos não-R5. A fim de compararmos as posições previamente descritas por Antel e cols.(2017) entre os grupos estudados, geramos o logo da figura 24. Verificamos que as posições 36, 41 e 96 não apresentaram diferença relacionada ao tropismo em nenhum dos grupos. A posição 89 não demonstrou nenhuma relação com o tropismo nos grupos, no entanto apresentou indício de subtipo-especificidade para o subtipo F1, com valina como aminoácido majoritário, enquanto para os grupos do subtipo B, alanina foi o aminoácido majoritário (figura 23).



**Figura 24.** Comparação da abundância em logo dos aminoácidos nas posições 36, 37, 41, 89 e 96 da proteína Vpr de acordo com o subtipo/variante. Comparação dos dados encontrados no presente estudo com o previamente descrito para essas posições no subtipo B (Antel et al, 2017).

Para a proteína Vpu, nove posições indicaram diferença entre as amostras R5 e X4 em um dos subtipos (6, 8, 10, 21, 27, 34, 35, 43, 74) duas entre dois subtipos (37, 61) e uma entre os três subtipos (38) (figura 25). A posição 6 apresentou uma alta variabilidade entre os grupos, sendo a isoleucina predominante no subtipo B<sub>PAN</sub> e no grupo B<sub>BR</sub> não-R5. Enquanto no grupo B<sub>BR</sub> R5 apresenta predominantemente a tirosina e a alanina é uma assinatura do sub-subtipo F1. As posições 8, 27, 34, 43, 61 e 74 representam posições subtipo-específicas para o grupo F1. Já na posição 35 pudemos associar a troca da arginina, presente em todos os grupos com exceção do F1 não-R5, com a troca do tropismo neste sub-subtipo em amostras brasileiras.

# VPU



**Figura 25. Comparação das sequências consenso de aminoácidos para Vpu entre os grupos de acordo com subtipo e tropismo na região C2V3.** Os pontos demonstram semelhança com o aminoácido presente na mesma posição do B<sub>PAN</sub>. As posições que teriam possível diferença entre amostras R5 e não-R5 para pelo menos um, dois ou os três subtipos investigados foram destacados em verde, amarelo e azul, respectivamente.

**Tabela 8. Abundância dos aminoácidos nas posições investigadas da proteína Vpu**

VPU					
Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	6	8	10	21	27
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	I: 92.86%	A: 81.60%	V: 73.81%	V: 84.80%	L: 50.00%
	V: 3.97%	S: 13.60%	A: 20.63%	I: 12.80%	F: 25.00%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	I: 90.32%	A: 58.06%	V: 74.19%	V: 87.10%	L: 54.84%
	V: 9.68%	S: 32.26%	A: 22.58%	A: 6.45%	F: 25.81%
				I: 6.45%	
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	Y: 85.71%	A: 82.93%	V: 80.95%	V: 70.73%	L: 43.59%
	H: 7.14%	S: 12.20%	A: 14.29%	I: 21.95%	F: 33.33%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	I: 100%	A: 90.91%	V: 90.91%	V: 90.91%	L: 54.55%
		S: 9.09%	A: 9.09%	A: 9.09%	I: 27.27%
<b>F1 R5</b>	A: 87.50%	S: 64.71%	T: 17.65%	V: 82.35%	Y: 76.47%
	V: 12.50%	G: 35.29%	I: 17.65%	I: 17.65%	F: 17.65%
			V: 17.65%		
<b>F1 não-R5</b>	A: 100%	S: 85.71%	A: 57.14%	V: 57.14%	Y: 100%
		G: 14.29%	V: 28.57%	I: 42.86%	
<b>Geral</b>	-	A≥58.06%	V≥17.65%	V≥57.14%	L≥43.59%
		S≥9.09%	A≥314.29%		Y≥76.47%

VPU					
Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína				
	34	35	37	38	43
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	L: 89.68% V: 5.56%	R: 85.71% K: 13.49%	R: 87.30% K: 12.70%	K: 87.30% R: 11.90%	I: 85.71% L: 14.29%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	L: 83.87% V: 9.68%	R: 87.10% K: 12.90%	R: 90.00% K: 6.67%	K: 96.55% R: 3.45%	I: 73.33% L: 20.00%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	L: 83.33% R: 11.90%	R: 85.71% K: 14.29%	R: 85.71% K: 9.52%	K: 73.81% R: 23.81%	I: 85.37% L: 14.63%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	L: 100%	R: 90.91%; K: 9.09%	R: 100%	K: 100%	I: 90.91% L: 9.09%
<b>F1 R5</b>	V: 76.47% L: 17.65%	R: 88.24% K: 11.76%	R: 82.35% N: 17.65%	K: 82.35% R: 17.65%	Y: 100%
<b>F1 não-R5</b>	V: 85.71% L: 14.29%	S: 85.71% G: 14.29%	R: 100%	K: 100%	Y: 100%
<b>Geral</b>	L≥14.29% V≥5.56%	R≥85.71% S≥9.09%	R≥82.35%	K≥73.81%	I≥73.33% Y≥100%

Grupo	Posição do aminoácido relativa ao início da proteína	
	61	74
<b>B<sub>PAN</sub> R5</b>	Q: 89.60% E: 7.20%	A: 93.65% V: 5.56%
<b>B<sub>PAN</sub> não-R5</b>	Q: 93.55% H: 6.45%	A: 100%
<b>B<sub>BR</sub> R5</b>	Q: 80.95% H: 11.90%	A: 97.62% I: 2.38%
<b>B<sub>BR</sub> não-R5</b>	Q: 90.91% R: 9.09%	A: 100%
<b>F1 R5</b>	A: 94.12% V: 5.88%	I: 76.47% L: 17.65%
<b>F1 não-R5</b>	A: 100%	I: 100%
<b>Geral</b>	Q≥80.95% A≥94.12%	A≥93.65% I≥76.47%

Na linha sinalizada como geral, consideramos o valor de menor ou igual percentual detectado para o aminoácido prevalente na respectiva posição. O segundo aminoácido foi representado quando o mesmo representava um alto percentual para algum dos grupos. Mutações subtipo-específicas encontram-se destacadas em vermelho e tropismo específicas em azul.

Após as análises das proteínas estudadas, de acordo com os grupos B<sub>PAN</sub>, B<sub>BR</sub> e F1, compilamos os resultados referentes às posições possivelmente associadas ao tropismo na tabela 9. Como pode ser verificado, a maioria das posições representam aquelas que apresentam diferença na abundância do aminoácido majoritário, ou seja, variação na conservação entre os grupos R5 e não-R5. As posições destacadas em vermelho representam aquelas em que houve troca do aminoácido majoritário.

**Tabela 9. Posições associadas ao tropismo em cada grupo estudado de acordo com a proteína.**

Grupo	Proteína estudada				
	Rev	Tat	Vif	Vpr	Vpu
B <sub>PAN</sub>	-	23, 57, 60	41	-	-
B <sub>BR</sub>	-	7, 60, 101	41, <b>45</b> , 66	37	<b>6</b>
F1	-	7, 23, 57, 60, 101	41, 66, 73	37	<b>35</b>

\*as posições destacadas em vermelho representam aquelas em que houve troca de aminoácido, nas demais houve conservação maior do aminoácido majoritário.

## 5. DISCUSSÃO

O HIV apresenta classificação complexa, devido à alta variabilidade genética decorrente da ausência de atividade de reparo da transcriptase reversa, alta taxa de replicação e de eventos de recombinação, que leva a diversos impactos na sua progressão e patogênese (Roberts et al., 1988; Zhang et al., 2010). No início da infecção, tem sido verificado o uso preferencial do HIV pelo correceptor CCR5 para entrada na célula hospedeira, e no decorrer da progressão para aids, em torno de 40% dos vírus do subtipo B passam a utilizar o correceptor CXCR4. A mudança de tropismo está geralmente associada ao aumento da carga viral, diminuição de células TCD4 levando assim, a uma

progressão rápida para a aids (Berger et al. 1999; Brummer et al., 2005; Thielen et al., 2010). Contudo, tem sido evidenciado o uso diferenciado destes correceptores de acordo com o subtipo viral. O subtipo C, bastante estudado, parece apresentar majoritariamente o tropismo pelo correceptor CCR5 ao longo da infecção (Cilliers et al., 2003, Coetzer et al., 2011). Já os indivíduos infectados por vírus do subtipo D apresentam mais rápida evolução para aids e para a troca do correceptor quando comparado aos outros subtipos, neste também há uma presença mais acentuada de variantes CXR4 logo no início da infecção (Korber et al., 1994; Kaleebu et al., 2007). Sendo o tema controverso para a variante B<sub>BR</sub> do subtipo B, que já foi descrita como exclusivamente R5 (Leal et al., 2008), mas também foram encontradas variantes X4 no início da infecção (Sucupira et al., 2012) e temos carência de informação para o sub-subtipo F1. (Kaleebu et al., 2007; Cilliers et al., 2003, Leal et al., 2008; Coetzer et al., 2011; Sucupira et al., 2012). Diversos ensaios genotípicos já foram desenvolvidos para determinação do uso do correceptor de entrada pelo HIV-1 e estes se baseiam na sequência da alça V3 da gp120 do envelope viral. No entanto, tem sido descrito o envolvimento de outras regiões genômicas além da alça V3 na escolha do correceptor, como as regiões V1/V2 e C4 da gp120 (Labrosse et al., 2001, Santos-Costa et al, 2014, Suphaphiphat et al, 2007) e mais recentemente do Tat, LTR e Vpr (Antell et al, 2016, 2017). Estes achados sugerem que a evolução de HIV-1 R5 para X4 requer adaptação a nível de controle transcripcional em adição à ligação do correceptor e entrada na célula (Antel et al., 2016). Assim, nos propomos a estudar indivíduos HIV-1 num estágio mais avançado da infecção (fase crônica) e infectados pelos subtipos B (variante pandêmica e variante B<sub>BR</sub>) e F1, de grande relevância na epidemia brasileira, e pouco estudados e, nestes verificar o percentual de uso dos correceptores CCR5 e CXCR4. E, ainda, avaliar a influência de assinaturas descritas nos genes Tat e Vpr, bem como possíveis assinaturas nos demais genes acessórios *vif*, *vpr*, *vpu* e *rev* no uso preferencial do correceptor.

