

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Evolução da resistência *in vivo* aos inibidores da  
transcriptase reversa em mães múltiparas infectadas pelo  
vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 que  
cumpriram regimes terapêuticos para prevenção da  
transmissão do vírus aos seus filhos**

**Ana Filipa Moreira Espinheira**

**Dissertação**

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

**2013**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



**Evolução da resistência *in vivo* aos inibidores da  
transcriptase reversa em mães múltiparas infectadas pelo  
vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 que  
cumpriram regimes terapêuticos para prevenção da  
transmissão do vírus aos seus filhos**

**Ana Filipa Moreira Espinheira**

Dissertação para obtenção do grau de Mestre orientada por

Doutora Elizabeth Pádua, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Professora Doutora Ana Crespo, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

**2013**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram e apoiaram a realização deste estudo, em particular:

À Doutora Elizabeth Pádua, pela oportunidade de realizar este estudo sob a sua orientação. Por todos os conhecimentos transmitidos e, principalmente por ter acreditado em mim, pela constante confiança, motivação e dedicação demonstrada ao longo deste ano.

À Professora Doutora Ana Crespo por ter aceite a co-orientação deste trabalho e pela disponibilidade e apoio demonstrados.

À Ivone Água-Doce e à Catarina Almeida pela disponibilidade, boa disposição e pelos ensinamentos de técnicas e protocolos de laboratório partilhados durante este ano.

À UTI, na pessoa responsável do Doutor Luís Vieira, pelo apoio prestado na sequenciação das amostras estudadas.

Ao Doutor João Piedade do Instituto de Higiene e Medicina Tropical pelo fornecimento de *primers*.

À Professora Deodália Dias pela ajuda e apoio prestados durante os dois anos de mestrado.

À Tania Silva pela entreaajuda, motivação e pela companhia durante os momentos de descontração.

À Janine Diogo, à Ana Correia, à Marília Pereira e ao Rui Reis pela ajuda, amizade e confiança demonstrada.

À minha família, em especial aos meus pais e irmão, por sempre terem impulsionado os meus estudos, confiarem nas minhas capacidades e sempre apoiarem as minhas escolhas.

Obrigada a Todos!

## RESUMO

A transmissão mãe-filho (TMF) é a principal causa de infecção por HIV-1 em crianças nascidas de mães infectadas nos países em vias de desenvolvimento. A elevada diversidade genética do HIV-1 tem um impacto negativo na eficácia do tratamento. A identificação de mutações no gene *pol* do HIV-1 descrita na literatura sugere que a resistência a alguns anti-retrovíricos pode ocorrer rapidamente, principalmente em situações de baixa adesão à terapêutica.

O presente estudo pretendeu caracterizar a diversidade genética da região da transcriptase reversa (RT) do gene *pol* numa população de mães multíparas infectadas por HIV-1, avaliar a proporção de mutações de resistência aos inibidores da transcriptase reversa (RTI) em função dos regimes de terapia anti-retrovírica (TAR) de prevenção da TMF administrados entre 1999 e 2008.

Um grupo de 68 amostras colhidas pós parto a 34 mães multíparas infectadas por HIV-1 foram submetidas a amplificação de uma região da RT por *nested* PCR, seguindo-se a sequenciação dos produtos amplificados e classificação molecular das sequências obtidas por análise filogenética.

A proporção de mães que cumpriram TAR de prevenção da TMF aumentou de 85,3% (1ª gravidez) para 94,1% (2ª gravidez). A prevenção em regime de terapia tripla (TT) ocorreu em 66,2% dos casos, a terapia dupla (TD) em 8,8% dos casos (administrada apenas até 2003) e a prevenção por HAART em 14,7% dos casos (administrada só depois de 2005). Associados à ausência de prevenção foram diagnosticados 2 casos de TMF do HIV-1.

Foi obtida uma sensibilidade de 97% para a amplificação da região RT e um sucesso de 89,4% na sequenciação das amostras amplificadas. A classificação das sequências revelou uma prevalência de 42,4% do subtipo G, de 28,8% do subtipo B, de 13,6% do subtipo C, de 3,4% do subtipo A, de 1,7% do subtipo D, e ainda, foram identificadas duas formas recombinadas CRF02\_AG e CRF14\_BG/CRF02\_AG.

Observou-se um aumento na proporção de mutações de resistência aos RTI de 32,1% para 38,7%, partindo do grupo de 1<sup>as</sup> amostras (1º filho) para o grupo de 2<sup>as</sup> amostras (2º filho) analisadas. As mutações M184V e L74V (associadas a elevados

níveis de resistência aos NRTI) e as mutações K103N, Y181C e Y188L (associadas a elevados níveis de resistência aos NNRTI) foram identificadas no grupo de sequências analisadas. Foram encontradas mutações de resistência aos RTI (T215Y, K219Q e V179D) em mães que não transmitiram o vírus e não fizeram prevenção da TMF. De um modo geral, constatou-se maior prevalência de mutações associadas aos NRTI, nomeadamente ao AZT.

A avaliação da proporção de mutações de resistência aos RTI revelou um incremento na sua proporção e diversidade, a partir do grupo de sequências associadas a regimes de TD para o grupo de sequências associadas a regimes de TT. Contrariamente ao descrito na literatura, uma percentagem significativa de mutações de resistência de 22,2% foi encontrada no grupo de sequências derivadas de mães que cumpriram prevenção da TMF por HAART.

Estudos de maior amostragem e alargados a outras regiões genómicas do HIV-1 podem conduzir a uma melhor avaliação clínica sobre a influência de mutações de resistência na eficácia dos regimes terapêuticos para tratamento e prevenção da TMF e também melhorar a classificação dos vírus.

**PALAVRAS-CHAVE:** Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo 1 (HIV-1); Transmissão Mãe-Filho (TMF); Inibidores da Transcriptase Reversa (RTI); Mutações de Resistência; Terapia anti-retrovírica (TAR).

## ABSTRACT

The mother-to-child transmission (MTCT) is the leading cause of HIV-1 infection in children born to infected mothers in developing countries. The high genetic diversity of HIV-1 has a negative impact on the effectiveness of the treatment. The identification of mutations in the *pol* gene of HIV-1 described in the literature suggests that resistance to antiretroviral drugs can occur rapidly, especially in situation of low adherence.

The present study aimed to characterize the genetic diversity of the reverse transcriptase (RT) in a population of multiparous mothers infected with HIV-1, assess the proportion of mutations conferring resistance to reverse transcriptase inhibitors (RTI) according to the fulfillment of antiretroviral therapy regimens (ART) for preventing MTCT between 1999 and 2008.

A group of 68 samples collected postpartum to 34 multiparous infected mothers were submitted to nested PCR, followed by sequencing of the RT region. The molecular classification of sequences was performed by phylogenetic analysis.

The prevention of MTCT was increased from 85.3% (first pregnancies) to 94.1% (second pregnancies) in the group of multiparous mothers studied. The regimens for prevention under triple therapy (TT) have occurred in 66.2% of cases, dual therapy (DT) in 8.8% of cases (administered only until 2003) and HAART prevention in 14.7% of cases (administered only after 2005). Two cases of TMF of HIV-1 were associated to absence of prevention during pregnancy.

Sensitivity of 97% for the amplification assay and a success of 89.4% for sequencing the RT region were achieved by the methodology implemented. The classification of the sequences obtained from the group studied revealed the prevalence of 42.4% for subtype G, 28.8% for subtype B, 13.6% for subtype C, 3.4% for subtype A, 1.7% for subtype D, and additionally, two putative recombinants CRF02\_AG and CRF14\_BG/CRF02\_AG.

Among the analyzed groups, from the first to the second maternal samples, we observed an increase in the proportion of resistance mutations to RTI from 32.1% to 38.7%. The mutations L74V and M184V (associated with high levels of resistance to

NRTIs) and the mutations K103N, Y181C and Y188L (associated with high levels of resistance to NNRTIs) have been identified. In absence of prevention of MTCT, resistance mutations to RTIs like, T215Y, K219Q and V179D, were found in mothers who did not transmitted the virus to their children. In general, there was a higher prevalence of mutations associated with NRTIs, specifically to AZT.

An increase in the proportion and diversity of resistance mutations to RTIs was observed from the group that fulfilled TD regimen to the group that fulfilled TT regimen. However, contrary to data described in literature, a significant proportion of resistance mutations of 22% was found in the group of sequences derived from infected mothers in which was fulfilled the HAART regimen for preventing MTCT of HIV-1.

Enlarged studies, comprising more samples and analysis of other genomic regions of HIV-1, may lead to a better clinical evaluation of the influence of resistance mutations and efficacy of the regimens for treatment and prevention of MTCT and also to improve the classification of viruses.

**KEY-WORDS:** Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1); Mother-to-Child Transmission (MTCT); Reverse Transcriptase Inhibitors (RTI); Resistance Mutations; Antiretroviral Therapy.

## ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE GERAL.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).....	2
1.2 Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1.....	3
1.2.1 Morfologia e organização genómica do virião.....	3
1.2.2 Principais fases do ciclo replicativo do vírus.....	5
1.3 Diversidade Genética.....	5
1.3.1 Classificação do HIV-1.....	5
1.3.2 Epidemiologia molecular da infecção.....	6
1.3.3 Principais causas e consequências da diversidade genética.....	8
1.4 Transmissão da Infecção.....	8
1.4.1 Principais vias de transmissão.....	8
1.4.2 Via de transmissão mãe-filho.....	9
1.4.3 Prevenção da transmissão mãe-filho.....	10
1.5 Tratamento da Infecção por HIV-1.....	11
1.5.1 Terapêutica anti-retrovírica.....	11
1.5.2 Inibidores da transcriptase reversa.....	12
1.5.3 Inibidores da protease.....	12
1.5.4 Regimes terapêuticos.....	13
1.6 Resistência Associada à Terapia Anti-Retrovírica.....	13
1.7 Mecanismos de Resistência aos Anti-Retrovíricos.....	14
1.7.1 Resistência aos NRTI.....	14
1.7.2 Resistência aos NNRTI.....	16
1.8 Monitorização de Resistências aos Anti-Retrovíricos.....	16

<b>2. OBJECTIVOS</b> .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1 Desenho do estudo.....	21
3.2 População estudada.....	22
3.3 Extracção do DNA proviral do HIV-1.....	22
3.4 Selecção e Preparação dos <i>Primers</i> .....	23
3.5 Amplificação por <i>Nested</i> PCR da Região RT do Gene <i>pol</i> do HIV-1.....	24
3.5.1 Condições das reacções de amplificação.....	24
3.6 Detecção dos Produtos de PCR.....	25
3.7 Purificação dos Produtos de PCR.....	26
3.8 Sequenciação dos Fragmentos de DNA Amplificados.....	27
3.9 Análise Bioinformática de Sequências Nucleotídicas.....	28
3.9.1 Construção de sequências “consenso”.....	28
3.9.2 Análise por BLAST.....	29
3.9.3 Inferência filogenética.....	29
3.9.4 Análise por <i>bootscanning</i> .....	30
3.9.5 Tradução de sequências nucleotídicas em aminoacídicas.....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
4.1 Caracterização da População Estudada.....	32
4.2 Amplificação e Sequenciação da região RT.....	34
4.3 Análise Bioinformática das Sequências Obtidas.....	35
4.3.1 Construção de sequências “consenso” e análise por BLAST.....	35
4.3.2 Classificação das sequências por estimativa filogenética.....	36
4.4 Análise das Sequências Aminoacídicas.....	43
4.4.1 Avaliação da proporção de mutações de resistência aos RTI.....	44
4.4.2 Caracterização de polimorfismos naturais da região RT.....	56
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	73
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	76
<b>8. ANEXOS</b> .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZT	Zidovudina, do inglês <i>zidovudine</i>
ABC	Abacavir
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumine</i>
CA	Proteína da cápside, do inglês <i>capsid protein</i>
CCR5	<i>CC chemokine receptor 5</i>
CD4	Receptor celular, do inglês <i>cluster of differentiation type 4</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico
CRF	Forma recombinada em circulação, do inglês <i>circulating recombinant form</i>
CXCR4	<i>CXC chemokine receptor 4</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleótido 5'-trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético, do inglês <i>ethylene diamine tetracetic acid</i>
EFV	Efavirenz
ETV	Etravirina, do inglês <i>etravirine</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTC	Emtricitabina, do inglês <i>emtricitabine</i>
gp	Glicoproteína
HAART	Terapia anti-retrovírica de elevada eficácia, do inglês <i>highly active anti-retroviral therapy</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>human immunodeficiency virus</i>
IC	Concentração inibitória, do inglês <i>inhibitory concentration</i>
IN	Integrase, do inglês <i>integrase</i>
INI	Inibidores da integrase, do inglês <i>integrase inhibitors</i>
INSA	Instituto Nacional de Saúde
LTR	Regiões repetitivas terminais longas, do inglês <i>long terminal repeats</i>
MA	Proteína de matriz, do inglês <i>matrix protein</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
MF1	Amostra materna associada ao nascimento de um primeiro filho
MF2	Amostra materna associada ao nascimento de um segundo filho
NC	Proteína da nucleocápside, do inglês <i>nucleocapsid protein</i>

nm	Nanómetro
NNRTI	Inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa, do inglês <i>non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
NRTI	Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa, do inglês <i>nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
NVP	Nevirapina, do inglês <i>nevirapine</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PI	Inibidores da protease, do inglês <i>protease inhibitors</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PR	Protease, do inglês <i>protease</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
RT	Transcriptase reversa, do inglês <i>reverse transcriptase</i>
RTI	Inibidores da transcriptase reversa, do inglês <i>reverse transcriptase inhibitors</i>
RTC	Complexo de transcrição reversa, do inglês <i>reverse transcription complex</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia, do inglês <i>simian immunodeficiency virus</i>
SU	Glicoproteína da superfície, do inglês <i>surface glycoprotein</i>
TAE	Tampão tris-acetato EDTA
TAM	Mutações associadas aos análogos da timidina, do inglês <i>thymidine analogue associated mutations</i>
TAR	Terapia anti-retrovírica
TD	Terapia dupla
TM	Glicoproteína transmembranar, do inglês <i>transmembrane glycoprotein</i>
TMF	Transmissão mãe-filho
TT	Terapia tripla
U	Unidade da actividade enzimática
URF	Forma recombinada única, do inglês <i>unique recombinant form</i>
UTI	Unidade de Tecnologia e Inovação
3TC	Lamivudina, do inglês <i>lamivudine</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### 1. INTRODUÇÃO

<b>Figura 1 -</b>	Representação esquemática de um virião de HIV – 1.....	3
<b>Figura 2 -</b>	Representação esquemática do genoma proviral do HIV-1.....	4
<b>Figura 3 -</b>	Distribuição das sequências de HIV-1 originárias de Portugal depositadas na base de dados de <i>Los Alamos HIV Sequence Database</i> .....	7
<b>Figura 4 -</b>	Representação esquemática das mutações descritas para a região da RT do gene <i>pol</i> que conferem resistência aos NRTI .....	15
<b>Figura 5 -</b>	Representação esquemática das mutações descritas para a região da RT do gene <i>pol</i> que conferem resistência aos NNRTI .....	16

### 2. RESULTADOS

<b>Figura 6 -</b>	Produtos amplificados por <i>nested</i> PCR da região da RT do gene <i>pol</i> , visualizados após electroforese em gel de agarose.....	34
<b>Figura 7 -</b>	Árvore filogenética do grupo de 34 mães multíparas obtida com base num fragmento da região RT do gene <i>pol</i> do HIV-1.....	37
<b>Figura 8 -</b>	Árvore filogenética do grupo de sequências não classificadas na primeira árvore com base num fragmento da região RT do gene <i>pol</i> do HIV-1.....	40
<b>Figura 9 -</b>	Análise por <i>bootscanning</i> da sequência M15F1 para identificação de eventos de recombinação genética em RT.....	41
<b>Figura 10 -</b>	Análise por <i>bootscanning</i> da sequência M15F2 para identificação de eventos de recombinação genética em RT.....	41
<b>Figura 11 -</b>	Representação gráfica da proporção relativa dos subtipos de HIV-1 que infectam o grupo populacional do estudo.....	43
<b>Figura 12 -</b>	Distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de primeiras amostras pelo número de mutações de resistência aos RTI observado em cada uma das sequências derivadas de amostras colhidas até 2005.....	54
<b>Figura 13 -</b>	Distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de segundas amostras pelo número de mutações de resistência aos RTI observado em cada uma das sequências derivadas de amostras colhidas após 2005.....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

<b>Tabela 1 -</b>	<i>Primers</i> utilizados na 1ª e 2ª reacção de amplificação.....	23
<b>Tabela 2 -</b>	Programa de amplificação usado na 1ª reacção de PCR da região <i>pol</i> do HIV-1.....	25
<b>Tabela 3 -</b>	Programa de amplificação usado na 2ª reacção de PCR para a região da RT do gene <i>pol</i> do HIV-1.....	25
<b>Tabela 4 -</b>	Programa de sequenciação nucleotídica.....	28

### 4. RESULTADOS

<b>Tabela 5 -</b>	Distribuição das amostras estudadas por ano de colheita e tipo de terapia anti-retrovírica.....	33
<b>Tabela 6 -</b>	Resultados obtidos da análise por BLAST.....	35
<b>Tabela 7 -</b>	Classificação filogenética das sequências em estudo.....	38
<b>Tabela 8 -</b>	Frequência das mutações de resistência aos RTI nas sequências aminoacídicas “consenso” observadas nas primeiras e segundas amostras maternas.....	45
<b>Tabela 9 -</b>	Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas nas sequências derivadas de amostras colhidas antes e depois do ano de 2003.....	47
<b>Tabela 10 -</b>	Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas nas sequências correspondentes a mães que cumpriram TAR de prevenção e mães que não cumpriram qualquer medida de prevenção da transmissão do HIV-1 ao filho.....	49
<b>Tabela 11 -</b>	Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas nas sequências correspondentes a mães que não cumpriram TAR de prevenção e em que ocorreu e em que não ocorreu transmissão do vírus ao filho.....	50
<b>Tabela 12 -</b>	Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas em grupos de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de mães que cumpriram TD, TT e HAART.....	52
<b>Tabela 13 -</b>	Polimorfismos naturais da região RT do gene <i>pol</i> do HIV-1 observados no conjunto de sequências aminoacídicas “consenso” analisadas.....	58

# **1. INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) é o nome dado ao estágio final da infecção causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) [1] e caracteriza-se por uma disfunção progressiva do sistema imunitário, associada a uma depleção dos linfócitos T CD4+ (do inglês, *cluster of differentiation type 4*), conduzindo ao aparecimento de infecções oportunistas bacterianas, virais ou parasitárias, e em muitos casos, neoplasias graves [2].

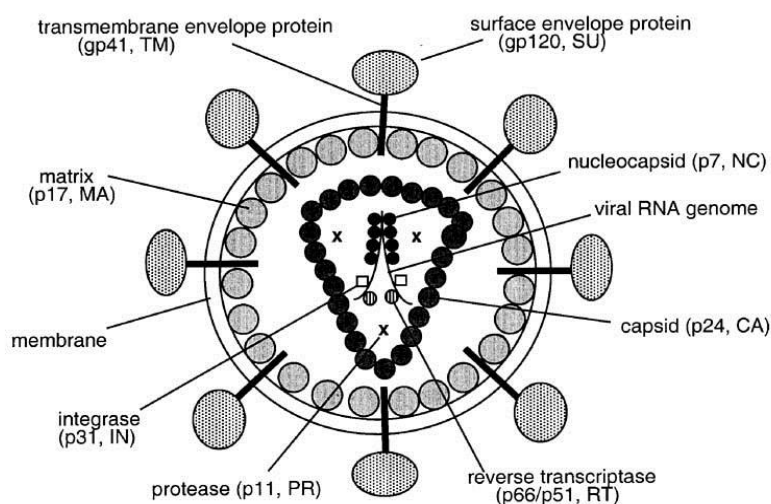
A descoberta do agente etiológico da SIDA ocorreu em 1983, quando a equipa de Luc Montagnier, do Instituto Pasteur de Paris, isolou um vírus, que continha a enzima transcriptase reversa, a partir de um gânglio linfático de um paciente com linfadenopatias generalizadas [3]. Pouco tempo mais tarde, em 1986, a mesma equipa de investigadores, isolou um segundo retrovírus de indivíduos com SIDA originários da África Ocidental [4]. Estes vírus foram classificados pela ordem cronológica da sua descoberta em HIV tipo 1 e HIV tipo 2, e pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e género *Lentivirus* [5].

Embora partilhem características morfológicas e biológicas, os dois tipos de vírus diferem entre si ao nível da sequência nucleotídica em cerca de 60% [4,5]. Enquanto o HIV-1 é considerado clinicamente mais virulento e está globalmente disseminado na população humana, o HIV-2 caracteriza-se por ser epidémico com progressão mais lenta para doença e a infecção encontra-se restrita a alguns países da África Ocidental [4,8].

## 1.2 Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1

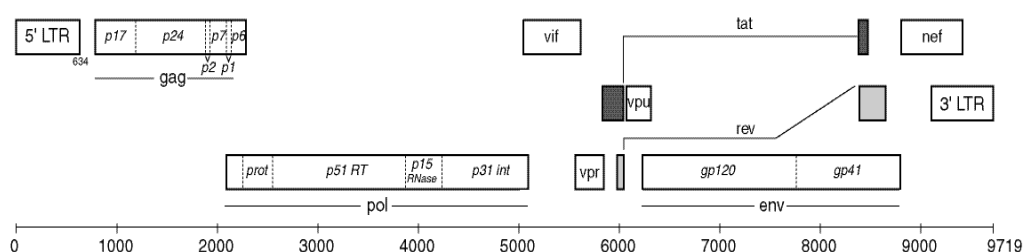
### 1.2.1 Morfologia e organização genômica do virião

O virião apresenta uma estrutura esférica de reduzida dimensão, aproximadamente 110 nm de diâmetro [9] apresentando um invólucro vírico. Neste invólucro encontram-se inseridas duas glicoproteínas, a gp120 – SU (do inglês, *surface protein*) e a gp41 – TM (do inglês, *transmembrane protein*), responsáveis pela entrada do vírus nas células alvo, após a sua ligação a receptores e co-receptores específicos presentes na membrana celular [10,11]. Interiormente ao invólucro encontra-se a matriz proteica essencial para a integridade da partícula vírica, constituída pela proteína p17 – MA (do inglês, *matrix protein*), e internamente à matriz proteica, a cápside vírica com a forma de cone truncado constituída pela proteína p24 – CA (do inglês, *capsid protein*) [8,10,12]. No interior da cápside encontra-se o genoma associado a proteínas da nucleocápside p7 – NC (do inglês, *nucleocapsid protein*), também três importantes enzimas [a protease p11 – PR (do inglês, *protease*), a transcriptase reversa p66/p51 – RT (do inglês, *reverse transcriptase*) e a integrase p31 – IN (do inglês, *integrase*)], e ainda as proteínas auxiliares ou acessórias Vif, Vpr e Nef [13-15] (Figura 1).



**Figura 1** – Representação esquemática de um virião de HIV-1 (disponível em [www.landesbioscience.com](http://www.landesbioscience.com)).

O genoma do HIV-1 é dimérico, composto por duas moléculas de RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) de cadeia simples e sentido positivo, com cerca de 9,8 Kb [10,16]. À semelhança de outros retrovírus, o genoma do HIV-1 é constituído por três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) que codificam proteínas estruturais do invólucro e enzimáticas do virião, quatro genes auxiliares ou acessórios (*nef*, *vif*, *vpr* e *vpu*) e dois genes reguladores (*tat* e *rev*) (Figura 2). Nas extremidades 5' e 3', o DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) proviral, contém regiões repetitivas terminais longas, LTR (do inglês, *long terminal repeats*), que controlam a transcrição do genoma vírico e regulam a produção dos viriões [17].



**Figura 2** – Representação esquemática do genoma proviral do HIV-1 [18].

Todos os genes víricos apresentam funções essenciais no ciclo replicativo do vírus. Porém, o gene *pol* pode destacar-se pela sua associação na produção de proteínas víricas enzimáticas com importantes funções: a protease (PR) responsável pela clivagem do precursor poliproteico *Gag-Pol* para maturação e aquisição da capacidade infecciosidade do virião, a transcriptase reversa (RT) que realiza a retrotranscrição das cadeias do genoma de RNA simples para a forma de DNA de cadeia dupla o que permitirá a acção da enzima integrase (IN) na integração deste DNA proviral no genoma da célula hospedeira [11,18].

## 1.2.2 Principais etapas do ciclo replicativo

O início do ciclo replicativo do HIV-1 corresponde à **adsorção do vírus** à célula-alvo através da  **fusão do invólucro** vírico com a membrana citoplasmática. A ligação da gp120 ao receptor celular (molécula CD4) vai induzir a alterações conformacionais. Nesta nova conformação a gp120 estabelece uma interacção com um co-receptor (sendo o CCR5 ou CXCR4 os mais frequentemente utilizados), o que induz a um rearranjo conformacional da gp41 com posterior fusão com a membrana celular e a entrada do vírus na célula [19,20]. Após o processo de fusão ocorre a **entrada da cápside** vírica para o interior da célula alvo [11]. Uma vez no seu interior, a cápside é destruída por acção de enzimas celulares, processo denominado de **descapsidação**. A nucleocápside bem como o RNA e as proteínas víricas e enzimáticas que formam o complexo de transcrição reversa (RTC, do inglês *reverse transcription complex*), iniciam o processo de **retrotranscrição**, sendo a transcriptase reversa activada para a síntese do cDNA (do inglês, *complementary deoxyribonucleic acid*) a partir do RNA vírico [11,14]. Após várias etapas auxiliadas por diferentes proteínas e enzimas víricas ocorre a síntese do provírus, DNA vírico de dupla cadeia ladeado pelas LTR, que será transportado até ao núcleo, para a **integração** do genoma na célula hospedeira por acção da integrase [12,21]. Seguidamente ocorre a **transcrição** do provírus, conduzindo a síntese de RNA víricos, que são transportados para fora do núcleo para que ocorra a **tradução** das proteínas víricas [21]. Estas proteínas irão formar uma nova partícula vírica imatura cuja **montagem** é feita junto da membrana celular hospedeira. A saída das partículas víricas da célula ocorre por **gemulação** [21,22]. Após a libertação, as partículas víricas irão sofrer um rearranjo e serão submetidas à acção de proteases víricas para aquisição de infecciosidade, processo denominado de **maturação** [8,23]. Completa-se assim o ciclo replicativo do HIV-1, com a produção de viriões livres capazes de infectar novas células [22].

## 1.3 Diversidade Genética

### 1.3.1 Classificação do HIV-1

A análise molecular de estirpes HIV-1 identificadas ao longo do tempo e em diferentes regiões do mundo tem permitido comprovar a elevada diversidade de vírus em circulação na população humana e evidenciar também a necessidade de seguir regras para a classificação dos vírus. De acordo com a distribuição actual dos vírus, estes podem ser encontrados em quatro grupos: grupo M (*major*), grupo O (*outlier*), grupo N

(*new*) [24-26], e mais recentemente o grupo P (*non-M, non-O, non-N*) [27]. O grupo M é o que engloba uma maior diversidade genética entre os vírus, sendo composto pela maioria dos vírus responsáveis pela actual pandemia da SIDA [26,28-30]. Este grupo divide-se em 9 subtipos (A-D, F-H, J e K), e que em termos moleculares são equidistantes entre si [26,28,31,32]. Dentro dos subtipos, é ainda possível identificar isolados víricos, genética e filogeneticamente mais relacionados entre si que os outros subtipos, denominados de sub-subtipos. É o caso dos subtipos A e F, cujos membros estão respectivamente classificados em sub-subtipos de A1 a A4 e de F1 a F2 [33,34]. O grupo O, N e P são classificados por vírus divergentes, estando a infecção praticamente restrita à região da África Centro-Ocidental e dos Camarões, sendo a sua prevalência na pandemia relativamente baixa [25,27,30,35,37].

A co-circulação de vírus de subtipos diferentes do HIV-1, numa determinada área geográfica, favorece o aparecimento de formas víricas com genomas geneticamente recombinados [38,39]. Existem dois tipos de formas víricas: as CRF e as URF. As CRF (do inglês, *circulating recombinant forms*) são definidas por formas víricas com importância epidemiológica já que se encontram disseminadas e apresentam um impacto significativo na pandemia da infecção [24,34,40]. As URF (do inglês, *unique recombinant forms*) correspondem a formas genómicas únicas, identificadas num único indivíduo ou num grupo de indivíduos epidemiologicamente relacionados, e por isso, não se conhece à partida, a seu potencial de transmissão e disseminação na população [6,40,41].

Actualmente, a nível mundial, estão identificados 58 CRF (disponível em <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/CRFs/CRFs.html> - acedido a 4/9/13).

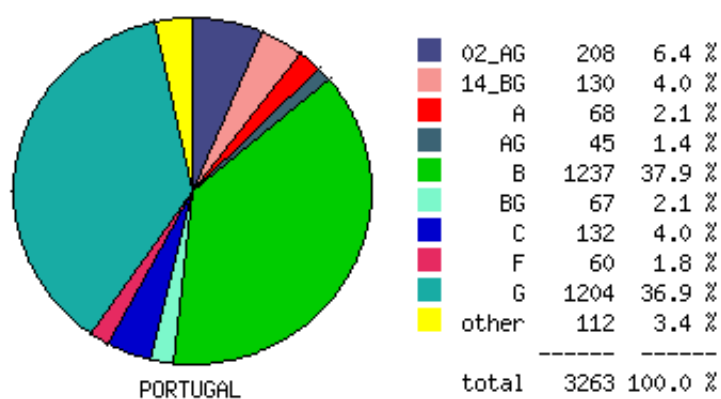
### **1.3.2 Epidemiologia molecular da infecção**

A maior parte das infecções, a nível mundial, são causadas pelos subtipos A, B e, particularmente pelo subtipo C, sendo este associado a mais de 50% do número estimado de infecções a nível global [38,42]. Apesar de uma origem comum, a distribuição geográfica dos diferentes subtipos dos vírus do grupo M é bastante heterogénea e muito influenciada pelos movimentos migratórios das populações [38]. O subtipo A é predominante na Europa de Leste, África Central e Oriental e Norte da Ásia. O subtipo B, embora cause apenas 12% das infecções do HIV-1 estimadas a nível global, predomina na Europa, América do Norte e Austrália [43,44,45,46]. Os subtipos não-B surgem como introduções mais recentes, em países fora do continente africano

[38,45,47]. O subtipo C prevalece em países localizados a sul do continente africano e na Índia [48]. Os restantes subtipos podem ser encontrados na África, embora em prevalência relativamente reduzida [28,38].