Inicialmente, havíamos proposto realizar amplificação do fragmento completo contendo de Vif a Rev. Porém, enfrentamos grande dificuldade de amplificação da região. Optamos, então, por classificar as amostras primeiramente pela região C2V3, quanto ao subtipo e tropismo, em protocolo já bem padronizado no laboratório e, a partir dessa classificação prévia, selecionar



as amostras para seguir com a amplificação do fragmento Vif-Rev para a análise das assinaturas. A análise das sequências geradas na região do envelope viral apresentou dificuldade devido a presença de distintas quasiespécies, com algumas apresentando inserções ou deleções de nucleotídeos diferentes entre si num único eletroferograma, tornando a interpretação deste ambígua e/ou ilegível. Isso provavelmente se deve ao fato de que os pacientes do estudo estão em fase avançada da infecção e, uma vez que a diversidade viral aumenta durante o curso da infecção, já era esperado que esses apresentassem mais quasiespécies. As sequências B<sub>BR</sub> se agruparam em ramos distintos, conforme esperado, sendo classificadas a partir da presença do motivo GWGR observado no alinhamento. No espaço amostral de 106 amostras sequenciadas do subtipo B, esperávamos obter as 30 amostras B<sub>BR</sub> que pretendíamos analisar originalmente, considerando que dados da literatura mostram a presença de ao menos 37% dessa variante no conjunto de amostras do subtipo B (Morgado et al., 1996; Machado et al., 2009; Veras et al., 2007; Junqueira, 2013). No entanto, as 17 amostras B<sub>BR</sub> obtidas correspondem a apenas 16,03% das amostras do subtipo B avaliadas. Isso pode ser um indicativo de que ao longo da progressão para doença, o motivo GWGR sofre substituição por outros, conforme descrito por Diaz e colaboradores (Diaz et al., 2008), uma vez que os pacientes avaliados se tratavam de pacientes em falha terapêutica coletados em 2015, e portanto podemos inferir que estavam em fase crônica .

A análise filogenética da região do envelope viral das amostras previamente classificadas pela região da polimerase revelou que quatro amostras se tratavam de recombinantes intragênicas BF<sub>env</sub>, uma amostra recombinante intergênica F1<sub>pol</sub>/C<sub>env</sub>, seis amostras eram recombinantes intergênicas, sendo três F1<sub>pol</sub>/B<sub>env</sub> e três B<sub>pol</sub>/F1<sub>env</sub> (figura 15). Esses achados corroboram os dados da literatura, que demonstram o aumento das formas recombinantes na epidemia brasileira, bem como os estudos que pressupõem a ocorrência de uma provável superestimação do sub-subtipo F1, quando analisados em mais de uma região genômica, se tratando de formas recombinantes únicas ou circulantes BF1 (Sanabani 2009, 2011;Guimarães et al., 2012; Marques et al., 2018). Além disso, reforçam a importância da subtipagem realizada para a região genômica, foco de estudo, uma vez que a classificação pela polimerase, nem de qualquer outra região pode ser

extrapolada para o restante do genoma. Para as análises de tropismo por subtipo de acordo com a região do envelope, as amostras recombinantes intergênicas BF1 foram mantidas e o subtipo na região C2V3 foi o considerado.

A análise do genotropismo realizada através de algoritmo mostrou que 34,67% das sequências puderam ser classificadas como não-R5 trópicas. Para o subtipo B<sub>PAN</sub>, 43,04% das sequências revelaram tropismo não-R5, resultados concordantes com a literatura, que aponta para 40% de troca de R5 para não-R5 ao longo da evolução para doença (Berger et al., 1999; Brummer et al., 2005). Para as amostras B<sub>BR</sub>, foi observada uma leve redução na proporção de amostras não-R5 trópicas, com detecção de 29,42%, sendo esta não significativa estatisticamente ( $p=0.4161$ ). Este resultado difere de achado prévio da literatura de que essa variante não apresenta amostras não-R5 (Leal et al., 2008). No entanto, este corrobora o achado de que 23% dos indivíduos B<sub>BR</sub> recém infectados apresentavam tropismo não-R5 em contraste com os 13% detectados em B<sub>PAN</sub> (Sucupira et al., 2012). No entanto, análises com espaço amostral maior são necessárias para elucidar se há diferença de tropismo entre essas duas variantes do subtipo B. Para o sub-subtipo F1, foi revelada uma proporção de variante não-R5 tópicas de 14,28%, sendo esta inferior aos demais grupos e com alta significância estatística ( $p=0.0062$ ), colaborando para a elucidação dessa característica quanto ao sub-subtipo F1. Nossos dados em conjunto corroboram a hipótese de que subtipos distintos de HIV-1 podem apresentar diferentes estratégias evolutivas quanto a padrões de tropismo. Ensaios de tropismo *in vitro* seriam interessantes para corroborar os resultados de genotropismo obtidos.

Uma vez que não conseguimos trabalhar com o fragmento completo, realizamos PCR de dois fragmentos sobrepostos para cobrir a região Vif-Rev. Ainda assim, houve dificuldade maior para obtenção da sequência majoritária da região Vif-Rev, sendo necessária diluição limite para todas as amostras e de modo geral numa diluição menor do que a da região C2V3. Isso provavelmente se deve à análise de um fragmento maior, que oferece mais possibilidades de inserções e deleções, bem como à peculiaridade deste fragmento, no qual se encontram muitos genes em fases de leituras diferentes, incluindo genes interpostos. Diante destes problemas e visando a análise desta região quanto assinaturas relacionadas a troca de tropismo, foi necessária a obtenção de mais amostras brasileiras B<sub>PAN</sub>, B<sub>BR</sub> e F1 na base de dados de Los Alamos (HIV

*sequence database*). O número mais reduzido de sequências das duas últimas demonstra escassez de dados, reforçando a importância das contribuições. O comparativo das sequências consenso por gene estudado entre os subtipos e de acordo com tropismo revelou posições com assinaturas subtipo específicas e que apontavam ser tropismo-específicas.

Para a proteína Rev, doze posições foram investigadas quanto ao impacto no uso preferencial do correceptor de acordo com o subtipo. Porém não sendo possível associar nenhuma das posições ao genotropismo. As posições 76 a 84 são responsáveis pela atividade de sinalização para a exportação nuclear (Fischer et al., 1995). A posição 84 no estudo demonstrou tendência diferenciada entre subtipos, com o sub-subtipo F1 apresentando majoritariamente isoleucina, enquanto os demais grupos apresentavam como aminoácido majoritário a leucina. Trocas entre esses dois aminoácidos costumam ser mais frequentes do que outras e, por possuírem características similares, provavelmente não geram impacto na proteína.

Para a proteína Tat, 13 posições foram investigadas quanto ao possível impacto no uso preferencial do correceptor. A posição 75 apresentou diferenças entre os grupos R5 e não-R5 nos três subtipos, quando avaliados os consensos. Contudo, ao analisar a frequência dos aminoácidos na mesma, foi possível observar uma tendência a maior conservação >90% nas amostras X4, no entanto todos os grupos apresentaram a serina como aminoácido prevalente. No presente estudo não detectamos nenhuma assinatura tropismo-específica neste gene. No entanto, em Antell et al, 2016, foram detectadas as posições 7, 23, 57 e 60 como relevantes em relação à abundância de um aminoácido de acordo com o tropismo. Das quais a posição 7 apresentou maior conservação entre as sequências X4 em comparação às R5, com abundância majoritária do aminoácido arginina (R) em ambos os grupos. O mesmo padrão se repetiu para as posições 23 e 57, com tirosina (T) e R como aminoácido majoritário, respectivamente. Para a posição 60, os dois grupos demonstraram alta variabilidade, mas com o grupo X4 apresentando preferência maior para o aminoácido glutamina (Q). No nosso estudo, dessas posições previamente descritas, apenas as posições 7 e 60 indicaram nas sequências consenso uma possível divergência entre os grupos R5 e X4. No entanto, na posição 7 houve abundância ligeiramente maior de R nos grupos não-R5 para as variantes B,

concordando com o verificado no estudo de Antel. Porém, ao contrário do visto anteriormente, houve aumento na abundância de lisina nesses grupos quando comparado aos R5, e o pequeno percentual de asparagina (N) verificado por Antel é uma assinatura subtipo específica do F1. Na posição 60, houve ligeiro aumento de abundância de glutamina nos grupos não-R5. As posições 23 e 57 apresentaram como aminoácido majoritário, respectivamente, treonina (>63,64%) e arginina (>89,52%), apresentando o primeiro um ligeiro aumento deste aminoácido no B<sub>PAN</sub> e F1, mas não no B<sub>BR</sub>. Já na posição 57, apenas o F1 apresentou ligeiro aumento de arginina. As posições 1 a 48 são responsáveis pela atividade de transativação da Tat (Jeang, 1996), nenhuma das posições nesse intervalo apresentou diferença entre os grupos R5 e não-R5, apesar das posições 7, 9 e 36 apresentarem indícios de subtipo-especificidade. Além destas posições verificamos maior abundância de ácido aspártico (D) nas sequências X4 para os grupos B<sub>BR</sub> e F1, na posição 101.

Ao analisar as sequências consenso da proteína Vif, dezesseis posições foram investigadas quanto ao possível impacto no uso preferencial do correceptor. Na posição 45, houve presença majoritária de tirosina no grupo B<sub>BR</sub> (90,91%) não-R5, diferente dos demais, onde ácido glutâmico esteve presente com ao menos 85,71% de abundância. Isso indica uma possível relevância tropismo-específica para as amostras B<sub>BR</sub> nessa posição. A alta prevalência de histidina observada na posição 73 em todos os grupos, com exceção do grupo F1 não-R5, onde foi notado apenas 57,14% histidina e 28,58% leucina, demonstra outra posição de possível relevância tropismo-específica para o subtipo F1.