A CRF01\_AE e a CRF02\_AG, que circulam, respectivamente, no Sudoeste Asiático e na África Ocidental, são as formas víricas recombinadas com maior impacto na pandemia da infecção [38,48].

Em Portugal, os subtipos mais prevalentes são os subtipos B e G e as CRF02\_AG e CRF14\_BG (Figura 3) [49-53].



**Figura 3** – Distribuição das sequências de HIV-1 originárias de Portugal existentes na base de dados de *Los Alamos HIV Sequence Database* (disponível em <http://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp> - acedido a 20/7/13).

### 1.3.3 Principais causas e consequências da diversidade genética

A elevada variabilidade genética do HIV-1 é o resultado de uma combinação de diversos factores:

- a) Taxa de replicação vírica rápida (*turnover* vírico elevado) com produção de um elevado número de descendentes, estimando-se que sejam produzidas  $10^{10}$  novas partículas víricas por dia [54-56];
- b) Ausência de actividade de *proofreading* da enzima RT que não possui capacidade de correcção de erros aleatoriamente introduzidos e que conduz à elevada taxa de mutações (substituições, inserções, deleções) [55,57,58];
- c) Elevada taxa de recombinação genética devida à própria actividade da RT descrita como “salto entre cadeias” e que é facilitada pelo genoma dimérico do HIV-1 [57].

A combinação dos factores acima mencionados conduz à formação de populações víricas mais ou menos heterogéneas, mas geneticamente relacionadas entre si, reconhecidas como *quasispecies*, que ao longo da infecção variam em resultado das condições de pressão selectiva impostas pelo hospedeiro (imunológicas) [59] ou pela terapia anti-retrovírica (TAR) [60]. A presença destas variantes e a sua diversidade confere uma versatilidade ao HIV-1 que por um lado lhe permite escapar ao sistema imunitário do hospedeiro, e por outro, conduz ao aparecimento de variantes resistentes à TAR [56,61].

## 1.4 Transmissão da Infecção

### 1.4.1 Principais vias de transmissão

A transmissão de HIV-1 ocorre, principalmente, através do contacto com líquidos orgânicos (sangue, esperma e secreções vaginais) de indivíduos infectados, sendo as principais formas de transmissão a sexual, a sanguínea e a transmissão vertical (transmissão mãe-filho) [62].

Historicamente, os primeiros casos de infecção por HIV-1 ocorreram entre homossexuais masculinos, no entanto, nos últimos anos verificou-se um aumento dos casos entre heterossexuais. A transmissão do vírus entre utilizadores de drogas por via endovenosa têm vindo a aumentar, generalizando-se em alguns locais da Europa

Oriental, América e Ásia [63,64]. Comportamentos de risco, como a partilha de seringas e material contaminado fazem a população de toxicod dependentes um dos grupos populacionais mais afectados pela infecção por HIV e o principal grupo responsável pela disseminação do vírus na população.

Tornou-se posteriormente evidente que grávidas infectadas pelo vírus apresentam um grande risco de o transmitir aos seus filhos [65,66].

#### **1.4.2 Via de transmissão mãe-filho**

A transmissão mãe-filho (TMF) é a principal causa de infecção por HIV-1, em crianças e jovens com idades inferiores a 15 anos. Estima-se que diariamente, 1700 crianças nascem infectadas por HIV-1 e que outras 300 adquirem a infecção através da amamentação [67,68]. Do total de crianças infectadas pelo vírus, cerca de 90% nasceram no continente africano [69].

Na ausência de qualquer intervenção preventiva, o risco de transmissão da infecção ao filho, de uma mãe infectada, pode variar entre 15-25% nos países industrializados, e de 25-35% nos países em via de desenvolvimento. Estas diferenças são explicadas pela frequência e duração do período de amamentação [68,70].

A TMF pode ocorrer de três formas distintas: *in utero*, *intrapartum* ou através da amamentação. A transmissão *in utero* ocorre através da exposição do feto às células infectadas presentes no líquido amniótico ou na placenta. A transmissão *intrapartum* surge como resultado de micro-transfusões entre o sangue materno e fetal ou após a ruptura das membranas na altura do parto [71]. Durante a amamentação as células infectadas presentes no leite materno podem penetrar a mucosa do tracto intestinal, ou entrar directamente na corrente sanguínea do recém-nascido, e assim ocorrer a transmissão do vírus [72]. Estudos evidenciaram que 65% dos casos de TMF de HIV ocorrem durante o parto [73-75].

Em Portugal, até ao final de 2012, foram notificados ao Núcleo de Vigilância Laboratorial de Doenças Infecciosas, 385 casos de TMF, correspondendo a 0,9% do total de casos de infecção por HIV/SIDA notificados [76].

No entanto, nem todas as mães transmitem o vírus aos seus filhos. Um estudo conduzido pelo Laboratório Nacional de Referência HIV e Hepatites B e C, entre 1999 e 2005, que incluiu o seguimento de crianças nascidas de mães infectadas por HIV, revelou uma média nas taxas anuais de TMF de 3,4% para HIV-1 [77,78]. Dados não publicados, disponíveis no laboratório e correspondentes aos últimos 5 anos, mostram

um decréscimo significativo da proporção de transmissão da infecção mãe-filho do HIV-1 para taxas próximas dos 2%. A redução da taxa de transmissão do HIV-1 foi associada a um incremento no cumprimento de TAR durante a gravidez como uma das estratégias de prevenção da transmissão vertical do vírus.

### **1.4.3 Prevenção da transmissão mãe-filho**

Nos últimos anos, o espectro de doenças pediátricas, associadas à infecção por HIV-1, foi, visivelmente modificado pela disponibilidade de múltiplos fármacos anti-retrovíricos e pelas várias opções terapêuticas no tratamento da infecção [79,80].

Um dos maiores avanços na prevenção da transmissão de HIV-1 de mães infectadas aos seus filhos, tem sido a introdução de medidas preventivas da transmissão do vírus quer durante a gravidez, quer nos recém-nascidos até as 4-6 semanas de vida com simultâneo desaconselhamento da amamentação das crianças [81]. A disponibilidade de vários regimes de TAR na prevenção da transmissão do vírus da mãe ao filho, a evolução da metodologia para o diagnóstico precoce da infecção nos recém-nascidos, bem como o uso de marcadores de monitorização da infecção e de progressão da doença, permitem o tratamento de grávidas e de crianças infectadas na altura mais adequada, prevenindo a progressão para SIDA.

O rastreio de anti-corpos anti-HIV a todas as grávidas, recomendado por uma circular normativa da Direcção Geral de Saúde em 2003, conduziu ao declínio da transmissão do vírus, possibilitando a identificação e tratamento precoce da infecção HIV durante a gestação [79,80,82,83].

Nos países desenvolvidos, onde se observa uma elevada adesão aos regimes anti-retrovíricos, o risco de TMF tem diminuído acentuadamente. Contudo, nos países em desenvolvimento, esta infecção continua a ser um problema de saúde pública, uma vez que existe restrição no acesso aos anti-retrovíricos [84].

O primeiro anti-retrovírico, licenciado em 1987, para o tratamento da SIDA foi o fármaco zidovudina (AZT) [1]. Desde 1994, a quando da publicação dos resultados do primeiro ensaio clínico para prevenção da transmissão vertical do HIV, que a administração do AZT é efectuada por rotina a mulheres grávidas infectadas por HIV-1 [85].

Os avanços no conhecimento do tratamento, monitorização da infecção e a disponibilidade de diferentes anti-retrovíricos permitiram a formulação de regimes terapêuticos mais complexos, com administração de fármacos de várias classes [86], de

forma a suprimir a replicação vírica, minimizar o aparecimento de resistências e preservar o sistema imunitário [87].

Em Portugal, os primeiros protocolos terapêuticos para a prevenção da TMF de HIV-1 foram implementados em 1997, seguindo as linhas de orientação internacionais, que também sofreram alterações no tempo. De regimes terapêuticos de prevenção simples, com apenas AZT (monoterapia), passaram a implementar-se ao longo do tempo regimes terapêuticos mais complexos (terapia dupla, e actualmente, a terapia de elevada eficácia – HAART). A implementação destes regimes terapêuticos tem permitido uma melhoria na prevenção da TMF, que pode ser comprovado pela redução das taxas de transmissão vertical, superiores a 20% até 1996, para taxas próximas dos 2% entre 2005 e 2012 [76,78].

## **1.5 Tratamento da Infecção por HIV-1**

### **1.5.1 Terapêutica anti-retrovírica**

Dadas as características do HIV-1 e da infecção associada a estes vírus, bem como ainda a ausência de uma vacina eficaz contra o vírus, levam a uma constante procura de novos anti-retrovíricos para o tratamento. A procura de novos alvos terapêuticos e novos anti-retrovíricos com diferentes mecanismos de acção têm sido os principais objectivos no combate à infecção HIV/SIDA [88]. Até ao momento estão aprovados pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) mais de duas dezenas de fármacos para o tratamento da infecção, sendo agrupados em seis diferentes classes, de acordo com o seu mecanismo de acção (disponível em <http://www.fda.gov/> - acedido a 6/8/13). As três classes que incluem os anti-retrovíricos mais frequentemente administrados nos regimes terapêuticos são [89]:

- 1) Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTI, do inglês *nucleoside reverse transcriptase inhibitors*);
- 2) Inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTI, do inglês *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*);
- 3) Inibidores da protease (PI, do inglês *protease inhibitors*).

### 1.5.2 Inibidores da Transcriptase Reversa

Os inibidores da transcriptase reversa (RTI, do inglês *reverse transcriptase inhibitors*) continuam, ainda hoje, a fazer parte dos regimes terapêuticos de primeira opção. No contexto geral de “inibidores da transcriptase reversa” podemos distinguir a classe dos NRTI (inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa) e a classe dos NNRTI (inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa) através dos seus mecanismos de acção.

a) Os **NRTI** são inibidores competitivos que exercem a sua actividade anti-retrovírica após serem activados por um processo de fosforilação celular, sendo depois incorporados no DNA retrotranscrito, recentemente sintetizado, através da RT por competição com dNTP naturais existentes na célula. A incorporação de um NRTI na cadeia de cDNA leva à terminação da sua síntese [90,91]. Actualmente encontram-se aprovados pela FDA oito NRTI distintos (disponível em <http://www.fda.gov/> - acedido a 6/8/13). Dos NRTI aprovados, apenas quatro (zidovudina [AZT], lamivudina [3TC], abacavir [ABC] e emtricitabina [FTC]) fazem parte dos esquemas terapêuticos de primeira opção [89].

b) Os **NNRTI** são inibidores não competitivos e ligam-se directamente à RT do HIV-1 numa região hidrofóbica da enzima, induzindo uma alteração conformacional no seu centro activo resultando na perda da sua importante função no ciclo replicativo do vírus [92,93]. São cinco os NNRTI aprovados pela FDA (disponível em <http://www.fda.gov/> - acedido a 6/8/13), no entanto, em Portugal apenas três fármacos (nevirapina [NVP], efavirenz [EFV] e a etravirina [ETV]) fazem parte dos esquemas terapêuticos [94].

### 1.5.3 Inibidores da protease

Os inibidores da protease (PI) são inibidores competitivos que se ligam selectivamente ao centro activo das proteases víricas, conduzindo à formação de partículas víricas imaturas [95]. As partículas virais ao não passarem pelo processo de maturação, ficam desorganizadas e não adquirem a capacidade infecciosa. Encontram-se aprovados pela FDA dez PI (disponível em <http://www.fda.gov/> - acedido a 6/8/13). Nos últimos anos os PI têm sido bastante utilizados no esquema terapêutico padrão para o tratamento da infecção por HIV-1 [96,97].

#### **1.5.4 Regimes terapêuticos anti-retrovíricos**

O tratamento da infecção por HIV-1 teve início em 1987 com descoberta do AZT, que sem outras alternativas de tratamento na altura, acabou por mostrar alguns benefícios clínicos nos doentes [98]. Porém, rapidamente se tornou evidente que a administração deste regime de monoterapia levava ao rápido aparecimento de estirpes resistentes [99]. No entanto, à medida que mais NRTI foram surgindo e estudados em ensaios clínicos, verificou-se que estes em combinação (terapia dupla) apresentavam benefícios comparativamente ao regime terapêutico de monoterapia [100]. O aparecimento de um novo alvo terapêutico incluído numa nova classe de anti-retrovíricos, os inibidores da protease, e a sua inclusão nos regimes terapêuticos administrados aos doentes mostrou que a combinação destes inibidores com um NNRTI e com dois NRTI aumentava a eficácia do tratamento [101,102,103]. A utilização da TAR de elevada eficácia (HAART, do inglês *highly active antiretroviral therapy*), resultado da combinação complexa de anti-retrovíricos de diferentes classes, iniciou uma nova era no tratamento dos doentes [104]. Esta combinação de fármacos é considerada a melhor estratégia terapêutica na supressão da replicação vírica [105], bem como na redução do aparecimento de mutações de resistência aos anti-retrovíricos [106].

Actualmente a HAART é o esquema terapêutico padrão para o tratamento da infecção por HIV-1 [107]. Embora este esquema terapêutico para o tratamento da infecção por HIV seja recomendado desde 2000, foi uma estratégia adoptada apenas mais recentemente como medida de prevenção da TMF. Foi com base em vários estudos, que em 2006 a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou a terapia HAART como a melhor forma de prevenir a transmissão do HIV da mãe para o filho [108].

#### **1.6 Resistência Associada à Terapia Anti-Retrovírica**

Apesar dos benefícios comprovados da terapia HAART na supressão da replicação vírica, o HIV-1 pode permanecer latente nos designados reservatórios, por longos períodos de tempo, o que impossibilita a eliminação do vírus do hospedeiro [109,110]. Deste modo existe sempre a possibilidade de a dado momento da infecção, e sem uma razão ainda conhecida, o vírus passar dos reservatórios para a corrente sanguínea com aumento da taxa de replicação vírica [55,111]. Em ambiente de pressão

terapêutica pode existir uma selecção de variantes resistentes com maior *fitness* replicativo, que nessas condições específicas passam a ser a população de vírus dominante na infecção [93,112-114]. A selecção destas variantes resulta de vários factores, entre eles a baixa adesão à TAR por parte do paciente pelos efeitos adversos dos fármacos, toxicidade e interacções medicamentosas [115]. Por outro lado, a elevada taxa de replicação e mutação do HIV-1 conduzem à acumulação de variação genética na população de vírus [56]. Em conjunto, estes factores contribuem para o insucesso terapêutico, e conseqüentemente à ocorrência de resistência aos fármacos [116]. O aumento na incidência de variantes resistentes, na população de indivíduos infectados, conduz a um aumento na transmissão de vírus resistentes a indivíduos que nunca receberam tratamento [117,118]. Deste modo, torna-se fundamental a monitorização contínua de mutações de resistência aos fármacos em indivíduos sob TAR [119].

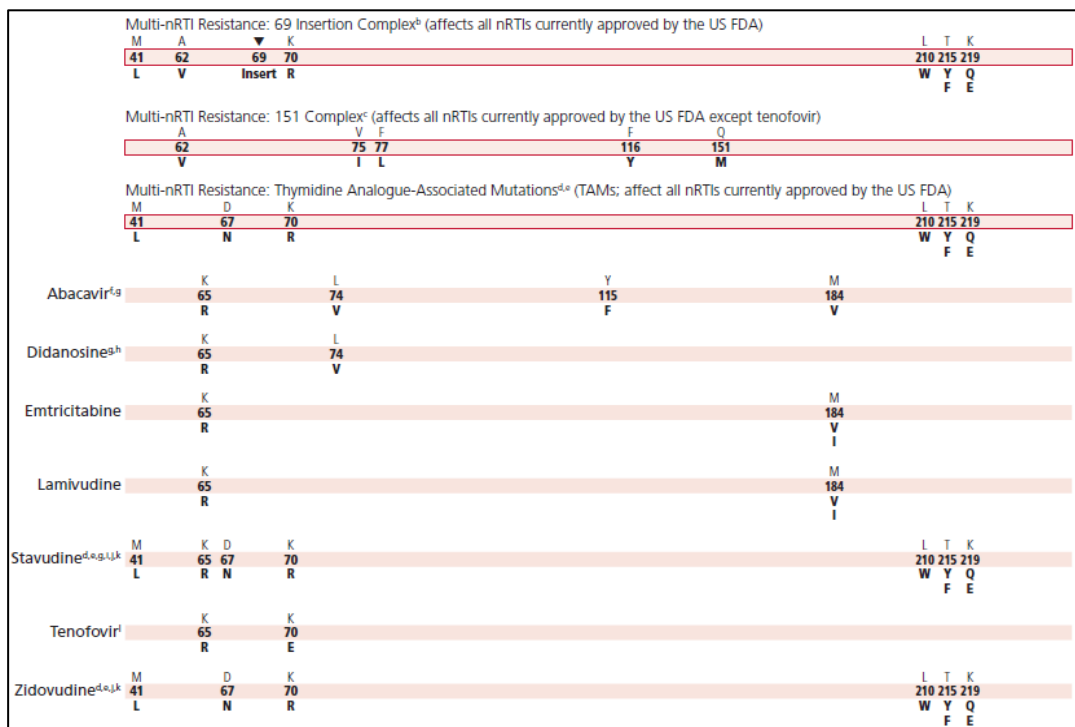
## **1.7 Mecanismos de Resistência aos Anti-Retrovíricos**

As mutações genéticas do HIV-1 podem ser classificadas como principais (ou *major*) ou acessórias (ou *minor*). As mutações principais ocorrem no sítio activo da enzima ou num local próximo, reduzindo directamente a susceptibilidade do vírus ao anti-retrovírico. Este tipo de mutações apresentam especificidade para cada fármaco, e uma única mutação pode conduzir a padrões de resistência cruzada para todos os fármacos de determinada classe de anti-retrovíricos [120]. As mutações acessórias surgem para restaurar a capacidade replicativa do vírus mutante, causada pela alteração estrutural resultante das mutações principais [121]. No entanto, a acumulação de duas ou mais mutações acessórias pode também reduzir a susceptibilidade aos anti-retrovíricos [120]. Podem ainda observar-se polimorfismos naturais, sem impacto significativo na replicação vírica, ocorrendo frequentemente em indivíduos não submetidos a qualquer terapêutica [122,123].

### **1.7.1 Resistência aos NRTI**

A resistência aos NRTI pode desenvolver-se através de uma única mutação ou através da acumulação sucessiva de mutações. Após o insucesso terapêutico, de uma monoterapia com AZT, tornam-se detectáveis, com maior frequência, mutações no codão 41, 210 e 215, e com menos frequência, mutações no codão 67, 70 e 219 (Figura 4). Estas mutações, reconhecidas como TAM (do inglês, *thymidine analogue associated*

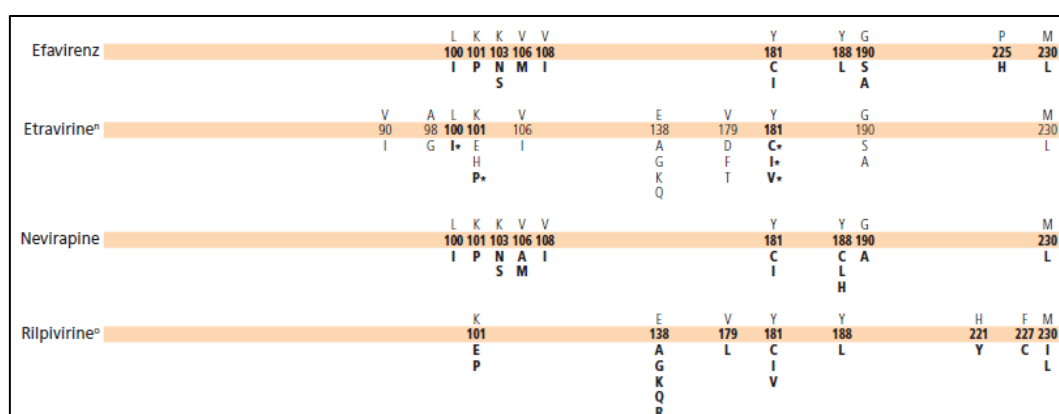
*mutations*), reduzem a susceptibilidade da enzima a todos os NRTI, podendo conferir resistência cruzada aos fármacos tenofovir, abacavir e stavudina [120,124,125]. Os NRTI apresentam uma elevada barreira genética, uma vez que para o desenvolvimento de um perfil de resistência é necessária a acumulação sucessiva de mutações [113,125]. Pode ainda verificar-se a interacção entre mutações, como por exemplo, a reversão quase total da resistência ao tenofovir (TDF), que se verifica quando a mutação no codão 65 que confere resistência ao fármaco (K65R) se associa a mutação no codão 184 (M184V/I) [126].



**Figura 4** – Representação esquemática das mutações descritas para a região da RT do gene *pol* que conferem resistência aos NRTI (disponível em <http://www.iasusa.org>). Acima e abaixo de cada barra horizontal da figura encontram-se respectivamente as letras referentes ao aminoácido do vírus selvagem e do vírus mutado; o número inscrito no interior da barra corresponde à sua posição na sequência consenso do subtipo B.

## 1.7.2 Resistência aos NNRTI

As mutações associadas à resistência aos NNRTI ocorrem essencialmente em três agrupamentos: entre os codões 100-108, os codões 179-190 e os codões 225-238 [127]. Atendendo à baixa barreira genética, a resistência a qualquer um dos NNRTI ocorre muito rapidamente, bastando uma única mutação, geralmente K103N ou Y181C, para conferir elevado nível de resistência a esta classe de inibidores (Figura 4) [128-130]. No caso do ETV, a barreira genética parece ser mais elevada, sendo necessárias duas ou mais mutações para comprometer a susceptibilidade ao fármaco [131].



**Figura 5** – Representação esquemática das mutações descritas para a região da RT do gene *pol* que conferem resistência aos NNRTI (disponível em <http://www.iasusa.org>). Acima e abaixo de cada barra horizontal da figura encontram-se respectivamente as letras referentes ao aminoácido do vírus selvagem e do vírus mutado; o número inscrito no interior da barra corresponde à sua posição na sequência consenso do subtipo B.

## 1.8 Monitorização de Resistências aos Anti-Retrovíricos

A monitorização de resistências aos anti-retrovíricos constituiu uma importante ferramenta para controlo dos efeitos da administração de TAR que se pretende que seja eficaz durante longos períodos do tratamento do doente. Os ensaios fenotípicos e os ensaios genotípicos têm sido utilizados para a detecção de mutações de resistência [132].

Os ensaios fenotípicos baseiam-se na quantificação directa da sensibilidade do fármaco, isto é, medem a replicação vírica do vírus em análise e do vírus selvagem (controlo) em culturas celulares na presença de concentrações crescentes de anti-retrovíricos. A resistência é expressa através do cálculo da concentração de fármaco necessária para inibir a replicação da estirpe em 50% (IC50, do inglês *inhibitory concentration*) [125,133]. Apesar de permitirem a quantificação da resistência e a

avaliação da resistência cruzada entre fármacos da mesma classe, esta metodologia apresenta algumas desvantagens, como a incapacidade de identificar mutações que não tenham impacto no fenótipo, a sua morosidade e complexidade, bem como o seu elevado custo [131].

Os ensaios genotípicos baseiam-se na detecção de alterações a nível molecular, capazes de potencialmente poderem modificar a estrutura de proteínas víricas, e conseqüentemente, bloquear ou diminuir a eficiência com que os anti-retrovíricos se ligam às mesmas [116,125,132,134,135]. Estes testes empregam um procedimento em duas fases, isto é, em primeiro lugar, a amplificação por RT-PCR (do inglês, *reverse transcription – polymerase chain reaction*) de uma região específica do genoma vírico, e seguidamente, a sequenciação molecular para a detecção das mutações [131]. A análise de mutações de resistência pode ser realizada de forma completamente automatizada, através da utilização de programas informáticos específicos, destacando-se, HIVdb (*Stanford University HIV Drug Resistance Database, EUA*, disponível em <http://sierra2.stanford.edu/sierra/servlet/JSierra>), *Geno2Pheno* (disponível em <http://www.geno2pheno.org/>), ou de forma manual, através da utilização ferramentas bioinformáticas com análise comparativa de sequências alinhadas com uma sequência de referência. A disponibilidade sequências genómicas do HIV-1 nas bases de dados em número significativo tem facilitado a identificação de mutações de resistências aos anti-retrovíricos [133]. Apesar da relativa simplicidade de execução e do custo mais reduzido, esta metodologia apresenta a impossibilidade de actualizar em tempo real o quadro de mutações de resistências disponível, à medida que novos anti-retrovíricos ou interacções de fármacos são conhecidas [113].

Mais recentemente, o avanço da tecnologia, permitiu a associação destes dois tipos de ensaios naquilo que é designado como «fenótipo virtual». Este consiste numa base de dados, que contém dezenas de milhares de sequências víricas, e em paralelo, os respectivos resultados do ensaio fenotípico realizado [136]. Exemplos de bases de dados disponíveis são a de *Los Alamos HIV Sequence Database*, a *International AIDS Society-USA* e a de *Stanford University HIV Drug Resistance Database*.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJECTIVOS

Os objectivos gerais deste estudo consistiram em:

- ✓ Caracterizar a diversidade genética através da região RT do gene *pol* numa população de mães multíparas infectadas por HIV-1;
- ✓ Correlacionar os polimorfismos genéticos encontrados com os diferentes subtipos víricos em circulação na população estudada;
- ✓ Avaliar a presença de mutações de resistência aos RTI;
- ✓ Determinar a proporção de mutações de resistência aos RTI em função do cumprimento de diferentes regimes terapêuticos de prevenção da TMF do HIV-1 e sua evolução no tempo.

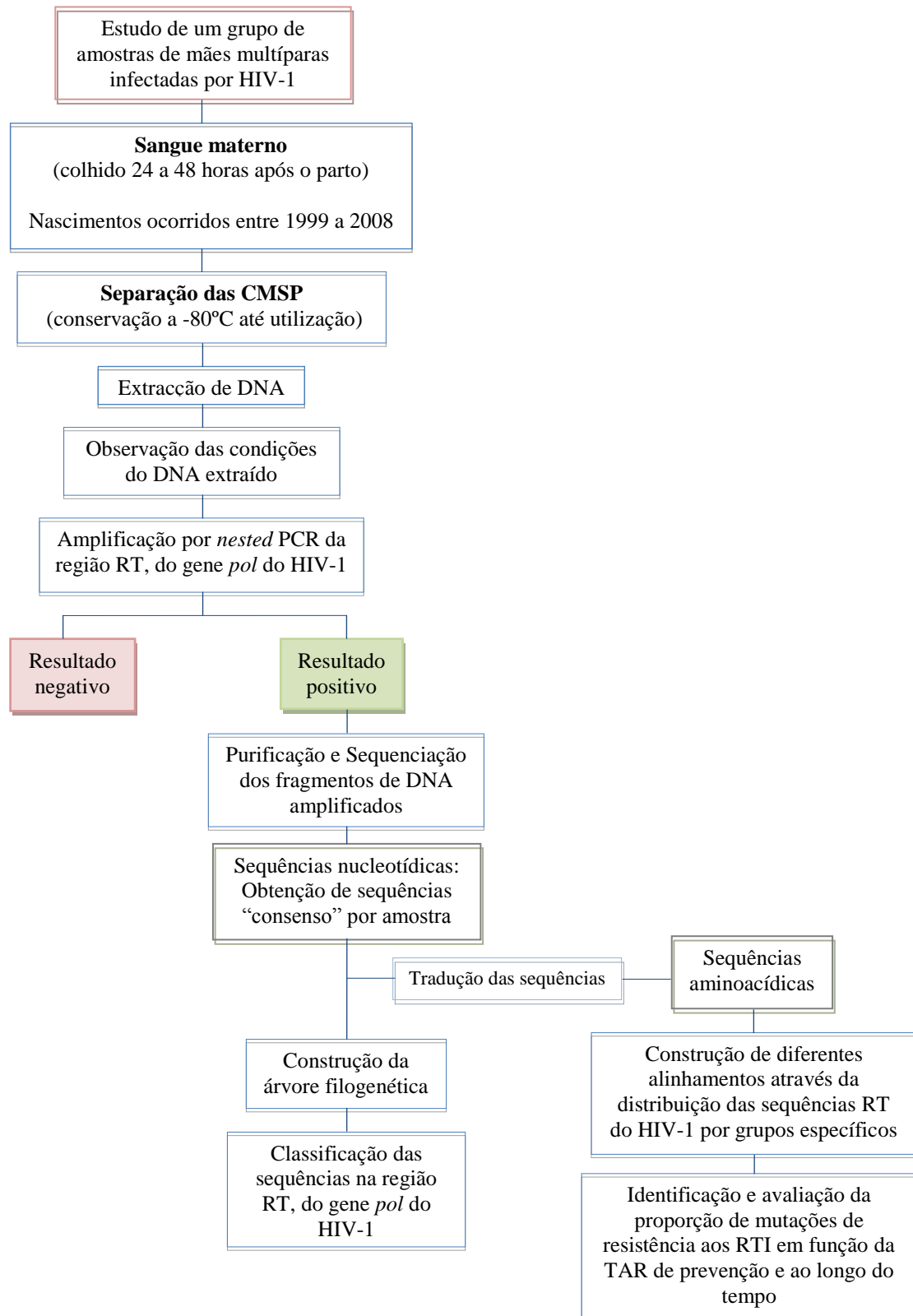
Por forma a cumprir os objectivos gerais, foram seguidos os seguintes objectivos específicos:

- ✓ Caracterizar a população estudada atendendo aos diferentes parâmetros conhecidos (demográficos, epidemiológicos e clínicos);
- ✓ Amplificar por *nested* PCR um fragmento da região RT do gene *pol* do HIV-1;
- ✓ Obter a sequência nucleotídica “consenso” para cada amostra;
- ✓ Classificar por estimativa filogenética as sequências nucleotídicas obtidas;
- ✓ Traduzir e distribuir as sequências aminoacídicas “consenso” em grupos específicos;
- ✓ Realizar uma análise comparativa entre os grupos com identificação do número de mutações de resistência aos RTI.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do Estudo



## 3.2 População Estudada

O grupo populacional alvo deste estudo foi constituído por 34 casos de mães múltiplas infectadas por HIV-1. Para cada caso foram analisadas duas amostras maternas associadas à altura em que ocorreu o nascimento dos filhos (1ª amostra/1º filho; 2ª amostra/2º filho). Na maioria dos casos foram cumpridos regimes terapêuticos de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 durante a gestação. Os regimes terapêuticos administrados foram terapia dupla (2 NRTI), terapia tripla (2 NRTI + 1 PI ou 1 NNRTI) e terapia HAART (2 NRTI + 1 PI + 1 NNRTI). As amostras maternas analisadas foram colhidas 24 a 48 horas após o parto e recebidas entre 1999 a 2008 no Laboratório Nacional de Referência HIV e Hepatites B e C, no contexto do protocolo implementado para o diagnóstico precoce de TMF do HIV. As amostras de células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) foram conservadas a -80°C até à sua utilização no presente estudo. A obtenção de informação demográfica, epidemiológica e clínica (idade, naturalidade das mães, ano do parto, cumprimento ou não de TAR de prevenção e tipos de regimes terapêuticos anti-retrovíricos administrados) foi feita por consulta dos dados registados numa base de dados disponível no laboratório. O estudo desenvolvido foi retrospectivo, anónimo e não relacionável.