Diferentes papéis dos domínios da proteína Vif têm sido descritos, bem como consequências funcionais de mutações nestes (Goncalves et al., 1996; Mehle et al., 2004; Yang et al., 1996; Yang & Gabuzda, 1998). As posições 14-17, 40-47, 54-72 e 74-829 são responsáveis pela interação com os diferentes sítios da APOBEC da célula hospedeira. Nas análises destas posições, verificamos que a posição 41 apresentou predominância de arginina superior a 90% em todos os grupos não-R5, enquanto este aminoácido variou de 33,33% a 74,19% nos grupos R5, sugerindo possível marca tropismo-específica. A posição 44 demonstrou subtipo-especificidade, com os grupos B<sub>PAN</sub> e B<sub>BR</sub> apresentando tirosina como aminoácido majoritário enquanto os grupos F1

apresentando fenilalanina. Na posição 66, observamos a abundância de isoleucina nos grupos B<sub>BR</sub> e F1 não-R5, enquanto para os demais grupos verificamos proporções similares de valina e isoleucina. Somente as posições 41 e 45 levam a posição 45 leva a sugestão de possível impacto na de inibição da APOBEC relacionado ao tropismo, sendo a troca de aminoácido (E->Y) na posição 45 relacionada com a atividade de degradação da APOBEC para a variante B<sub>BR</sub> (Letko et al, 2015).

Seis posições na proteína Vpr foram analisadas quanto ao impacto no uso preferencial do correceptor para os subtipos/variantes estudados. As posições 37 e 41 foram descritas previamente como apresentando diferentes abundâncias entre sequências de diferentes genotropismos (Antell, 2017). A posição 37 apresentou uma troca no uso majoritário de prolina pelas amostras R5 e pelo uso de isoleucina, prolina, valina e metionina pelas amostras não-R5. Enquanto no presente estudo verificamos que a prolina foi a mais prevalente em todos grupos, no entanto mais abundantes nos grupos B<sub>BR</sub> e F1 não-R5, quando comparados aos seus próprios grupos R5. Já a posição 41 teria como aminoácido mais abundante a glicina nas amostras R5, e proporções similares de serina e glicina nas amostras não-R5. Nas nossas amostras, a posição 41 não se destacou na análise dos consensos, no entanto não apresentou diferença quanto às abundâncias entre os grupos, com glicina ( $\geq 38,10\%$ ) e serina ( $\geq 28,57\%$ ). As funções dos domínios de Vpr ainda estão sendo melhor elucidadas, com as posições 1-42 sendo apontadas como envolvidas na homooligmerização (Zhao et al., 1994). As posições 15, 28 e 37 avaliadas não demonstraram diferença entre os subtipos ou de acordo com tropismo, não sendo possível verificar atividade de homooligmerização específica, no entanto a posição 28 demonstrou característica subtipo-específica para F1, com serina sendo majoritária nos grupos B, e asparagina nos grupos F1.

Para a proteína Vpu, doze posições foram investigadas a partir das sequências consenso. A proteína Vpu é a única das estudadas de domínios topológicos diferentes, sendo as posições 1-6 extracelular, 7-26 transmembrana e 28-81 citoplasmática (UniProt, 2020). A posição 6 se demonstrou variável entre os grupos, tendo isoleucina como aminoácido majoritário nos grupos B<sub>PAN</sub>, alanina nos grupos F1 e tirosina nos grupos B<sub>BR</sub>. Essa variação entre os subtipos, em se tratando de um domínio extracelular, pode ser interessante para o vírus

evadir do sistema imune. Essa posição, ainda, apresentou troca de tirosina (Y) para isoleucina (I) possivelmente relacionada ao tropismo. A posição 35 apresentou possível relação com tropismo para o F1, onde foi verificado no grupo R5 o uso majoritário de arginina e no grupo não-R5, o de serina. A posição 38 apresentou diferenças nos consensos entre os todos grupos R5 (sem assinatura  $\geq 90\%$ ) e não-R5 (lisina  $\geq 90\%$ ) avaliados. Ao analisar a tabela 8, notou-se leve abundância de lisina nos grupos não-R5 (96,55% a 100%) em relação aos grupos R5 (de 73,81% a 87,30%), com destaque para os grupos B<sub>BR</sub>, que tiveram a diferença de 73,81% (R5) e 100% (não-R5). Em sendo esta posição parte do domínio citoplasmático, poderia apresentar relevância na interação com proteínas celulares.

## 6. CONCLUSÃO

- O sub-subtipo F1 do HIV-1 apresenta proporção de vírus não-R5 na fase crônica da infecção significativamente menor do que as observadas para ambas variantes estudadas do subtipo B. Assim, a maioria dos indivíduos infectados por vírus F1 poderia utilizar maraviroque ao longo da infecção.
- Algumas posições nas proteínas Vif, Vpr, Vpu, Rev e Tat apresentaram subtipo-especificidade, sendo algumas delas em sítios relevantes para a atividade da proteína.
- A partir da análise da proteína Tat, corroboramos dados anteriores, observando maior abundância do aminoácido prevalente em vírus não-R5 trópicos em comparação com o grupo R5 trópico do mesmo subtipo na posição 60 (para os grupos B<sub>PAN</sub>, B<sub>BR</sub> e F1), posições 23 e 57 (B<sub>PAN</sub> e F1) e na posição 7 (B<sub>BR</sub> e F1). Verificamos maior abundância do aminoácido ácido aspártico prevalente em vírus não-R5 trópicos em comparação com o grupo R5 trópico na posição 101 para a variante B<sub>BR</sub> e o sub-subtipo F1.
- Para a proteína Vpr, verificamos ligeiro aumento na abundância do aminoácido prolina prevalente na posição 37 para variante B<sub>BR</sub> e sub-subtipo F1.

- Para a proteína Vif, houve indício de tropismo-especificidade na posição 45 para a variante B<sub>BR</sub> com troca do ácido glutâmico em R5 por tirosina não R5, esta troca poderia impactar na atividade de degradação da APOBEC. Já na posição 73 para o sub-subtipo F1 e na posição 41 para todos os subtipos verificamos abundância do aminoácido quando comparados os grupos R5 e não R5.
- Para a proteína Vpu, as posições 6 e 35 apresentaram possível relação com tropismo para a variante B<sub>BR</sub> e sub-subtipo F1, respectivamente. A troca de aminoácido arginina por serina na posição 35 poderia influenciar a ligação ao CD4.
- Assim, corroboramos que as estratégias evolutivas para o uso do correceptor podem variar de acordo com o subtipo viral, e que outros genes podem estar associados a esse processo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, J. L., Greener, B. N., & Kashuba, A. D. M. Pharmacology of HIV integrase inhibitors. In *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2012; 7(5): 390-400

Aguayo, N., Laguna-Torres, V. A., Villafane, M., Barboza, A., Sosa, L., Chauca, G., Carrion, G., Coenca, B., Perez, J., Galeano, A., Bautista, C. T., Sanchez, J. L., Carr, J. K., & Kochel, T. Epidemiological and molecular characteristics of HIV-1 infection among female commercial sex workers, men who have sex with men and people living with AIDS in Paraguay. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41(3)

Alaeus, A. Significance of HIV-1 genetic subtypes. In *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. 2000; 32(5): 455-63.

Alcamí, J., & Coiras, M. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 16(2)

Alencar, C. S., Sabino, E. C., Carvalho, S. M. F., Leao, S. C., Carneiro-Proietti, A. B., Capuani, L., Oliveira, C. L., Carrick, D., Birch, R. J., Gonzalez, T. T., Keating, S., Swanson, P. A., Hackett, J., & Busch, M. P. 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. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2013 1;63(3):387-92.

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., & Berger, E. A. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. 1996; 28;272(5270):1955-8

Almeida, F. J., Zapparoli, M. S., Moreira, D. H., de Souza Cavalcanti, J., Rodrigues, R., Berezin, E. N., de Paula Ferreira, J. L., Sáfadi, M. A. P., & de Macedo Brígido, L. F. Association of X4 tropism with disease progression in antiretroviral-treated children and adolescents living with HIV/AIDS in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2014; 18 (3)

Amini, S., Khalili, K., & Sawaya, B. E. Effect of HIV-1 Vpr on cell cycle regulators. *DNA and Cell Biology*. 2004; 23 (4)

An, P., & Winkler, C. A. Host genes associated with HIV/AIDS: advances in gene discovery. In *Trends in Genetics*. 2010; 26(3):119-31

Antell, G. C., Dampier, W., Aiamkitsumrit, B., Nonnemacher, M. R., Jacobson, J. M., Pirrone, V., Zhong, W., Kercher, K., Passic, S., Williams, J. W., Schwartz, G., Hershberg, U., Krebs, F. C., & Wigdahl, B. Utilization of HIV-1 envelope V3 to identify X4- and R5-specific Tat and LTR sequence signatures. *Retrovirology*. 2016; 13 (32)



Antell, G. C., Dampier, W., Aiamkitsumrit, B., Nonnemacher, M. R., Pirrone, V., Zhong, W., Kercher, K., Passic, S., Williams, J., Liu, Y., James, T., Jacobson, J. M., Szep, Z., Wigdahl, B., & Krebs, F. C. Evidence of Divergent Amino Acid Usage in Comparative Analyses of R5- and X4-Associated HIV-1 Vpr Sequences. *International Journal of Genomics*. 2017; 2017:4081585

Archary, D., Gordon, M. L., Green, T. N., Coovadia, H. M., Goulder, P. J. R., & Ndung'u, T. HIV-1 subtype C envelope characteristics associated with divergent rates of chronic disease progression. *Retrovirology*. 2010; 4:7:92

Arif, M. S., Hunter, J., Léda, A. R., Zukurov, J. P. L., Samer, S., Camargo, M., Galinskas, J., Kallás, E. G., Komninakis, S. V., Janini, L. M., Sucupira, M. C., & Diaz, R. S. Pace of Coreceptor Tropism Switch in HIV-1-Infected Individuals after Recent Infection. *Journal of Virology*. 2017; 12:91(19)

Aulicino, P. C., Bello, G., Guimaraes, M. L., Ruchansky, D., Rocco, C., Mangano, A., Morgado, M. G., & Sen, L. Longitudinal analysis of HIV-1 BF1 recombinant strains in vertically infected children from Argentina reveals a decrease in CRF12\_BF pol gene mosaic patterns and high diversity of BF unique recombinant forms. *Infection, Genetics and Evolution*. 2011; 11(2):349-57

Aulicino, P. C., Bello, G., Rocco, C., Romero, H., Mangano, A., Morgado, M. G., & Sen, L. Description of the first full-length HIV type 1 subtype F1 strain in Argentina: Implications for the origin and dispersion of this subtype in South America. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007; 23(10):1176-82

Aulicino, P. C., Gómez-Carrillo, M., Bello, G., Rocco, C., Mangano, A., Carr, J., Sen, L., & Foley, B. Characterization of full-length HIV-1 CRF17\_BF genomes and comparison to the prototype CRF12\_BF strains. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12 (1): 443-447

Barouch, D. H., Santra, S., Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Fu, T. M., Wagner, W., Biliska, M., Craiu, A., Zheng, X. X., Krivulka, G. R., Beaudry, K., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Trigona, W. L., Punt, K., Freed, D. C., Guan, L., Dubey, S., Casimiro, D., ... Letvin, N. L. Control of viremia prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science*. 2000; 20;290(5491):486-92

Barouch, Dan H., & Korber, B. HIV-1 Vaccine Development After STEP. *Annual Review of Medicine*. 2010; 61: 153

Barreto, C. C., Nishyia, A., Araújo, L. V., Ferreira, J. E., Busch, M. P., & Sabino, E. C. Trends in antiretroviral drug resistance and clade distributions among HIV-1-infected blood donors in Sao Paulo, Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2006; 41(3):338-41

Basmaciogullari, S., & Pizzato, M. The activity of Nef on HIV-1 infectivity. *Frontiers in Microbiology*. 2014 20;5:232

Bello, G., Aulicino, P. C., Ruchansky, D., Guimarães, M. L., Lopez-Galindez, C., Casado, C., Chiparelli, H., Rocco, C., Mangano, A., Sen, L., & Morgado, M. G. Phylodynamics of HIV-1 Circulating Recombinant Forms 12\_BF and 38\_BF in Argentina and Uruguay. *Retrovirology*. 2010; 22;7:22

Bello, G., de Zanotto, P. M. A., Iamarino, A., Gräf, T., Pinto, A. R., Couto-Fernandez, J. C., & Morgado, M. G. Phylogeographic analysis of HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *PLoS ONE*. 2012; 7(4): e35649

Berger, E. A., Murphy, P. M., & Farber, J. M. CHEMOKINE RECEPTORS AS HIV-1 CORECEPTORS: Roles in Viral Entry, Tropism, and Disease. *Annual Review of Immunology*. 1999; 17:657-700.

Bleul, C. C., Wu, L., Hoxie, J. A., Springer, T. A., & Mackay, C. R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997 4; 94(5): 1925–1930.

Boletim Epidemiológico. Programa Nacional de DST e AIDS. Ministério da Saúde. [online]. Brasil; 2019. [capturado em 01 de maio de 2020]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br>.

Borm, K., Jakobsen, M. R., Cashin, K., Flynn, J. K., Ellenberg, P., Ostergaard, L., Lee, B., Churchill, M. J., Roche, M., & Gorry, P. R. Frequency and Env determinants of HIV-1 subtype C strains from antiretroviral therapy-naive subjects that display incomplete inhibition by maraviroc. *Retrovirology*. 2016; 3;13(1):74.

Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., & Oldstone, M. B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*. 1994; 68(9):6103-10

Brígido, L. F.M., Ferreira, J. L. P., Almeida, V. C., Rocha, S. Q., Ragazzo, T. G., Estevam, D. L., & Rodrigues, R. Southern Brazil HIV type 1 C expansion into the state of São Paulo, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2011; 27(3):339-44

Brígido, Luis F.M., Nunes, C. C., Oliveira, C. M., Knoll, R. K., Ferreira, J. L. P., Freitas, C. A., Alves, M. A., Dias, C., & Rodrigues, R. HIV type 1 subtype C and CB pol recombinants prevail at the cities with the highest AIDS prevalence rate in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007; 23(12):1579-86

Brindeiro RM, Diaz RS, Sabino EC, Morgado MG, Pires IL, Brígido L, Dantas MC, Barreira D, Teixeira PR, Tanuri A; Brazilian Network for Drug Resistance Surveillance. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIVBResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS* 2003; 17(7):1063-1069.

Brumme, Z. L., Goodrich, J., Mayer, H. B., Brumme, C. J., Henrick, B. M., Wynhoven, B., Asselin, J. J., Cheung, P. K., Hogg, R. S., Montaner, J. S. G., &

Harrigan, P. R. Molecular and Clinical Epidemiology of CXCR4-Using HIV-1 in a Large Population of Antiretroviral-Naive Individuals. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005; 192(3):466-74

Burdick, R. C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J. M. O., Nagashima, K., Hu, W.-S., & Pathak, V. K. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020; 117(10):201920631

Cabral, V. P., Cunha, C. B., Magalhaes, E. F. L., Pinto-Neto, L. F., Couto-Fernandez, J. C., Dietze, R., Morgado, M. G., & Ribeiro-Rodrigues, R. Human immunodeficiency virus type-1 subtypes of infected patients in Espírito Santo, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2006; 101(8) 881-885.

Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Covell, D. G., Gronenborn, A. M., & Clore, G. M. Three-dimensional solution structure of the 44 kDa ectodomain of SIV gp41. *EMBO Journal*. 1998; 17(16): 4572–4584

Cardoso, L. P. V., Pereira, G. A. S., Viegas, Â. A., Schmaltz, L. E. P. R., & Stefani, M. M. D. A. HIV-1 primary and secondary antiretroviral drug resistance and genetic diversity among pregnant women from central Brazil. *Journal of Medical Virology*. 2010; 82(3):351-7

Caride, E., Brindeiro, R., Hertogs, K., Larder, B., Dehertogh, P., Machado, E., De Sá, C. A. M., Eyer-Silva, W. A., Sion, F. S., Passioni, L. F. C., Menezes, J. A., Calazans, A. R., & Tanuri, A. Drug-resistant reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type I found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*. 2000; 275(1):107-15

Carr, J. K., Avila, M., Carrillo, M. G., Salomon, H., Hierholzer, J., Watanaveeradej, V., Pando, M. A., Negrete, M., Russell, K. L., Sanchez, J., Birx, D. L., Andrade, R., Vinoles, J., & McCutchan, F. E. Diverse BF recombinants have spread widely since the introduction of hiv-1 into South America. *AIDS*. 2001; 15(15):F41-7

Cashin, K., Jakobsen, M. R., Sterjovski, J., Roche, M., Ellett, A., Flynn, J. K., Borm, K., Gouillou, M., Churchill, M. J., & Gorry, P. R. Linkages between HIV-1 specificity for CCR5 or CXCR4 and in vitro usage of alternative coreceptors during progressive HIV-1 subtype C infection. *Retrovirology*. 2013; 16;10:98

Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., & Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997; 89(2):263-273

Cherrington, J., & Ganem, D. Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *The EMBO Journal*. 1992; 11(4):1513-24

Chihana ML, Huerga H, Van Cutsem G, Ellman T, Wanjala S, Masiku C, et al. (2018) Impact of "test and treat" recommendations on eligibility for antiretroviral treatment: Cross sectional population survey data from three high HIV prevalence countries. *PLoS ONE* 13(11): e0207656.

Cicala, C., Arthos, J., & Fauci, A. S. HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV. In *Journal of Translational Medicine*. 2010; 9

Cilliers, T., Nhlapo, J., Coetzer, M., Orlovic, D., Ketas, T., Olson, W. C., Moore, J. P., Trkola, A., & Morris, L. The CCR5 and CXCR4 Coreceptors Are Both Used by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates from Subtype C. *Journal of Virology*. 2003; 77(7):4449-56

Clapham, P. R., & Weiss, R. A. Spoilt for choice of co-receptors. In *Nature*. 1997; 388(6639):230-1

Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., & Alizon, M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*. 1986; 324(6098):691-5

Coetzer, M., Cilliers, T., Ping, L. H., Swanstrom, R., & Morris, L. Genetic characteristics of the V3 region associated with CXCR4 usage in HIV-1 subtype C isolates. *Virology*. 2006; 356(1-2):95-105.

Coetzer, M., Nedellec, R., Cilliers, T., Meyers, T., Morris, L., & Mosier, D. E. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2011; 56(1):9-15

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., & Weiss, R. Human immunodeficiency viruses. In *Science*. 1986; 43(3): 203–222.

Cohen, OJ; Kinter, A; Fauci, A. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunological Reviews*. 1997; 10(159), 31–48.

Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J. G., & Haseltine, W. A. Identification of HIV-1 vpr product and function. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 1990; 3(1):11-8

Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., & Baltimore, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 1998; 391(6665):397-401

Couto-Fernandez, J. C., Silva-De-Jesus, C., Veloso, V. G., Rachid, M., Gracie, R. S. G., Chequer-Fernandez, S. L., Oliveira, S. M., Arakaki-Sanchez, D., Chequer, P. J. N., & Morgado, M. G. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: Assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100(1)

Couto-Fernandez, José Carlos, Eyer-Silva, W. A., Guimarães, M. L., Chequer-Fernandez, S. L., Grinsztejn, B., Delaporte, E., Peeters, M., & Morgado, M. G. Phylogenetic analysis of Brazilian HIV type 1 subtype D strains: Tracing the origin

of this subtype in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2006; 22(2):207-11

Covas, D. T., Biscoaro, T. A., Kashima, S., Duarte, G., & Machado, A. A. High frequency of the GWG (Pro Trp) envelope variant of HIV-1 in Southeast Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1998; 9(1):74-9.