## 3.3 Extração do DNA proviral do HIV-1

A partir de amostras de CMSP efectuou-se a extração de DNA recorrendo ao kit *QIAamp DNA Blood* (*QIAGEN, Studio City, USA*) de acordo com o protocolo do fabricante.

Para observar as condições e a concentração do DNA extraído, alíquotas das amostras foram submetidas a uma electroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, contrastado com o corante *SyberSafe* (*Invitrogen, California, USA*) e fotografado sob luz ultravioleta.

### 3.4 Seleccção e Preparação dos *Primers*

Foram utilizados diferentes *primers* na amplificação por *nested* PCR (do inglês, *nested Polymerase Chain Reaction*) da região alvo do presente estudo (RT). Na primeira reacção de amplificação foram utilizados quatro *primers* externos (Gag2, PR1N, RT137C e RT3303C) e na segunda reacção de amplificação foram utilizados dois *primers* internos (RT1N e RT4C), todos descritos por *Steege et al.*, 2006 [119] e utilizados em protocolos experimentais por *Videira e Castro et al.*, 2010 [137]. Com o intuito de verificar se os *primers* descritos apresentavam especificidade para a detecção de diferentes subtipos do HIV-1, fez-se previamente uma comparação das sequências dos *primers* contra um alinhamento múltiplo de sequências nucleotídicas de estirpes de referência HIV-1 contendo vários subtipos e recombinantes víricos, tendo em atenção a epidemiologia molecular da infecção descrita em Portugal. Todas as sequências de referência utilizadas encontram-se disponíveis na base de dados de sequências de HIV de *Los Alamos HIV* (disponível em <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>). As sequências dos diferentes *primers* utilizados encontram-se descritas na Tabela 1 sendo a numeração dos nucleótidos atribuída com base na estirpe de referência HXB2 do subtipo B (*GenBank*, número de acesso: K03455).

Todos os *primers* utilizados neste estudo foram sintetizados e purificados na empresa *Thermo Fisher Scientific (Datenschutz, Alemanha)*. A sua preparação foi realizada em “sala limpa”, através da adição de água ultrapura, por forma a obter uma concentração final de 100 pmol/μl. Posteriormente, cada *primer* foi diluído em alíquotas de 10 pmol/μl e mantidas a -20°C.

**Tabela 1** - *Primers* utilizados na 1ª e 2ª reacção de amplificação da região *pol* do HIV-1.

	Nome	Sequência 5' - 3'	Localização
<b>Primers Externos*</b> 1ª amplificação	Gag2	CAATGAGGAAGCTGCAGAATGGG	1404-1426
	PR1	GAAATGATGACAGCATGYCAGGG	1822-1844
	RT137	TTCTGTATRTCATTGACAGTCCAGC	3301-3325
	RT3303	TAAYYTTYTGATRTCATTGAC	3309-3329
<b>Primers Internos*</b> 2ª amplificação	RT1	CCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA	2604-2632
	RT4	TGGAGTTCATAWCCCATCCAAAG	3231-3253

\*Adaptados de *Steege et al.* [119] e utilizados por *Videira e Castro et al.*, 2010 [137].

### 3.5 Amplificação por *Nested* PCR da Região RT do Gene *pol* do HIV-1

Os protocolos experimentais para a amplificação da região RT do gene *pol* do HIV-1 tiveram por base os descritos na literatura [119,137]. No entanto, foi também considerado o sistema de enzima utilizado na reacção de amplificação.

Na primeira reacção de amplificação foram utilizados quatro *primers* externos, dois directos (Gag2, PR1) e dois inversos (RT137, RT3303), permitindo a amplificação de diferentes fragmentos de DNA. Estes fragmentos serviram como matrizes para uma segunda reacção de PCR, que conduziu à amplificação de um fragmento de DNA da região da RT de aproximadamente 650pb, utilizando o par de *primers* RT1/RT4.

#### 3.5.1 Condições das reacções de amplificação

As duas reacções de amplificação foram realizadas com o sistema *illustra PuReTaq Ready-to-go<sup>TM</sup> PCR Beads* (GE Healthcare, England), cujos tubos de PCR (0,2 ml) contêm uma pequena esfera de reagentes liofilizados. Estas esferas são compostas por estabilizadores, BSA (do inglês, *bovine serum albumin*), dNTPs, aproximadamente 2,5U de polimerase de DNA *puReTaq* e os componentes de tampão de reacção. A reconstituição de cada esfera liofilizada foi feita com uma solução aquosa contendo os *primers* na concentração pretendida e tendo em atenção o volume total de reacção de 25  $\mu$ l.

A primeira amplificação foi efectuada com os *primers* externos (Gag2, PR1, RT137, RT3303) a uma concentração final de 0,2  $\mu$ M e a segunda amplificação foi realizada com os *primers* internos (RT1, RT4) a uma concentração de 0,6  $\mu$ M.

Um volume de 5-10  $\mu$ l de DNA foi adicionado na primeira reacção de amplificação, tendo sido posteriormente transferidos 2  $\mu$ l do produto de reacção para a mistura da segunda reacção de amplificação.

Em todos os protocolos foram adicionados controlos negativos, substituindo o DNA adicionado na mistura de reacção por água ultrapura.

Os programas experimentais utilizados nas reacções de amplificação encontram-se descritos nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Programa de amplificação usado na 1ª reacção de PCR da região *pol* do HIV-1.

<b>1ª Reacção de PCR</b>	
Desnaturação inicial	95°C, 5 min
Amplificação	95°C, 45seg; 45°C, 1min; 72°C, 1min (15x)
	95°C, 45seg; 50°C, 1min; 72°C, 1min 30seg (30x)
Extensão final	72°, 7min

**Tabela 3** – Programa de amplificação usado na 2ª reacção de PCR para a região da RT do gene *pol* do HIV-1.

<b>2ª Reacção de PCR</b>	
Desnaturação inicial	95°C, 5 min
Amplificação	95°C, 45seg; 50°C, 1min; 72 °C, 1min (20x)
	95°C, 45seg; 55°C, 1min; 72 °C, 1min 30seg (20x)
Extensão final	72°, 7min

Os produtos amplificados foram mantidos a 4°C até serem utilizados.

### 3.6 Detecção dos Produtos de PCR

Alíquotas dos produtos de PCR obtidos foram observadas através de uma electroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1X, contrastado com o corante *SyberSafe (Invitrogen, California, USA)*. Após 30 minutos de polimerização de uma solução de 100 ml de gel, seguiu-se a aplicação de uma mistura contendo 2 µl de produto de PCR e 2 µl de tampão de aplicação. A corrida electroforética foi de 1 hora a 120 volts. A massa molecular dos fragmentos obtidos foi estimado por comparação com o padrão de migração do marcador de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, California, USA)*. Os fragmentos de DNA foram visualizados num transiluminador UV num aparelho *Gel-Doc (Bio-Rad, USA)*.

### 3.7 Purificação dos Produtos de PCR

Todos os produtos de PCR que revelaram a presença de uma banda específica de massa molecular esperada (aproximadamente 650 pb) e em concentração suficiente foram purificados.

Atendendo à disponibilidade de reagentes no laboratório, a purificação dos produtos de PCR foi efectuada com o kit *ExoSap – IT USB®* (*GE Healthcare, England*) e com o kit *QIAquick PCR Purification* (*Qiagen, Studio City, USA*), ambos utilizados de acordo com as instruções do fabricante. Por outro lado, nos casos em que os produtos de PCR apresentavam a banda correspondente ao fragmento alvo, mas que revelaram também a presença de produtos inespecíficos, procedeu-se à sua purificação através da utilização do kit *QIAquick Gel Extraction* (*Qiagen, Valencia, USA*), segundo as instruções do fabricante. Os kits de purificação utilizados têm como finalidade eliminar *primers* ou outros constituintes da mistura que não foram consumidos durante a reacção de PCR, de forma a posteriormente evitar eventuais interferências na reacção de sequenciação.

#### a) Kit *ExoSap – IT USB®*

O primeiro método utilizado na purificação dos produtos de PCR foi realizado com o kit *ExoSap – IT USB®* (do inglês, *Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase in Buffer*). Este procedimento consiste que a cada 5 µl de produto de PCR sejam adicionados 2 µl de enzima *ExoSap*. A mistura é submetida a um programa de purificação de dois ciclos, com uma primeira incubação a 37°C durante 15 minutos, seguida de uma segunda incubação a 80°C durante 15 minutos para inactivação da enzima.

#### b) Kit *QIAquick PCR Purification*

O segundo método utilizado na purificação dos produtos de PCR foi realizado com o kit *QIAquick PCR Purification* (*Qiagen, Studio City, USA*). Este procedimento consiste em adicionar 115 µl de tampão PB (proporção 1:5) a 23 µl do produto de PCR. A mistura é colocada numa *QIAquick spin column*, previamente adaptada a um tubo colector de 2 ml, seguindo-se um passo de centrifugação a 10000 rpm durante 1 minuto. Após a remoção do filtrado, seguiu-se uma lavagem, pela adição de 750 µl de tampão PE à *QIAquick spin column*, repetindo o processo de centrifugação nas mesmas condições. No passo final, o DNA foi eluído com 30 µl de água ultrapura, através de uma centrifugação a 10000 rpm durante 1 minuto.

### c) Kit *QIAquick Gel Extraction*

Relativamente ao terceiro método utilizado na purificação dos produtos de PCR, este foi realizado com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Valencia, USA). Inicialmente, a cerca de 23 µl do produto de PCR foram adicionados 8 µl de tampão de aplicação. A mistura foi submetida a uma corrida electroforética, na qual se utilizou o marcador de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, California, USA), para identificação da banda correspondente ao fragmento alvo. A electroforese foi realizada a 120 volts durante aproximadamente 2 horas. Após identificação do fragmento alvo, a banda foi removida através de um bisturi estéril, e o pedaço de gel colocado num tubo de 2 ml. Para a dissolução da agarose, adicionou-se o tampão QG e incubou-se a 50°C durante 10 minutos. De seguida, transferiu-se a solução do tubo para a *QIAquick column* e centrifugou-se a 13000 rpm durante 1 minuto. Após a remoção do filtrado, e por forma a remover qualquer resto de agarose na coluna, foi adicionado novamente o tampão QG, centrifugando-se nas condições anteriormente descritas. A lavagem foi efectuada através da adição de 750 µl de tampão PE à coluna e feita uma dupla centrifugação em iguais condições. No passo final, o DNA foi eluído com 30 µl de água ultrapura, através de uma centrifugação a 13000 rpm durante 1 minuto.

Nos passos de centrifugação foi utilizada uma centrífuga *Heraeus Biofuge Pico* (24x 1,5/2ml Tubes; 13000RPM 16060xg)

As condições finais dos produtos purificados foram observadas pela aplicação de uma nova alíquota de 2 µl do produto numa electroforese em gel de agarose.

## 3.8 Sequenciação dos Fragmentos de DNA Amplificados

Os fragmentos de DNA purificados foram submetidos à reacção de sequenciação nucleotídica, recorrendo ao *Kit Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) que foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante. Foi efectuada uma mistura de reacção pela adição de 1 µl de *Big Dye*, 1 µl de *primer* a 1 µM e 6 µl de água ultrapura. Esta mistura de reacção para sequenciação foi realizada em “sala limpa”. Posteriormente, num compartimento físico separado foram adicionados 2 µl de produto de PCR purificado. Nos casos em que os produtos de PCR purificados apresentavam uma baixa concentração de DNA, a quantidade de amostra adicionada foi aumentada e o volume de água ajustado de forma

a perfazer um volume final de 10 µl. Posteriormente os tubos de PCR foram colocados num termociclador e submetidos a um programa de sequenciação (Tabela 4).

**Tabela 4** – Programa de sequenciação nucleotídica.

Programa	
Desnaturação inicial	96° C, 30 seg
Sequenciação	96° C, 30 seg; 50°, 15 seg; 60° C, 4 min (25x)

Os *primers* de sequenciação utilizados foram o RT1 e o RT4, respectivamente, *primer* directo e inverso, correspondentes aos usados na segunda reacção de amplificação.

Os produtos sequenciados foram entregues na Unidade de Tecnologia e Inovação (UTI) que apoia todos os laboratórios do INSA na prestação interna de serviços de sequenciação. Após a corrida das amostras por electroforese capilar no equipamento *ABI 3130XL Genetics Analyser*, realizada nesta Unidade de apoio do INSA, os resultados (sequências e cromatogramas) foram disponibilizados ao laboratório. Todo o trabalho seguinte para a análise das sequências foi da responsabilidade dos próprios utilizadores dos referidos serviços.

### 3.9 Análise Bioinformática de Sequências Nucleotídicas

#### 3.9.1 Construção das sequências “consenso”

Após a obtenção dos cromatogramas relativos às reacções de sequenciação, estes foram analisados e as respectivas sequências editadas com o auxílio do programa *Chromas Lite 2.1.1* (disponível em <http://technelysium.com.au/>). Posteriormente foram construídas as sequências nucleotídicas “consenso” correspondentes a cada amostra. Para tal, todas as sequências obtidas (directa e inversa) foram alinhadas através do programa *Clustal W*, sendo a obtenção da sequência “consenso” e posterior edição manual da mesma efectuadas através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.2.0* (disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

### 3.9.2 Análise por BLAST

Numa primeira análise e a fim de se confirmar a sua identidade, as sequências nucleotídicas “consenso” foram submetidas à análise por BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Editor Search Tool*), disponível na base de dados internacional de sequências de HIV de Los Alamos ([http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC\\_BLAST/basic\\_blast.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/BASIC_BLAST/basic_blast.html)). Esta primeira análise permitiu a obtenção de informação sobre a possível classificação molecular das sequências em estudo e apoiar também a selecção de algumas das sequências de referência a serem posteriormente utilizadas na estimativa filogenética.