D'Arc, M., Ayoub, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F. H., Boesch, C., Madinda, N. F., Robbins, M. M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V. A., Sharp, P. M., Hahn, B. H., ... Peeters, M. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015; 112(11):E1343-52

da Silva, M. M. G., Telles, F. Q., da Cunha, C. A., & Rhame, F. S. HIV subtype, epidemiological and mutational correlations in patients from Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14(5): 495-501

Das, A. T., Harwig, A., & Berkhout, B. The HIV-1 Tat Protein Has a Versatile Role in Activating Viral Transcription. *Journal of Virology*. 2011; 85(18):9506-16

de Almeida, D., Macieira, K., Grinsztejn, B., Veloso Dos Santos, V., & Guimarães, M. Cross-Neutralizing Antibodies in HIV-1 Individuals Infected by Subtypes B, F1, C or the B/Bbr Variant in Relation to the Genetics and Biochemical Characteristics of the env Gene. *PLoS ONE*. 2016;11(12), :e0167690.

De Jong, J. J., De Ronde, A., Keulen, W., Tersmette, M., & Goudsmit, J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *Journal of Virology*. 1992; 66(11):6777-80

De Mendoza, C., Van Baelen, K., Poveda, E., Rondelez, E., Zahonero, N., Stuyver, L., Garrido, C., Villacian, J., & Soriano, V. Performance of a population-based HIV-1 tropism phenotypic assay and correlation with V3 genotypic prediction tools in recent HIV-1 seroconverters. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2008; 48(3):241-4.

De Paula Ferreira, J. L., Thomaz, M., Rodrigues, R., Harrad, D., Oliveira, C. M., De Freitas Oliveira, C. A., Batista, J. P. G., Ito, T. S., & De Macedo Brigido, L. F. Molecular characterisation of newly identified HIV-1 infections in Curitiba, Brazil: Preponderance of clade C among males with recent infections. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008; 103(8)

De Sá Filho, D. J., Sucupira, M. C. A., Casiero, M. M., Sabino, E. C., Diaz, R. S., & Janini, L. M. Identification of two HIV type 1 circulating recombinant forms in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2006; 22(1):1-13.

Deeks, S. G. HIV: Shock and kill. *Nature*. 2012; 23(1): 14-26

Delatorre, E., Couto-Fernandez, J. C., Guimarães, M. L., Vaz Cardoso, L. P., de Alcantara, K. C., Martins de Araújo Stefani, M., Romero, H., Freire, C. C. M., Iamarino, A., de A Zanotto, P. M., Morgado, M. G., & Bello, G. Tracing the Origin and Northward Dissemination Dynamics of HIV-1 Subtype C in Brazil. *PLoS ONE*. 2013; 8(9):e74072.

Delatorre, E., de Azevedo, S. S. D., Rodrigues-Pedro, A., Velasco-de-Castro, C. A., Couto-Fernandez, J. C., Pilotto, J. H., & Morgado, M. G. Tracing the origin of a singular HIV-1 CRF45\_cpx clade identified in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016; 46:223-232

Delatorre, E. O., Bello, G., Eyer-Silva, W. A., Chequer-Fernandez, S. L., Morgado, M. G., & Couto-Fernandez, J. C. Evidence of multiple introductions and autochthonous transmission of the HIV Type 1 CRF02-AG clade in Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2012; 28(10):1369-72

Delatorre, E., Silva-De-Jesus, C., Couto-Fernandez, J. C., Pilotto, J. H., & Morgado, M. G. High HIV-1 Diversity and Prevalence of Transmitted Drug Resistance among Antiretroviral-Naive HIV-Infected Pregnant Women from Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2017; 33(1):68-73

Delgado, R. Características virológicas del VIH. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29(1): 58-65

Derdeyn, C. A., Decker, J. M., Bibollet-Ruche, F., Mokili, J. L., Muldoon, M., Denham, S. A., Heil, M. L., Kasolo, F., Musonda, R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Korber, B. T., Allen, S., & Hunter, E. Envelope-Constrained Neutralization-Sensitive HIV-1 after Heterosexual Transmission. *Science*. 2004; 303(5666):2019-22

Désiré, N., Cerutti, L., Le Hingrat, Q., Perrier, M., Emler, S., Calvez, V., Descamps, D., Marcelin, A. G., Hué, S., & Visseaux, B. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D subtypes reclassification. *Retrovirology*. 2018; 15(80)

Di Santo, R. Inhibiting the HIV integration process: Past, present, and the future. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 57(3):539-66

Diaz, R. S., Leal, É., Sanabani, S., Sucupira, M. C. A., Tanuri, A., Sabino, E. C., & Janini, L. M. Selective regimes and evolutionary rates of HIV-1 subtype B V3 variants in the Brazilian epidemic. *Virology*. 2008; 381(2):184-93

Ejikeugwu, C., Eze, P., Iroha, I., Esimone, C., Adikwu, M., & AKARI, H. Understanding the Facts and Minding the Gap of (HIV-1/HIV-2) Primate Research and Infectious Disease Laboratories in Africa. *International Journal of Virology and AIDS*. 2018; 5(46)

Engelman, A., & Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: Mechanistic and therapeutic insights. In *Nature Reviews Microbiology*. 2012; 10(4):279-90

Ensoli, B., Buonaguro, L., Barillari, G., Fiorelli, V., Gendelman, R., Morgan, R. A., Wingfield, P., & Gallo, R. C. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *Journal of Virology*. 1993; 67(1): 277–287

Epstein, F. H., Pantaleo, G., Graziosi, C., & Fauci, A. S. The Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*. 1993; 328(5):327-35

Eyer-Silva, W. A., & Morgado, M. G. Autochthonous horizontal transmission of a CRF02\_AG strain revealed by a human immunodeficiency virus type 1 diversity survey in a small city in inner state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102(7): 809-815

Feinberg, M. B., Jarrett, R. F., Aldovini, A., Gallo, R. C., & Wong-Staal, F. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell*. 1986; 46(6):807-17

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattajt, L. W., & Lührmann, R. The HIV-1 Rev Activation Domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*. 1995; 82(3): 475-483

Ford, N., Migone, C., Calmy, A., Kerschberger, B., Kanters, S., Nsanzimana, S., Mills, E. J., Meintjes, G., Vitoria, M., Doherty, M., & Shubber, Z. Benefits and risks of rapid initiation of antiretroviral therapy. *AIDS*. 2018; 32(1):17-23.

Fouchier, R. A., Groenink, M., Kootstra, N. A., Tersmette, M., Huisman, H. G., Miedema, F., & Schuitemaker, H. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *Journal of Virology*. 1992; 66(5):3183-7.

Franca, R. F. O., Castro-Jorge, L. A., Neto, R. J. P., Jorge, D. M. M., Lima, D. M., Colares, J. K. B., Paula, S. O., & Da Fonseca, B. A. L. Genotypic characteristics of HIV type 1 based on gp120 hypervariable region 3 of isolates from Southern Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2011; 27(8):903-9

Frankel, A., & Young, J. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annual Review of Biochemistry*, 1998; 67:1–25.

Freed, E. O. HIV-1 replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 2001; 26(1-6):13-33.

Fung, H. B., & Guo, Y. Enfuvirtide: A fusion inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clinical Therapeutics*. 2004; 61(12):1242-7.

Gao, F., Balles, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., & Hahn, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. 1999; 397: 436–441

Gao, F., Vidal, N., Li, Y., Trask, S. A., Chen, Y., Kostrikis, L. G., Ho, D. D., Kim, J., Oh, M. D., Choe, K., Salminen, M., Robertson, D. L., Shaw, G. M., Hahn, B. H., & Peeters, M. Evidence of two distinct subsubtypes within the HIV-1 subtype A radiation. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2001; 17(8):675-88.

Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., Foley, B., Gao, F., Lang, D., Novitsky, V., Haynes, B., Hahn, B. H., Bhattacharya, T., & Korber, B. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*. 2002; 296(5577): 2354-2360

Ghosh, A. K., Osswald, H. L., & Prato, G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016; 59(11): 5172–5208.

Gomez, C., & Hope, T. J. The ins and outs of HIV replication. *Cellular Microbiology*. 2005; 7(5), 621–626

Goncalves, J., Korin, Y., Zack, J., & Gabuzda, D. Role of Vif in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *Journal of Virology*. 1996; 70(12): 8701–8709.

González, M. E. Vpu protein: The viroporin encoded by HIV-1. *Viruses*. 2015; 7(8):4352-68

Goto, T., Ashina, T., Fujiyoshi, Y., Kume, N., Yamagishi, H., & Nakai, M. Projection structures of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) observed with high resolution electron cryo-microscopy. *Journal of Electron Microscopy*. 1994; 43(1):16-9.

Goto, T., Nakai, M., & Ikuta, K. The life-cycle of human immunodeficiency virus type 1. *Micron*. 1998; 29(2-3):123-38.

Göttlinger, H. HIV-1 Gag: a molecular machine driving viral particle assembly and release. *HIV Sequence Compendium*. 2001; 2(7): a006924.

Gräf, T., Machado Fritsch, H., de Medeiros, R. M., Maletich Junqueira, D., Esteves de Matos Almeida, S., & Pinto, A. R. Comprehensive Characterization of HIV-1 Molecular Epidemiology and Demographic History in the Brazilian Region Most Heavily Affected by AIDS. *Journal of Virology*. 2016; 90(18):8160-8

Gräf, T., & Pinto, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. *Virology*. 2013; 435(1):170-8

Gregson, J., Tang, M., Ndembu, N., Hamers, R. L., Marconi, V. C., Brooks, K., Theys, K., Arruda, M., Garcia, F., Monge, S., Kanki, P. J., Kumarasamy, N., Kerschberger, B., Mor, O., Charpentier, C., Todesco, E., Rokx, C., Gras, L., Halvas, E. K., ... Murakami-Ogasawara, A. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: A multicentre retrospective cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016; 16(5):565-575



Grobler, J. A., Dornadula, G., Rice, M. R., Simcoe, A. L., Hazuda, D. J., & Miller, M. D. HIV-1 reverse transcriptase plus-strand initiation exhibits preferential sensitivity to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in vitro. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(11):8005-10.

Grubb, I. R., Beckham, S. W., Kazatchkine, M., Thomas, R. M., Albers, E. R., Cabral, M., Lange, J., Vella, S., Kurian, M., & Beyrer, C. Maximizing the benefits of antiretroviral therapy for key affected populations. *Journal of the International AIDS Society*. 2014; 17(1): 19320.

Guimarães, Monick L., Eyer-Silva, W. A., Couto-Fernandez, J. C., & Morgado, M. G. Identification of two new CRF\_BF in Rio de Janeiro State, Brazil. *AIDS*. 2008; 22(3):433-5

Guimarães, Monick L., Velarde-Dunois, K. G., Segurondo, D., & Morgado, M. G. The HIV-1 epidemic in Bolivia is dominated by subtype B and CRF12-BF “family” strains. *Virology Journal*. 2012; 9:19

Guimarães, Monick Lindenmeyer, Dos Santos Moreira, A., Loureiro, R., Galvão-Castro, B., & Morgado, M. G. High frequency of recombinant genomes in HIV type 1 samples from Brazilian southeastern and southern regions. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2002; 18(17):1261-9.

Hemelaar, J., Elangovan, R., Yun, J., Dickson-Tetteh, L., Fleminger, I., Kirtley, S., Williams, B., Gouws-Williams, E., Ghys, P. D., Abimiku, A. G., Agwale, S., Archibald, C., Avidor, B., Barbás, M. G., Barre-Sinoussi, F., Barugahare, B., Belabbes, E. H., Bertagnolio, S., Birx, D., ... Zhang, R. Global and regional molecular epidemiology of HIV-1, 1990–2015: a systematic review, global survey, and trend analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019; 19(2):143-155

Hierholzer, J., Montano, S., Hoelscher, M., Negrete, M., Hierholzer, M., Avila, M. M., Gomez Carrillo, M., Russi, J. C., Vinales, J., Alava, A., Acosta, M. E., Gianella, A., Andrade, R., Sanchez, J. L., Carrion, G., Sanchez, J. L., Russell, K., Robb, M., Birx, D., ... Carr, J. K. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Ecuador, Peru, Bolivia, Uruguay, and Argentina. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2002; 18(18):1339-50.

Holec, A. D., Mandal, S., Prathipati, P. K., & Destache, C. J. Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors: A Thorough Review, Present Status and Future Perspective as HIV Therapeutics. *Current HIV Research*. 2017; 15(6):411-421

Hu, W. S., & Hughes, S. H. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012; 2(10). pii: a006882.

Huang, W., Toma, J., Stawiski, E., Fransen, S., Wrin, T., Parkin, N., Whitcomb, J. M., Coakley, E., Hecht, F. M., Deeks, S. G., Gandhi, R. T., Eshleman, S. H., & Petropoulos, C. J. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 populations containing CXCR4-using variants from recently infected individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2009; 25(8):795-802

Jakobsen, M. R., Cashin, K., Roche, M., Sterjovski, J., Ellett, A., Borm, K., Flynn, J., Erikstrup, C., Gouillou, M., Gray, L. R., Saksena, N. K., Wang, B., Purcell, D. F. J., Kallestrup, P., Zinyama-Gutsire, R., Gomo, E., Ullum, H., Østergaard, L., Lee, B., ... Gorry, P. R. Longitudinal Analysis of CCR5 and CXCR4 Usage in a Cohort of Antiretroviral Therapy-Naïve Subjects with Progressive HIV-1 Subtype C Infection. *PLoS ONE*. 2013; 8(6):e65950

Jeang KT, Meyers G, Henderson LE, Korber B, Wain-Hobson S (Eds.), Tat structure and function. *Human Retroviruses and AIDS*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos 1996; pp. 3-18

Johnston, M. I., & Fauci, A. S. An HIV vaccine - Challenges and prospects. *New England Journal of Medicine*. 2008; 359(9):888-90

Kahn, J. O., & Walker, B. D. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine*. 1998; 339(1):33-9

Kakuda, T. N. Pharmacology of nucleoside and nucleotide reverse transcriptase inhibitor-induced mitochondrial toxicity. *Clinical Therapeutics*. 2000; 22(6):685-708.

Kaleebu, P., Nankya, I. L., Yirrell, D. L., Shafer, L. A., Kyosiimire-Lugemwa, J., Lule, D. B., Morgan, D., Beddows, S., Weber, J., & Whitworth, J. A. G. Relation between chemokine receptor use, disease stage, and HIV-1 subtypes A and D: Results from a rural Ugandan cohort. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2007; 45(1):28-33.

Kim, Y., Anderson, J. L., & Lewin, S. R. Getting the “Kill” into “Shock and Kill”: Strategies to Eliminate Latent HIV. *Cell Host and Microbe*. 2018; 23(1): 14–26.

Kogan, M., Deshmane, S., Sawaya, B. E., Gracely, E. J., Khalili, K., & Rappaport, J. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity by HIV-1 Vpr is dependent on Vpr binding protein. *Journal of Cellular Physiology*. 2013; 228(4):781-90

Kogan, M., & Rappaport, J. HIV-1 Accessory Protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*. 2011; 8:25

Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., & Detours, V. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *British Medical Bulletin*. 2001; 58:19-42.

Korber, B. T., Foley, B. T., Kuiken, C. L., Pillai, S. K., & Sodroski, J. G. Numbering positions in HIV relative to HXB2CG. *Human Retroviruses and AIDS*. 1998

Korber, B. T., MacInnes, K., Smith, R. F., & Myers, G. Mutational trends in V3 loop protein sequences observed in different genetic lineages of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology*. 1994; 68(10): 6730–6744.

Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., & Ho, D. D. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *Journal of Virology*. 1994; 68(7):4650-5.

Kuiken, C., Foley, B., Leitner, T., Apetrei, C., Hahn, B. H., Mizrachi, I., Mullins, J. I., Rambaut, A., Wolinsky, S., & Korber, B. T. HIV Sequence Compendium. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM. 2011.

LaBonte, J., Lebbos, J., & Kirkpatrick, P. Enfuvirtide. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003; 2:345–346

Labrosse B, Treboute C, Brelot A, Alizon M. Cooperation of the V1/V2 and V3 domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 for interaction with the CXCR4 receptor. 2001.*J Virol.*;75:5457–5464

Leal, É., Silva, W. P., Sucupira, M. C., Janini, L. M., & Diaz, R. S. Molecular and structural characterization of HIV-1 subtype B Brazilian isolates with GWGR tetramer at the tip of the V3-loop. *Virology*. 2008; 381(2):222-9

Leavitt, S. A., Schon, A., C. Klein, J., Manjappara, U., M. Chaiken, I., & Freire, E. Interactions of HIV-1 Proteins gp120 and Nef with Cellular Partners Define a Novel Allosteric Paradigm. *Current Protein & Peptide Science*. 2005; 5(1):1-8.

Lee, B., Sharron, M., Montaner, L. J., Weissman, D., & Doms, R. W. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999.

Leite TF, Delatorre E, Côrtes FH, Ferreira ACG, Cardoso SW, Grinsztejn B, et al. Reduction of HIV-1 reservoir size and diversity after 1 year of cART among Brazilian individuals starting treatment during early stages of acute infection. *Front Microbiol*. 2019

Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., & Gregory, T. J. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1990; 265(18):10373-82.

Letko, M., Booiman, T., Kooststra, N., Simon, V., Ooms, M. Identification of the HIV-1 Vif and human APOBEC3G protein interface. *Cell Reports*. 2015; 3(9): 1789-1799

Lobritz, M. A., Ratcliff, A. N., & Arts, E. J. HIV-1 entry, inhibitors, and resistance. *Viruses*. 2010; 2(5): 1069–1105.

Locateli, D., Stoco, P. H., De Queiroz, A. T. L., Alcântara, L. C. J., Ferreira, L. G. E., Zanetti, C. R., Rodrigues, R., Grisard, E. C., & Pinto, A. R. Molecular epidemiology of HIV-1 in Santa Catarina State confirms increases of subtype c in southern Brazil. *Journal of Medical Virology*. 2007; 79(10):1455-63.

Los Alamos National Laboratory. Landmarks of the HIV genome. In *Human Retroviruses and AIDS*. 1998

Louwagie, J., Delwart, E. L., Mullins, J. I., McCutchan, F. E., Eddy, G., & Burke, D. S. Genetic Analysis of HIV-1 Isolates from Brazil Reveals Presence of Two Distinct Genetic Subtypes. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1994; 10(5):561-7.

Luciw, P. A. Human immunodeficiency viruses and their replication. *Virology*. 1996; 3rd ed, 1881–1952.

Machado, L. F. A., Ishak, M. O. G., Vallinoto, A. C. R., Lemos, J. A. R., Azevedo, V. N., Moreira, M. R. C., Souza, M. I. M., Fernandes, L. M., Souza, L. L. B., & Ishak, R. Molecular epidemiology of HIV type 1 in Northern Brazil: Identification of subtypes C and D and the introduction of CRF02-AG in the amazon region of Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2009; 25(10):961-6.

Marques, B. C. L., Morgado, M. G., & Guimarães, M. L. Potential overestimation of HIV-1 sub-subtype F1 circulation in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 2018; 113(8)

Marx, P. A., Munn, R. J., & Joy, K. I. Methods in laboratory investigation. Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Laboratory Investigation*. 1988.