### 3.9.3 Inferência filogenética

Todas as sequências nucleotídicas “consenso” relativas a cada amostra e para a região em estudo (RT) foram alinhadas entre si, juntamente com sequências de referência de diversos subtipos e principais CRF do HIV-1, retiradas da base de dados. Sempre que necessário procedeu-se à edição e correcção manual dos alinhamentos através do programa *BioEdit* v.7.2.0.

O estudo filogenético foi efectuado recorrendo ao programa *MEGA* (do inglês, *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) v.5.2.2 [138, disponível em <http://www.megasoftware.net/>]. A construção da árvore baseou-se no método *Neighbor-Joining* [139], utilizando o modelo de “Kimura 2-parâmetro” [140] para o cálculo da matriz de distâncias genéticas. Através do método de *bootstrapping* avaliou-se a robustez da árvore, com base em 1000 amostragens aleatórias, considerando-se estatisticamente significativos os agrupamentos filogenéticos com valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 70%. Na construção da árvore usou-se uma sequência de referência do SIVcpz como *outgroup*.

### 3.9.4 Análise por *bootscanning*

As sequências cujos ramos na árvore apresentaram um posicionamento ambíguo, tornando-se de difícil classificação, foram analisadas através de *bootscanning*, recorrendo ao programa *SimPlot* v.3.5.1 [141, disponível em <http://sray.med.som.jhmi.edu/SCSoftware/simplot/>]. Este programa para além de permitir analisar a semelhança entre sequências representativas de vários subtipos com a sequência de interesse, permite ainda a análise por *bootscanning* de possíveis eventos de recombinação genética.

### 3.9.5 Tradução de sequências nucleotídicas em aminoacídicas

As sequências nucleotídicas “consenso” obtidas para a região alvo (RT) foram traduzidas através do programa *Gene Runner 3.05* (*Hastings Software, Inc., Hatings, USA*). Posteriormente as sequências aminoacídicas, distribuídas por grupos específicos, foram alinhadas com uma sequência de referência do subtipo B do HIV-1 (*GeneBank*, número de acesso: K03455), utilizando o programa *Clustal W*.

Os vários alinhamentos construídos foram analisados quanto à presença de mutações associadas à resistência aos RTI, por comparação com a sequência de referência e com informação que se encontra descrita na literatura.

De forma a suportar e confirmar os resultados obtidos da análise dos alinhamentos, recorreu-se também ao programa *Geno2Pheno* (disponível em <http://www.geno2pheno.org/>). Após submissão das sequências este programa disponibiliza um relatório de resultados onde são identificadas as mutações associadas à resistência aos anti-retrovíricos e também são reconhecidos outros polimorfismos genéticos não associados à resistência aos anti-retrovíricos.

## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da População Estudada

A informação demográfica, epidemiológica e clínica registada à data de colheita das amostras, permitiu a caracterização do grupo populacional alvo deste estudo (Tabela 1 do Anexo 1). Este grupo foi constituído por 34 casos de mães multíparas infectadas por HIV-1. Para cada caso estudado foram analisadas duas amostras maternas que correspondem, respectivamente, ao nascimento de um primeiro (MF1) e de um segundo filho (MF2). Todas as amostras foram colhidas 24 a 48 horas após o parto tendo estes ocorrido entre 1999 e 2008.

Para a população total (n=68) o intervalo de idades variou entre os 17 e os 39 anos de idade, com uma média de 29 anos. Para o grupo de mães com primeiro filho (n=34), o intervalo de idades variou entre os 17 e os 36 anos, apresentando o grupo uma média de 26,9 anos de idade. A população de mães com segundo filho (n=34), o intervalo de idades variou entre os 21 e os 39 anos, com uma média neste grupo de 31,1 anos de idade. Para duas mães esta informação não era conhecida.

Foi observado que 22 (64,7%) dos casos eram mães com naturalidade portuguesa e 11 (32,4%) com origem africana, nomeadamente 8 (23,5%) de Angola e 3 (8,8%) de Moçambique. Para um dos casos a naturalidade não era conhecida.

Relativamente ao ano de colheita das 68 amostras maternas estudadas, 24 (35,3%) foram colhidas entre 1999-2002 e correspondem todas ao nascimento de um primeiro filho, 20 (29,4%) foram colhidas entre 2003-2005, em que 10 correspondem ao nascimento de um primeiro filho e as outras 10 ao nascimento de um segundo filho, e as restantes 24 (35,3%) amostras foram colhidas entre 2006-2008 e correspondem todas ao nascimento de um segundo filho (Tabela 5).

**Tabela 5** – Distribuição das amostras estudadas por ano de colheita e tipo de TAR.

TAR	Ano de colheita			Total
	[1999 – 2002]	[2003 - 2005]	[2006 – 2008]	
<b>Terapia Dupla</b>	5 (20,8%)	1 (5%)	0	<b>6 (8,8%)</b>
<b>Terapia Tripla</b>	16 (66,7%)	16 (80%)	13 (54,2%)	<b>45 (66,2%)</b>
<b>Terapia HAART</b>	0	1 (5%)	9 (37,5%)	<b>10 (14,7%)</b>
<b>Sem TAR</b>	3 (12,5%)	2 (10%)	2 (8,3%)	<b>7 (10,3%)</b>
<b>Total</b>	<b>24 (35,3%)</b>	<b>20 (29,4%)</b>	<b>24 (35,3%)</b>	<b>68 (100%)</b>

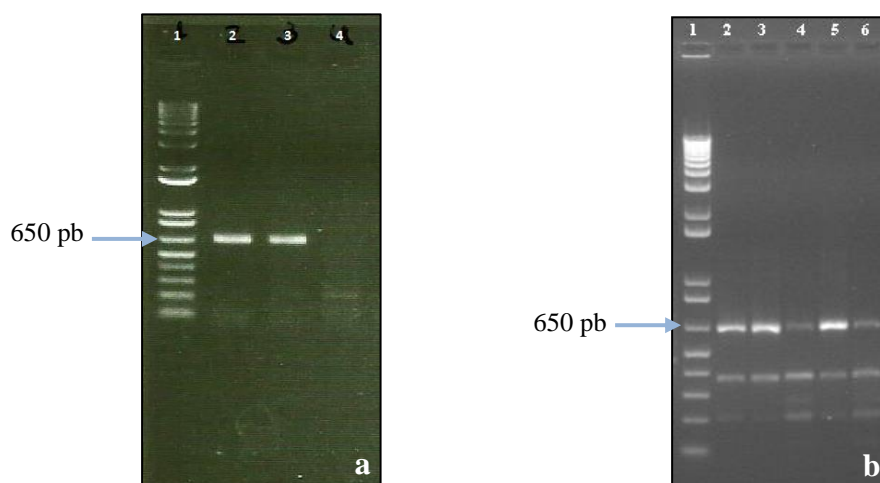
Durante a primeira gravidez, 29 (85,3%) das mães foram seguidas durante a gestação e cumpriram TAR, enquanto 5 (14,7%) não fizeram qualquer prevenção da transmissão do vírus ao filho. Já na segunda gravidez, com exceção de dois casos, todas as restantes 32 (94,1%) mães cumpriram TAR de prevenção.

Quanto aos regimes terapêuticos, considerou-se como terapia dupla (TD) regimes com 2 NRTI (2 fármacos/1 classe), terapia tripla (TT) regimes com 2 NRTI + 1 PI ou 1 NNRTI (3 fármacos/2 classes) e HAART os regimes com 2 NRTI + 1 PI + 1 NNRTI (4 fármacos/3 classes). Assim, durante a primeira gravidez, a TAR mais utilizada foi a TT em 23 (67,6%) dos casos, e foi observada a administração TD em 6 (17,6%) dos casos. Na segunda gravidez, o regime mais utilizado foi também a TT em 22 (64,7%) dos casos, mas a HAART foi já administrada em 10 (29,4%) dos casos. Na população total observou-se que em 6 (8,8%) casos foi utilizada a TD, em 45 (66,2%) dos casos a TT, e em 10 (14,7%) casos foi administrada HAART como medida preventiva da transmissão do vírus ao filho.

Na população em estudo, foram observados dois casos (M16F1 e M18F1) de transmissão do vírus da mãe ao filho. Os partos ocorreram no ano de 2001, e correspondem ao nascimento de um primeiro filho. Em ambos os casos, as mães não fizeram qualquer prevenção da TMF.

## 4.2 Amplificação e Sequenciação da Região RT

Do total das 68 amostras submetidas a amplificação foi possível obter 66 amplicões (97% de sensibilidade) para a região RT do gene *pol* do HIV-1. Porém a análise das amostras amplificadas por electroforese em gel de agarose revelou a presença de produtos com diferente concentração de DNA, algumas, contendo para além do fragmento específico esperado (650 pb) outras bandas correspondentes a amplificações inespecíficas (exemplo na Figura 6). Todos os produtos de PCR que revelaram a presença de uma banda única de massa molecular esperada foram purificados. No caso de produtos em que foi observada concentração suficiente de DNA (exemplo na Figura 6a) a purificação foi efectuada recorrendo ao *Kit ExoSap – IT USB®* (*GE Healthcare, England*) ou ao *Kit QIAquick PCR Purification* (*Qiagen, Studio City, USA*), dependendo da disponibilidade destes reagentes no laboratório. Por outro lado, os produtos que revelaram concentração reduzida de DNA e simultaneamente a presença de produtos de amplificação inespecíficos (exemplo na Figura 6b) foram purificados através do kit *ExoSap* e/ou do kit *QIAquick PCR Gel Extraction* (*Qiagen, Valencia, USA*). As amostras foram submetidas à reacção de sequenciação, nas condições anteriormente descritas (Material e Métodos - 3.8), e posteriormente entregues na UTI para a corrida electroforética capilar no equipamento *ABI 3130XL Genetics Analyser*.



**Figura 6** – Produtos amplificados por *nested* PCR da região da RT do gene *pol*, visualizados após electroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE 1X, contrastado com o corante *SyberSafe* (*Invitrogen, California, USA*). Nos primeiros poços foi aplicado o marcador de massa molecular *1kb Plus DNA Ladder* (*Invitrogen, California, USA*). **Figura 6a)** Nos poços 2 e 3 foram aplicadas amostras de produtos amplificados com banda única de massa molecular semelhante à esperada e em concentração considerada suficiente. No poço 4 foi colocada uma amostra que não mostrou produto amplificado. **Figura 6b)** Nos poços 2 a 6 foram aplicadas amostras com múltiplas bandas sendo que a aplicação dos poços 4 e 6 revelou o fragmento de massa molecular esperada em concentração de DNA reduzida.

## 4.3 Análise Bioinformática das Sequências Obtidas

### 4.3.1 Construção de sequências “consenso” e análise por BLAST

Os cromatogramas referentes a cada amostra foram analisados e sempre que necessário as respectivas sequências foram corrigidas (*Chromas Lite 2.1.1*). A sequência nucleotídica “consenso” foi construída a partir do alinhamento da sequência directa e complementar. Das 66 amostras sequenciadas, foi possível construir sequências nucleotídicas “consenso” para 59, correspondendo a 34 mães infectadas por HIV-1. Devido à dificuldade de obter cromatogramas de qualidade que permitisse uma leitura clara da sequência, não foi possível construir a sequência “consenso” para 7 amostras. Deste modo, para 25 casos de mães múltiparas foi possível obter as sequências nucleotídicas “consenso” para as duas amostras e para 9 casos de mães múltiparas só foi possível obter uma sequência “consenso” correspondente a uma das amostras (primeiro ou segundo filho).

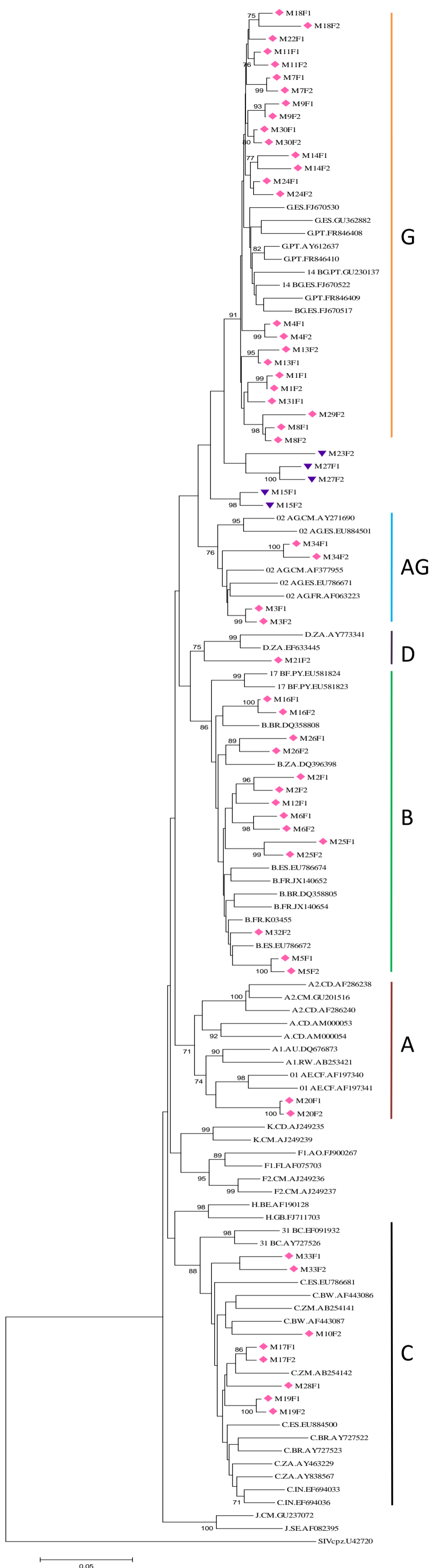
Para uma análise preliminar das sequências nucleotídicas “consenso”, estas foram submetidas a uma análise por BLAST, ferramenta bioinformática disponível na base de dados internacional de sequências de HIV de *Los Alamos*. Esta análise permitiu ter a primeira informação molecular das sequências da RT do gene *pol* do HIV-1, através do reconhecimento da sua similaridade com sequências dos diferentes subtipos víricos presentes na base de dados. Os resultados obtidos nesta análise encontram-se resumidos na Tabela 6, sendo possível consultá-los com maior detalhe na Tabela 1 do Anexo 2.

**Tabela 6** - Resultados obtidos da análise por BLAST.

Subtipo	RT (n=59)
G/BG	27 (45,8%)
B	17 (28,8%)
C	8 (13,6%)
AG	4 (6,8%)
A	2 (3,4%)
D	1 (1,7%)

### 4.3.2 Classificação das sequências por estimativa filogenética

A árvore filogenética apresentada (Figura 7) teve como base o alinhamento múltiplo de 648 nucleótidos das 59 sequências “consenso” obtidas para a região da RT do gene *pol* do HIV-1, com um total de 59 sequências de referência retiradas da base de dados. As sequências de referência são representativas dos 9 subtipos do grupo M (A-D, F-H, J e K), dos sub-subtipos (A1, A2, F1 e F2), das formas recombinadas em circulação (CRF02\_AG, CRF14\_BG, CRF17\_BF, CRF31\_BG), e uma sequência SIVcpz usada como raiz da árvore (*outgroup*).