Matsuda, N., Tanaka, H., Yamazaki, S., Suzuki, J. ichiro, Tanaka, K., Yamada, T., & Masuda, M. HIV-1 Vpr induces G2 cell cycle arrest in fission yeast associated with Rad24/14-3-3-dependent, Chk1/Cds1-independent Wee1 upregulation. *Microbes and Infection*. 2006, 8(12-13):2736-44

Mayer, K. H., Hirsch, H. H., Kaufmann, G., Sendi, P., & Battegay, M. Immune Reconstitution in HIV-Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 38(8), 1159–1166.

Mehle, A., Strack, B., Ancuta, P., Zhang, C., McPike, M., & Gabuzda, D. Vif Overcomes the Innate Antiviral Activity of APOBEC3G by Promoting Its Degradation in the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;

Meloni, S. T., Kim, B., Sankale, J.-L., Hamel, D. J., Tovanabutra, S., Mboup, S., McCutchan, F. E., & Kanki, P. J. Distinct Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype A Virus Circulating in West Africa: Sub-Subtype A3. *Journal of Virology*. 2004; 279(9):7792-8.

Méndez, C., Ledger, S., Petoumenos, K., Ahlenstiel, C., & Kelleher, A. D. RNA-induced epigenetic silencing inhibits HIV-1 reactivation from latency. *Retrovirology*. 2018; 15(1):67

Moir, S., Chun, T.-W., & Fauci, A. S. Pathogenic Mechanisms of HIV Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;

Morgado, M. G., Guimarães, M. L., & Galvão-Castro, B. HIV-1 polymorphism: A challenge for vaccine development - A review. In *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 6:223-48

Morgado, M. G., Guimarães, M. L., Gripp, C. B., Neves Júnior, I., Costa, C. I., dos Santos, V. G., Linhares-de-Carvalho, M. I., Galvão-Castro, B., & Bongertz, V. Polymorphism of the predictive antigenic sites on the V3 loop of Brazilian HIV-1 subtype B strains. HEC/FIOCRUZ AIDS Clinical Research Group. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 1996; 91(3):339-42.

Morgado, Mariza G., Guimarães, M. L., Gripp, C. B. G., Costa, C. I., Neves, I., Veloso, V. G., Linhares-Carvalho, M. I., Castello-Branco, L. R., Bastos, F. I., Kuiken, C., Castilho, E. A., Galvão-Castro, B., & Bongertz, V. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: High prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1998; 18(5):488-94.

Morgado, Mariza G., Sabino, E. C., Shpaer, E. G., Bongertz, V., Brigido, L., Guimaraes, M. D. C., Castilho, E. A., Galvão-Castro, B., Mullins, J. I., Hendry, R. M., & Mayer, A. V3 Region Polymorphisms in HIV-1 from Brazil: Prevalence of Subtype B Strains Divergent from North American/European Prototype and Detection of Subtype F. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1994; 10(5):569-76.

Morris, J. F., Sternberg, E. J., Gutshall, L., Petteway, S. R., & Ivanoff, L. A. Effect of a single amino acid substitution in the V3 domain of the human immunodeficiency virus type 1: generation of revertant viruses to overcome defects in infectivity in specific cell types. *Journal of Virology*. 1994; 68(12):8380-5.

Mousseau, G., & Valente, S. Strategies to block HIV transcription: Focus on small molecule Tat inhibitors. In *Biology*. 2012; 1(3):668-97

Nakai, M., & Goto, T. Ultrastructure and morphogenesis of human immunodeficiency virus. *Journal of Electron Microscopy*. 1996; 45(4):247-57

Oguntibeju, O. O. Quality of life of people living with HIV and AIDS and antiretroviral therapy. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*. 2012; 4: 117–124.

OMS. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. Geneva: OMS, 2013.

OMS. Guideline on when to start antiretroviral therapy and on pre-exposure prophylaxis for HIV. Geneva: OMS, 2015.

Pantaleo, G., & Fauci, A. S. Immunopathogenesis of HIV. *Annual Reviews in Microbiology*. 1996; 121(4):240-55.

Pessôa, R., Freitas Carneiro Proietti, A. B. de, Busch, M. P., & Sanabani, S. S. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form (CRF72\_BF1) in deep sequencing data from blood donors in southeastern Brazil. *Genome Announcements*. 2014; 2(3)

Pessôa, R., Watanabe, J. T., Calabria, P., Felix, A. C., Loureiro, P., Sabino, E. C., Busch, M. P., & Sanabani, S. S. Deep sequencing of HIV-1 near full-length proviral genomes identifies high rates of BF1 recombinants including two novel circulating recombinant forms (CRF) 70-BF1 and a disseminating 71-BF1 among blood donors in Pernambuco, Brazil. *PLoS ONE*. 2014; 9(11):e112674

Piatak, M., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., Hahn, B. H., Shaw, G. M., & Lifson, J. D. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*. 1993; 259(5102):1749-54

Pimentel, V. F., Morgado, M. G., Bello, G., Guimarães, M. D. C., Castilho, E. A., Veloso, V. G., & Guimarães, M. L. Temporal trends and molecular epidemiology of HIV Type 1 Infection in rio de janeiro, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2013; 29(12):1553-61

Pires, I. L., Soares, M. A., Speranza, F. A. B., Ishii, S. K., Vieira, M. C. G., Gouvêa, M. I. F. S., Guimarães, M. A. A. M., De Oliveira, F. E., Magnanini, M. M. F., Brindeiro, R. M., & Tanuri, A. Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance Mutations and Subtypes in Drug-Naive, Infected Individuals in the Army Health Service of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(1):426-30.

Plantier, J. C., Leoz, M., Dickerson, J. E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D. L., & Simon, F. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature Medicine*. 2009; 15(8):871-2.

Potts, K. E., Kalish, M. L., Lott, T., Orloff, G., Luo, C. C., Bernard, M. A., Alves, C. B., Badaro, R., Suleiman, J., & Ferreira, O. Genetic heterogeneity of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein in Brazil. *Brazilian Collaborative AIDS Research Group. AIDS*. 1993; 7(9):1191-7.

Raboni, S. M., de Almeida, S. M., Rotta, I., Ribeiro, C. E. L., Rosario, D., Vidal, L. R., Nogueira, M. B., Riedel, M., da Graça Winhescki, M., Ferreira, K. A., & Ellis, R. Molecular epidemiology of HIV-1 clades in Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010; 105(8):1044-9.

- Rai, M. A., Pannek, S., & Fichtenbaum, C. J. Emerging reverse transcriptase inhibitors for HIV-1 infection. *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 2018; 23(2): 149–157.
- Reis, M. N. D. G., Bello, G., Guimarães, M. L., & Stefani, M. M. A. Characterization of HIV-1 CRF90\_BF1 and putative novel CRFs\_BF1 in Central West, North and Northeast Brazilian regions. *PLoS ONE*. 2017; 12(6):e0178578
- Reis, M. N. G., Guimarães, M. L., Bello, G., & Stefani, M. M. A. Identification of new HIV-1 circulating recombinant forms CRF81-cpx and CRF99-BF1 in central Western Brazil and of unique BF1 recombinant forms. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:97
- Rice, A. P. The HIV-1 Tat Protein: Mechanism of Action and Target for HIV-1 Cure Strategies. *Current Pharmaceutical Design*. 2017; 23(28):4098-4102
- Roberts, J. D., Bebenek, K., & Kunkel, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science*. 1988; 242(4882):1171-3.
- Robertson, D. L. HIV-1 Nomenclature Proposal. *Science*. 2000; 288(5463):55-6.
- Robertson, D. L., Sharp, P. M., Mc Cutchan, F. E., & Hahn, B. H. Recombination in HIV-1. *Nature*. 1995; 374(6518):124-6.
- Rong, R., Bibollet-Ruche, F., Mulenga, J., Allen, S., Blackwell, J. L., & Derdeyn, C. A. Role of V1V2 and Other Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Domains in Resistance to Autologous Neutralization during Clade C Infection. *Journal of Virology*. 2007; 81(3):1350-9
- Roques, P., Robertson, D. L., Souquière, S., Apetrei, C., Nerrienet, E., Barré-Sinoussi, F., Müller-Trutwin, M., & Simon, F. Phylogenetic characteristics of three new HIV-1 N strains and implications for the origin of group N. *AIDS*. 2004; 18(10):1371-81
- Ruchansky, D., Casado, C., Russi, J. C., Arbiza, J. R., & Lopez-Galindez, C. Identification of a new HIV Type 1 circulating recombinant form (CRF38-BF1) in Uruguay. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2009; 25(3):351-6
- Rullo, E. V., Ceccarelli, M., Condorelli, F., Facciola, A., Visalli, G., D'Aleo, F., Paolucci, I., Cacopardo, B., Pinzone, M. R., Rosa, M. D. I., Nunnari, G., & Pellicanò, G. F. Investigational drugs in HIV: Pros and cons of entry and fusion inhibitors (Review). In *Molecular Medicine Reports*. 2019; 19(3):1987-1995
- Sá-Ferreira, J. A., Brindeiro, P. A., Chequer-Fernandez, S., Tanuri, A., & Morgado, M. G. Human immunodeficiency virus-1 subtypes and antiretroviral drug resistance profiles among drug-naïve Brazilian blood donors. *Transfusion*. 2007; 47(1):97-102.

Sabino, E. C., Shpaer, E. G., Morgado, M. G., Korber, B. T., Diaz, R. S., Bongertz, V., Cavalcante, S., Galvão-Castro, B., Mullins, J. I., & Mayer, A. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelope genes recombinant between subtypes B and F in two epidemiologically linked individuals from Brazil. *Journal of Virology*. 1994; 68(10):6340-6.

Sanabani, S. S., de Pastena, É. R. S., da Costa, A. C., Martinez, V. P., Kleine-Neto, W., de Oliveira, A. C. S., Sauer, M. M., Bassichetto, K. C., Oliveira, S. M. S., Tomiyama, H. T. I., Sabino, E. C., & Kallas, E. G. Characterization of partial and near full-length genomes of HIV-1 strains sampled from recently infected individuals in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE*. 2011; 6(10): e25869.

Sanabani, S. S., De Souza Pastena, Év. R., Neto, W. K., Martinez, V. P., & Sabino, E. C. Characterization and frequency of a newly identified HIV-1 BF1 intersubtype circulating recombinant form in São Paulo, Brazil. *Virology Journal*. 2010; 7:74

Santos, A. F., Sousa, T. M., Soares, E. A. J. M., Sanabani, S., Martinez, A. M. B., Sprinz, E., Silveira, J., Sabino, E. C., Tanuri, A., & Soares, M. A. Characterization of a new circulating recombinant form comprising HIV-1 subtypes C and B in southern Brazil. *AIDS*. 2006; 20(16):2011-9.

Santos-Costa Q, Lopes MM, Calado M, Azevedo-Pereira JM. 2014. HIV-2 interaction with cell coreceptors: amino acids within the V1/V2 region of viral envelope are determinant for CCR8, CCR5 and CXCR4 usage. *Retrovirology* 25;11:99.

Sattentau, Q. J., & Moore, J. P. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *Journal of Experimental Medicine*. 1991; 174(2):407-15

Sharp, P. M., & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2011; 1(1): a006841.

Simon, D., Béria, J. U., Tietzmann, D. C., de Carli, R., Stein, A. T., & Lunge, V. R. Prevalence of HIV-1 subtypes in patients of an urban center in Southern Brazil. *Revista de Saude Publica*. 2010; 44(6):1094-1101

Simon, F., Maucière, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M. C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M. C., Barré-Sinoussi, F., & Brun-VÉZINET, F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine*. 1998; 4(9):1032-7.

Soares, E. A. J. M., Martínez, A. M. B., Souza, T. M., Santos, A. F. A., Da Hora, V., Silveira, J., Bastos, F. I., Tanuri, A., & Soares, M. A. HIV-1 subtype C dissemination in southern Brazil. *AIDS*. 2005;

Steain, M., Wang, B., Dwyer, D., & Saksena, N. HIV-1 co-infection, superinfection and recombination. *Sex Health*. 2004; 1(4), 239–250.



Sterjovski, J., Churchill, M. J., Roche, M., Ellett, A., Farrugia, W., Wesselingh, S. L., Cunningham, A. L., Ramsland, P. A., & Gorry, P. R. CD4-binding site alterations in CCR5-using HIV-1 envelopes influencing gp120-CD4 interactions and fusogenicity. *Virology*. 2011; 410(2):418-28.

Stone, M., Bainbridge, J., Sanchez, A. M., Keating, S. M., Pappas, A., Rountree, W., Todd, C., Bakkour, S., Manak, M., Peel, S. A., Coombs, R. W., Ramos, E. M., Shriver, M. K., Contestable, P., Nair, S. V., Wilson, D. H., Stengelin, M., Murphy, G., Hewlett, I., ... Busch, M. P. Comparison of detection limits of fourth- and fifth-generation combination HIV antigen-antibody, p24 antigen, and viral load assays on diverse HIV isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018; 56(8)

Strebel, K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *AIDS*. 2003; 17(4)

Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., & Martin, M. A. The HIV A (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature*. 1988; 26;328(6132):728-30.

Streeck, H., Jolin, J. S., Qi, Y., Yassine-Diab, B., Johnson, R. C., Kwon, D. S., Addo, M. M., Brumme, C., Routy, J.-P., Little, S., Jessen, H. K., Kelleher, A. D., Hecht, F. M., Sekaly, R.-P., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Carrington, M., & Altfeld, M. Human Immunodeficiency Virus Type 1-Specific CD8+ T-Cell Responses during Primary Infection Are Major Determinants of the Viral Set Point and Loss of CD4+ T Cells. *Journal of Virology*. 2009; 83(15): 7641–7648.

Sucupira, M. C. A., Sanabani, S., Cortes, R. M., Giret, M. T. M., Tomiyama, H., Sauer, M. M., Sabino, E. C., Janini, L. M., Kallas, E. G., & Diaz, R. S. Faster HIV-1 disease progression among Brazilian individuals recently infected with CXCR4-utilizing strains. *PLoS ONE*. 2012; 7(1): e30292.

Suphaphiphat, P., Essex, M., & Lee, T. H. Mutations in the V3 stem versus the V3 crown and C4 region have different effects on the binding and fusion steps of human immunodeficiency virus type 1 gp120 interaction with the CCR5 coreceptor. *Virology*. 2007; 360(1):182-90.

Tanuri, A., Swanson, P., Devare, S., Berro, O. J., Savedra, A., Costa, L. J., Telles, J. G., Brindeiro, R., Schable, C., Pieniazek, D., & Rayfield, M. HIV-1 subtypes among blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1999; 20(1):60-6.

Tebit, D. M., & Arts, E. J. Tracking a century of global expansion and evolution of HIV to drive understanding and to combat disease. *The Lancet Infectious Diseases*. 2011; 11(1):45-56

Thielen, A., Sichtig, N., Kaiser, R., Lam, J., Harrigan, P. R., & Lengauer, T. Improved Prediction of HIV-1 Coreceptor Usage with Sequence Information from the Second Hypervariable Loop of gp120. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010; 202(9):1435-43

Toledo, P. V. M., de Carvalho, D. S., de Rossi, S. G., Brindeiro, R., & de Queiroz-Telles, F. Genetic diversity of human immunodeficiency virus-1 isolates in Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14(3):230-6.

Triques, K., Bourgeois, A., Saragosti, S., Vidal, N., Mpoudi-Ngole, E., Nzilambi, N., Apetrei, C., Ekwalinga, M., Delaporte, E., & Peeters, M. High diversity of HIV-1 subtype F strains in Central Africa. *Virology*. 1999; 259(1):99-109.

Tyssen, D., Henderson, S. A., Johnson, A., Sterjovski, J., Moore, K., La, J., Zanin, M., Sonza, S., Karellas, P., Giannis, M. P., Krippner, G., Wesselingh, S., McCarthy, T., Gorry, P. R., Ramsland, P. A., Cone, R., Paull, J. R. A., Lewis, G. R., & Tachedjian, G. Structure activity relationship of dendrimer microbicides with dual action antiviral activity. *PLoS ONE*. 2010; 5(8):e12309.

UNAIDS. Global AIDS update 2019 — Communities at the centre. Joint United Nations: Programme on HIV/AIDS. 2019.

van der Galiën, R., ter Heine, R., Greupink, R., Schalkwijk, S. J., van Herwaarden, A. E., Colbers, A., & Burger, D. M. Pharmacokinetics of HIV-Integrase Inhibitors During Pregnancy: Mechanisms, Clinical Implications and Knowledge Gaps. *Clinical Pharmacokinetics*. 2019; 58(3):309-323

Varella, R. B., Ferreira, S. B., de Castro, M. B., Tavares, M. D., & Zalis, M. G. Prevalence of resistance-associated mutations in Human Immunodeficiency Virus type 1-positive individuals failing HAART in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2008; 12(5):380-4

Velarde-Dunois, K. G., Guimarães, M. L., La Fuente, C., Andrade, R., Arévalo, R., Pantoja, S., Mariscal, R., Sandoval, R., Iriarte, F., Chamón, V., Melgar, M. L., Carvajal, R., & Morgado, M. G. Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals from Bolivia reveals the presence of two distinct genetic subtypes B and F. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2000; 16(17):1921-6.

Véras, N. M. C., Véras, V. S., Ramalho, E. D., Kyaw, C., Silva, R. R., Brígido, M. M., & Martins, C. R. F. HIV type 1 genetic variability in central Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2007; 23(12):1481-90.

Verhofstede, C., Nijhuis, M., & Vandekerckhove, L. Correlation of coreceptor usage and disease progression. In *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2012; 7(5):432-9

Vicente, A. C. P., Otsuki, K., Silva, N. B., Castilho, M. C., Barros, F. S., Pieniazek, D., Hu, D., Rayfield, M. A., Bretas, G., & Tanuri, A. The HIV epidemic in the Amazon Basin is driven by prototypic and recombinant HIV-1 subtypes B and F. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2000; 23(4):327-31.

Vidal, N., Mulanga, C., Bazepeo, S. E., Lepira, F., Delaporte, E., & Peeters, M. Identification and molecular characterization of subsubtype A4 in Central Africa. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2006; 22(2):182-7

Walensky, R. P., Rosenberg, E. S., Ferraro, M. J., Losina, E., Walker, B. D., & Freedberg, K. A. Investigation of Primary Human Immunodeficiency Virus Infection in Patients Who Test Positive for Heterophile Antibody. *Clinical Infectious Diseases*. 2001; 33(4):570-2.

Yamaguchi, J., McArthur, C., Vallari, A., Sthreshley, L., Cloherty, G. A., Berg, M. G., & Rodgers, M. A. Complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 2019; 83(3):319-322.

Yang, X., & Gabuzda, D. Mitogen-activated protein kinase phosphorylates and regulates the HIV-1 Vif protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(45):29879-87

Yang, X., Goncalves, J., & Gabuzda, D. Phosphorylation of Vif and its role in HIV-1 replication. *Journal of Biological Chemistry*. 1996; 271(17):10121-9

Yolitz, J., Schwing, C., Chang, J., Van Ryk, D., Nawaz, F., Wei, D., Cicala, C., Arthos, J., & Fauci, A. S. Signal peptide of HIV envelope protein impacts glycosylation and antigenicity of gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018; 115(10):2443-2448

Yu, H., Jetzt, A. E., Ron, Y., Preston, B. D., & Dougherty, J. P. The nature of human immunodeficiency virus type 1 strand transfers. *Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273(43):28384-91

Zhang, M., Foley, B., Schultz, A. K., Macke, J. P., Bulla, I., Stanke, M., Morgenstern, B., Korber, B., & Leitner, T. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology*. 2010; 7:25.

Zhao, L. J., Wang, L., Mukherjee, S., & Narayan, O. Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*. 1994; 269(51):32131-7