**Figura 7** – Árvore filogenética construída com base num fragmento de 648 pb da região RT do gene *pol* do HIV-1, a partir do alinhamento das 59 seqüências nucleotídicas “consenso” estudadas (assinaladas com um símbolo colorido), 59 seqüências de referência do grupo M (subtipos indicados à direita) e uma seqüência de referência SIVcpz (usada como *outgroup*). ◆ - Seqüência estudada para a qual se obteve classificação molecular; ▼ - Seqüência estudada, que devido ao seu posicionamento na árvore, não foi possível obter classificação molecular.

A partir da análise da topologia da árvore filogenética (Figura 7) observou-se existir uma clara separação entre os grupos de sequências pertencentes aos diferentes subtipos víricos, sendo os agrupamentos suportados por valores de *bootstrap* significativos (valores superiores a 70%), permitindo a classificação molecular da maioria das sequências em estudo. Em termos globais, a análise filogenética realizada revelou os resultados que se encontram na Tabela 7.

**Tabela 7** – Classificação filogenética das sequências em estudo.

Subtipo	RT	
	Nº de amostras (n = 59)	Nº de casos (n = 34)
G	25 (42,4%)	14 (41,2%)
02_AG	4 (6,8%)	2 (5,9%)
D	1 (1,7%)	1 (2,9%)
B	14 (23,7%)	8 (23,5%)
A	2 (3,4%)	1 (2,9%)
C	8 (13,6%)	5 (14,7%)
Não classificadas*	5 (8,5%)	3 (8,8%)

\*Pelo seu posicionamento ambíguo na árvore, as sequências foram posteriormente submetidas a nova análise.

Assim, das 59 sequências “consenso” analisadas, 54 (91,5%) foram classificadas em agrupamentos de subtipos víricos específicos, suportados por elevados valores de *bootstrap*: 1 sequência (M21F2) foi classificada como pertencente ao **subtipo D**, 2 (M20F1, M20F2) ao **subtipo A**, 4 (M34F1, M34F2, M3F1, M3F2) a formas recombinadas do tipo **CRF02\_AG**, 8 (M33F1, M33F2, M10F2, M17F1, M17F2, M28F2, M19F1, M19F2) ao **subtipo C**, 14 (M16F1, M16F2, M26F1, M26F2, M2F1, M2F2, M12F1, M6F1, M6F2, M25F1, M25F2, M32F2, M5F1, M5F2) ao **subtipo B**, e 25 (M18F1, M18F2, M22F1, M11F1, M11F2, M7F1, M7F2, M9F1, M9F2, M30F1, M30F2, M14F1, M14F2, M24F1, M24F2, M4F1, M4F2, M13F2, M13F1, M1F1, M1F2, M31F1, M29F2, M8F1, M8F2) ao **subtipo G**.

As sequências classificadas como subtipo G formam um agrupamento robusto suportado por um valor de *bootstrap* de 91%. Nele estão incluídas 25 sequências “consenso” do presente estudo e 9 sequências de referência retiradas da base de dados, 6 classificadas como subtipo G e 3 como forma recombinada do tipo CRF14\_BG.

As sequências “consenso” classificadas como potencialmente recombinantes AG (n=4), mais propriamente tipo CRF02\_AG, formam um subagrupamento sustentado por um valor de *bootstrap* de 76%.

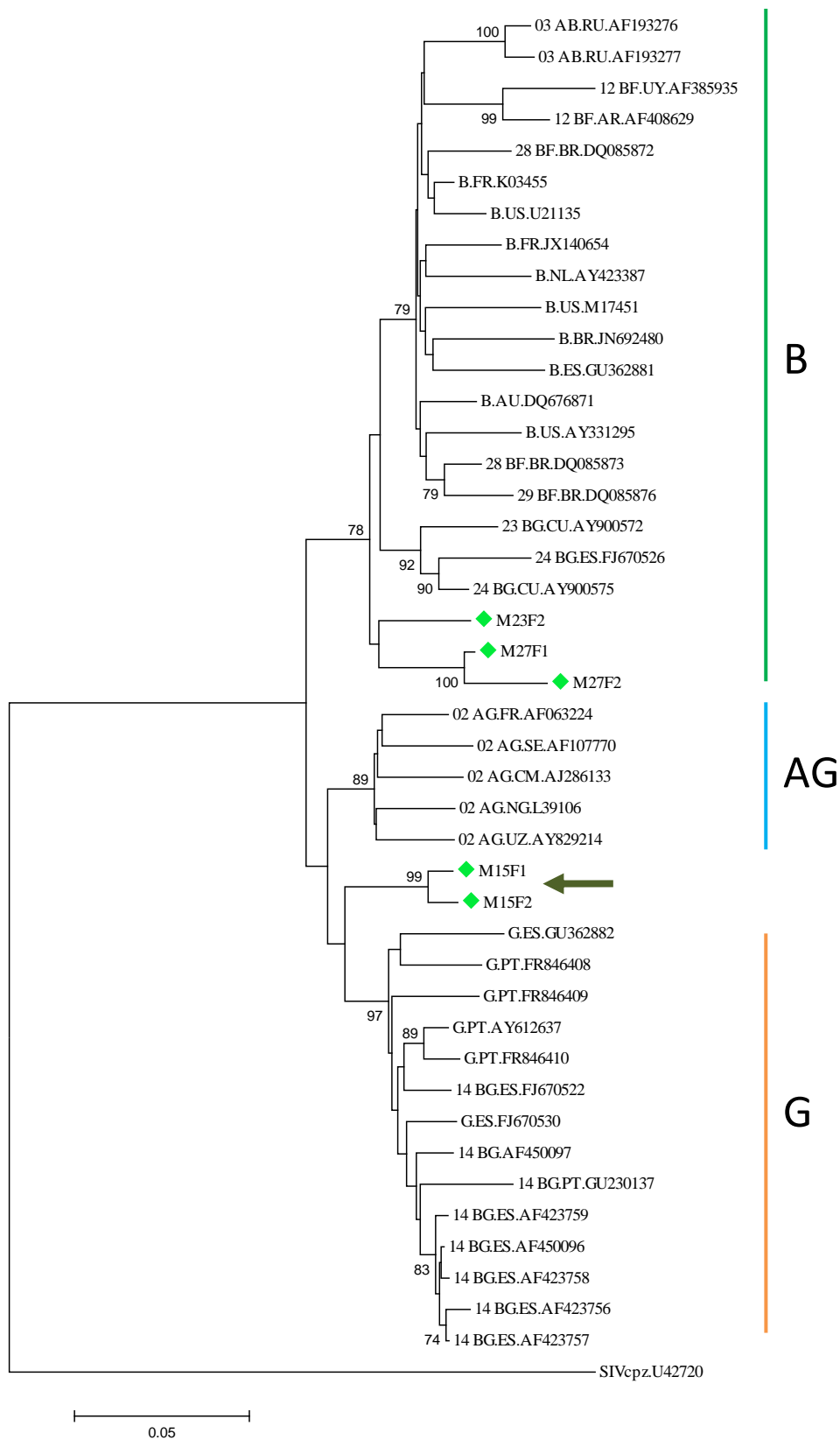
No agrupamento D, a sequência “consenso” M21F2 agrupou com duas sequências de referência obtidas na África do Sul, com um valor de *bootstrap* de 75%.

As sequências “consenso” classificadas como subtipo B (n=14) formam um grupo homogêneo e robusto (valor de *bootstrap* de 86%) com sequências de referência B.

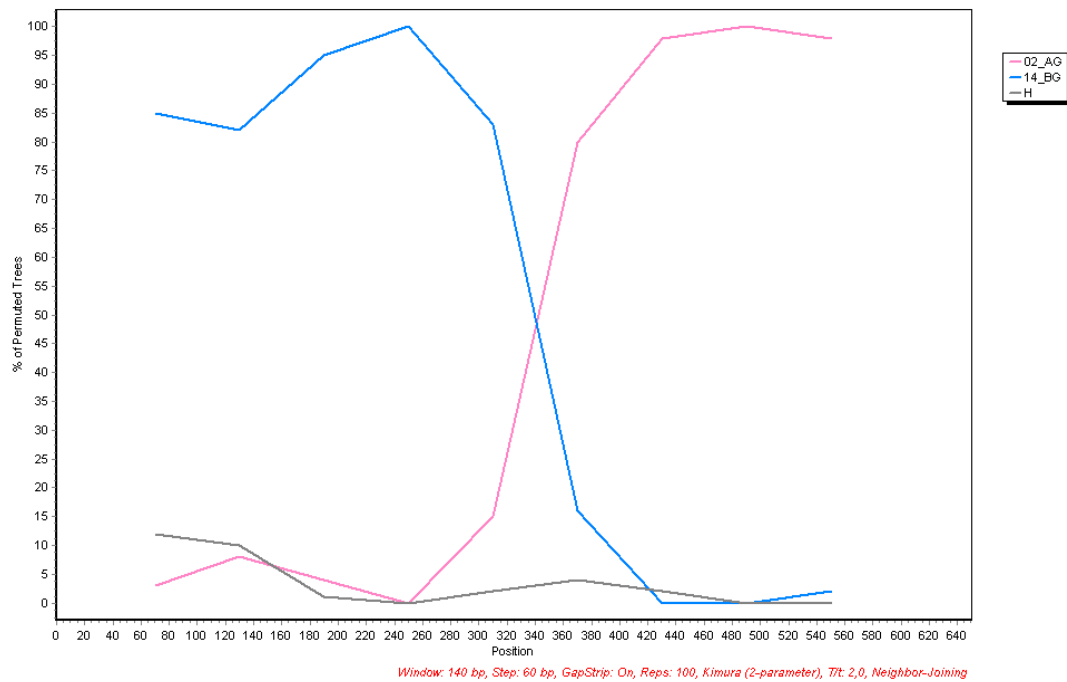
No agrupamento de sequências de referência classificadas como subtipo A observou-se a inclusão de duas sequências “consenso” (M20F1 e M20F2), suportadas por um valor de *bootstrap* de 71%.

Por fim, as sequências “consenso” classificadas como subtipo C (n=8) formam um agrupamento com as sequências de referência C e suportado por um valor de *bootstrap* de 88%.

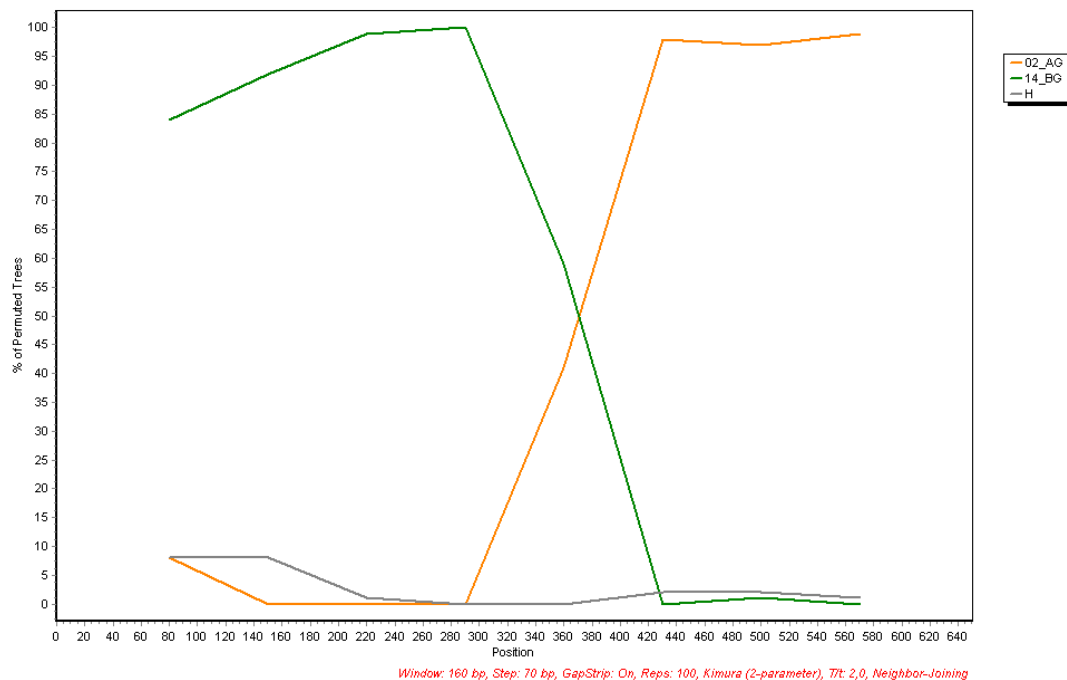
Na tentativa de conseguir classificar com sucesso as 5 sequências (M23F2, M27F1, M27F2, M15F1 e M15F2) que não foram classificadas na primeira árvore, foi construída uma segunda árvore filogenética (Figura 8) com inclusão de um maior número de sequências de referência. Assim, foi construído um alinhamento múltiplo com as 5 sequências “consenso” e com um total de 53 sequências de referência retiradas da base de dados.



**Figura 8** – Árvore filogenética construída com base num fragmento de 648 pb da região RT do gene *pol* do HIV-1 a partir do alinhamento de 5 sequências nucleotídicas “consenso” estudadas (assinaladas com um símbolo colorido), 53 sequências de referência (subtipos indicados à direita) e uma sequência de referência SIVcpz (usada como *outgroup*). A seta assinala as sequências não classificadas na árvore e que foram submetidas a análise por *bootscanning*.



**Figura 9** – Análise por *bootscanning* da sequência M15F1 para identificação de eventos de recombinação genética na região RT. As sequências de referência utilizadas nesta análise estão indicadas na legenda e a vermelho encontram-se os parâmetros utilizados.



**Figura 10** - Análise por *bootscanning* da sequência M15F2 para identificação de eventos de recombinação genética na região RT. As sequências de referência utilizadas nesta análise estão indicadas na legenda e a vermelho encontram-se os parâmetros utilizados.

Da análise da topologia da segunda árvore filogenética construída (Figura 8) observou-se uma separação de 4 agrupamentos de sequências.

Um agrupamento apenas formado pelas 5 sequências de referência CRF02\_AG, suportado por um valor de *bootstrap* de 89%.

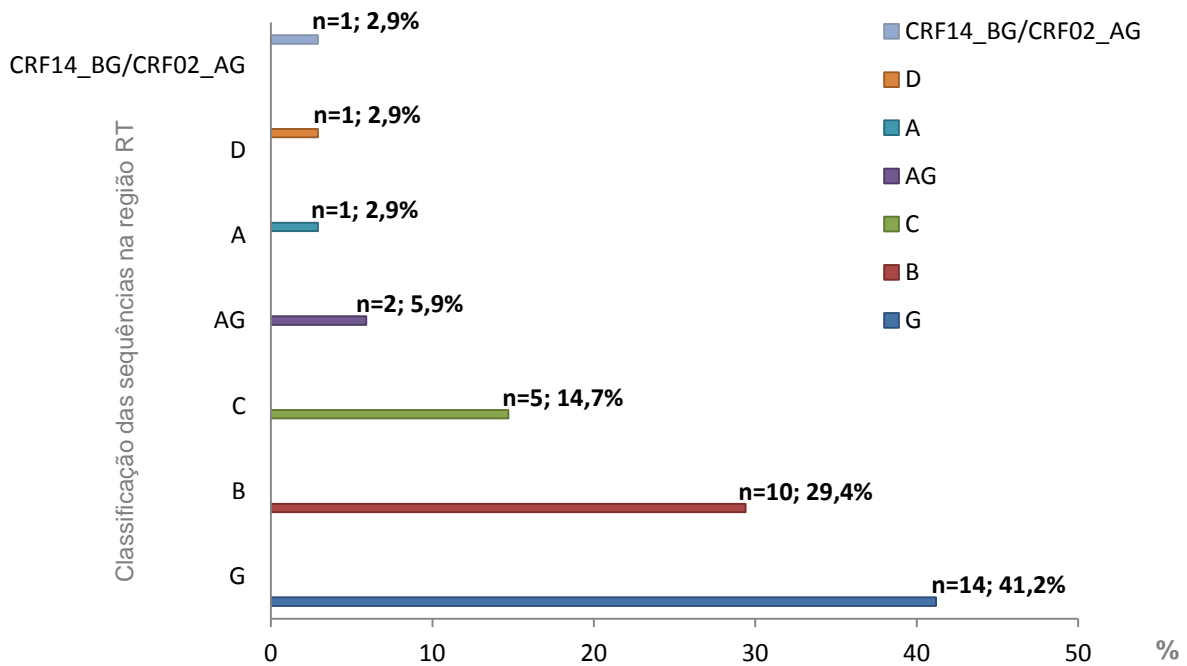
Um agrupamento suportado por um valor de *bootstrap* de 78% que incluiu 3 das sequências “consenso” (M27F1, M27F2 e M23F2) em análise com as sequências de referência classificadas de subtipo B (puro) e várias CRF classificadas também de subtipo B na região RT.

Um agrupamento de sequências classificadas na região RT como subtipo G suportado por um valor de *bootstrap* de 97%, e que incluiu apenas as 14 sequências de referência utilizadas, sendo que 6 delas eram do subtipo G (puro) e 8 eram CRF14\_BG (subtipo G na região RT).

Um agrupamento com posicionamento ambíguo na árvore, suportado por um valor de *bootstrap* de 99% com apenas as 2 sequências (M15F1 e M15F2) em análise, e que mais uma vez, nesta 2ª árvore, não foram classificadas.

Atendendo à topologia da árvore e ao posicionamento das sequências M15F1 e M15F2 foi investigada a existência de possíveis eventos de recombinação genética. A análise por *bootscanning* das referidas sequências sugeriu a ocorrência de eventos de recombinação entre a CRF14\_BG e a CRF02\_AG, concretamente, as sequências apresentavam um primeiro segmento com aproximadamente 360 pb classificado com CRF14\_BG e um segundo segmento de aproximadamente 200 pb classificado como CRF02\_AG (Figuras 9 e 10).

A distribuição dos 34 casos estudados de acordo com a sua classificação filogenética pode ser observada na Figura 11.



**Figura 11** - Representação gráfica da proporção relativa dos subtipos de HIV-1 que infectam o grupo populacional estudado.

#### 4.4 Análise das Sequências Aminoacídicas

Após a tradução das 59 sequências nucleotídicas “consenso”, estas foram distribuídas por grupos específicos. Seguiu-se a construção de alinhamentos, com as sequências aminoacídicas obtidas e a sequência de referência traduzida do subtipo B (*GeneBank*, número de acesso: K03455). Estes alinhamentos foram a base para a identificação das mutações aos RTI em cada grupo estudado. As sequências aminoacídicas analisadas possuem em média cerca de 219 aminoácidos da proteína RT do HIV-1.

#### **4.4.1 Avaliação da proporção de mutações de resistência aos RTI**

A pesquisa de mutações de resistência foi realizada pela distribuição das sequências “consenso” RT obtidas em grupos específicos (A a F) no propósito de identificar a proporção de mutações de resistência aos RTI (NRTI e NNRTI) em cada grupo e avaliar a sua variação no tempo, de acordo com a evolução dos regimes de TAR de prevenção administrados durante a gravidez. De forma a verificar o número de mutações identificadas a partir da análise dos alinhamentos, todas as sequências em estudo foram também submetidas ao programa *Geno2pheno* para identificação das mutações de resistência e outros polimorfismos genéticos.

A) Análise comparativa de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de primeiras amostras (associadas ao nascimento do 1º filho) com grupo de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de segundas amostras (associadas ao nascimento do 2º filho) (Anexo 3 – Figuras 1 e 2).

Da comparação das 59 sequências aminoacídicas “consenso” agrupadas e alinhadas com a sequência referência do subtipo B, verificou-se a presença das mutações descritas na Tabela 8.

**Tabela 8** – Frequência das mutações de resistência aos RTI, nas sequências aminoacídicas “consenso” observadas nas primeiras e segundas amostras maternas.

Mutações de resistência		$N_{MF1}$ (n=28 SEQ)	$N_{MF2}$ (n=31 SEQ)
N R T I	M41L	1	2
	A62V	0	1
	D67N	1	0
	K70R	1	0
	L74V	0	1
	M184V	1	1
	L210W	1	1
	T215Y	3	5
	K219Q	2	3
<b>Sub-Total</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	
N N R T I	K103N	0	3
	V106I	3	2
	V108I	0	1
	V179D	1	2
	Y181C	0	1
	Y188L	1	0
	H221Y	0	1
<b>Sub-Total</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>24</b>	

$N_{MF1}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências derivadas de amostras maternas associadas ao nascimento do 1º filho;  $N_{MF2}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências derivadas de amostras maternas associadas ao nascimento do 2º filho.

De um total 28 sequências associadas ao nascimento do 1º filho, foi observado que em 9 (**32,1%**) existe pelo menos uma mutação associada à resistência aos RTI. Relativamente às mutações associadas especificamente aos NRTI, 6 (21,4%) sequências apresentaram pelo menos uma mutação, sendo as mais frequentes as mutações K219Q ou T215Y. Quanto aos NNRTI, 5 (17,9%) sequências apresentaram pelo menos uma mutação de resistência, sendo a mutação mais observada a V106I.

Do total de 31 sequências associadas ao nascimento do 2º filho, foi observado em 12 (**38,7%**) a existência de pelo menos uma mutação de resistência. Em 9 (29%) sequências observou-se pelo menos uma mutação associada à resistência aos NRTI,

sendo a mutação mais frequente a T215Y. Em 8 (25,8%) sequências identificou-se pelo menos uma mutação de resistência aos NNRTI.

**B)** Grupo de sequências correspondentes a amostras maternas colhidas antes do ano de 2003 com grupo de sequências correspondentes a amostras maternas colhidas após o ano de 2003.

A fronteira temporal desta análise foi determinada na população estudada pelo ano em que ocorreram os últimos casos de mães que cumpriram regime de TD para prevenção da TMF do HIV-1. De facto, entre o ano de 1999 a 2003 os regimes de TAR administrados foram a TD e a TT. Nesta análise foram construídos dois alinhamentos, um composto pelo grupo de sequências correspondentes a colheitas efectuadas antes do ano de 2003 (Anexo 3 - Figura 3), e outro constituído pelo grupo de sequências correspondentes a colheitas efectuadas depois do ano de 2003 (Anexo 3 – Figura 4). Da análise comparativa das 59 sequências aminoacídicas “consenso” agrupadas e alinhadas com a sequência de referência do subtipo B foi possível identificar as mutações descritas na Tabela 9.

**Tabela 9** - Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas nas sequências derivadas de amostras colhidas antes e depois do ano de 2003.

Mutações de resistência		N <sub>Antes03</sub> (n=26 SEQ)	N <sub>Depois03</sub> (n=33 SEQ)
N R T I	M41L	1	2
	A62V	0	1
	D67N	1	0
	K70R	1	0
	L74V	0	1
	M184V	1	1
	L210W	1	1
	T215Y	2	6
	K219Q	2	3
	<b>Sub-Total</b>	<b>9</b>	<b>15</b>
N N R T I	K103N	1	2
	V106I	2	3
	V108I	0	1
	V179D	2	1
	Y181C	0	1
	Y188L	1	0
	H221Y	0	1
	<b>Sub-Total</b>	<b>6</b>	<b>9</b>
<b>Total</b>		<b>15</b>	<b>24</b>

N<sub>antes03</sub> – número de mutações identificadas no grupo de sequências correspondentes a colheitas efectuadas antes do ano de 2003; N<sub>Depois03</sub> – número de mutações identificadas no grupo de sequências correspondentes a colheitas efectuadas depois do ano de 2003.

No grupo de sequências derivadas de amostras colhidas antes do ano de 2003 (n=26) foi observado que em 9 (**34,6%**) sequências existia pelo menos uma mutação associada à resistência aos RTI. Destas 9 sequências, 5 (19,2%) apresentaram pelo menos uma mutação associada à resistência aos NRTI e 6 (23,1%) apresentaram pelo menos uma mutação associada à resistência aos NNRTI.

No grupo de sequências derivadas de amostras colhidas depois do ano de 2003 (n=33) foi observado que em 12 (**36,4%**) sequências existia pelo menos uma mutação associada à resistência aos RTI. Quanto às mutações associadas especificamente aos NRTI, 10 (30,3%) sequências apresentaram pelo menos uma mutação, sendo a mais observada a mutação T215Y. Quanto as mutações associadas à resistência aos NNRTI,

7 (21,2%) sequências apresentaram pelo menos uma mutação, sendo a mutação mais frequente a V106I.

C) Análise comparativa do grupo de sequências correspondentes a mães que cumpriram TAR de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 durante a gravidez com o grupo de sequências correspondentes a mães que não cumpriram qualquer medida de prevenção da transmissão do vírus ao filho.

Para esta análise foram construídos dois alinhamentos, um constituído pelo grupo de sequências obtidas de mães infectadas por HIV-1 que cumpriram TAR de prevenção (n=53) (Anexo 3 – Figura 5) e outro com o grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR de prevenção da transmissão do vírus ao filho (n=6) (Anexo 3 – Figura 6). Através da análise das sequências agrupadas e alinhadas com a sequência referência do subtipo B observaram-se as mutações descritas na Tabela 10.

**Tabela 10** - Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas nas sequências correspondentes a mães que cumpriram TAR de prevenção e a mães que não cumpriram qualquer medida de prevenção da transmissão do HIV-1 ao filho.

Mutações de resistência		$N_{C/TAR}$ (n=53 SEQ)	$N_{S/TAR}$ (n=6 SEQ)
N R T I	M41L	3	0
	A62V	1	0
	D67N	1	0
	K70R	1	0
	L74V	1	0
	M184V	2	0
	L210W	2	0
	T215Y	6	2
	K219Q	5	1
<b>Sub-Total</b>	<b>22</b>	<b>3</b>	
N N R T I	K103N	3	0
	V106I	4	0
	V108I	1	0
	V179D	2	1
	Y181C	1	0
	Y188L	1	0
	H221Y	1	0
	<b>Sub-Total</b>	<b>13</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>4</b>	

$N_{C/TAR}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram TAR de prevenção;  $N_{S/TAR}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR de prevenção.

Das 53 sequências aminoacídicas obtidas de mães que cumpriram TAR de prevenção, 19 (**35,8%**) apresentaram pelo menos uma mutação associada à resistência aos RTI. Quanto aos NRTI, 13 (24,5%) sequências apresentaram pelo menos uma mutação, sendo que as mutações mais observadas foram as K219Q ou T215Y. Relativamente aos NNRTI, 12 (22,6%) sequências apresentaram pelo menos uma mutação, sendo as mais frequentes as mutações K103N ou V106I.

No grupo de sequências aminoacídicas obtidas de mães que não cumpriram TAR de prevenção (n=6), 2 (**33,3%**) sequências apresentaram mutações associadas à resistência aos RTI. Foram identificadas duas mutações associadas à resistência aos

NRTI (T125Y e K219Q) em 2 (33,3%) sequências e apenas 1 (16,7%) sequência apresentou a mutação V179D, associada à resistência aos NNRTI.

**D)** Análise comparativa de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR de prevenção da transmissão do HIV-1 aos filhos, pela sua distribuição num grupo de sequências associadas à transmissão vertical do vírus e num grupo de sequências em que não ocorreu transmissão do vírus ao filho.

Para esta análise foram construídos dois alinhamentos, um constituído pelo grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR de prevenção e se verificou transmissão do vírus ao filho (Anexo 3 – Figura 7), e outro constituído pelo grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR mas também não transmitiram o vírus aos seus filhos (Anexo 3 – Figura 8). Da comparação das sequências agrupadas e alinhadas com a sequência de referência do subtipo B identificaram-se as mutações descritas na Tabela 11.

**Tabela 11** - Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas nas sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR em que ocorreu e em que não ocorreu transmissão do vírus ao filho.

Mutações de resistência		$N_{S/TAR\_TV}$ (n=2 SEQ)	$N_{S/TAR\_S/TV}$ (n=4 SEQ)
N R T I	T215Y	0	2
	K219Q	0	1
	<b>Sub-Total</b>	<b>0</b>	<b>3</b>
N N R T I	V179D	0	1
	<b>Sub-Total</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>0</b>	<b>4</b>

$N_{S/TAR\_TV}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR e ocorreu transmissão vertical;  $N_{S/TAR\_S/TV}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR e não ocorreu transmissão vertical.

O grupo de sequências que corresponde a mães que não cumpriram TAR de prevenção e transmitiram o HIV-1 ao filho é composto apenas por duas sequências (M16F1 e M18F1), sendo que em nenhuma delas se observou qualquer mutação de resistência aos RTI.

Contrariamente, nas quatro sequências que compõe o grupo de sequências de mães que não cumpriram TAR de prevenção e simultaneamente também não transmitiram o HIV-1 aos filhos (n=4), observou-se que 2 (50%) sequências apresentaram mutações associadas à resistência aos NRTI (T215Y e K219Q) e 1 (25%) sequência apresentou a mutação V179D, associada à resistência aos NNRTI.

Na sequência M8F1 observaram-se as mutações T215Y e K219Q (associadas à resistência aos fármacos zidovudina e stavudina), já na sequência M29F2 observaram-se as mutações T215Y (associada à resistência aos fármacos zidovudina e stavudina) e V179D (associada à redução da eficácia do etravirina).

**E) Análise comparativa entre grupos de sequências aminoacídicas “consenso” obtidas de mães que cumpriram diferentes regimes de TAR de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 durante a gravidez.**

Para esta análise foram construídos diferentes alinhamentos: alinhamento de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de mães que cumpriram TD (Anexo 3 – Figura 9); alinhamento de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de mães que cumpriram TT (Anexo 3 – Figura 10); alinhamento de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de mães que cumpriram HAART (Anexo 3 – Figura 11). Da comparação das 53 sequências “consenso” agrupadas e alinhadas com a sequência de referência do subtipo B foi possível identificar as mutações descritas na Tabela 12.

**Tabela 12** - Frequência das mutações de resistência aos RTI observadas em grupos de sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de mães que cumpriram TD, TT e HAART.

Mutações de resistência		$N_{TD}$ (n=5 SEQ)	$N_{TT}$ (n=39 SEQ)		$N_{HAART}$ (n=9 SEQ)
		MF1	MF1 n=19 SEQ	MF2 n=20 SEQ	MF2
N R T I	M41L	0	1	1	1
	A62V	0	0	1	0
	K70R	0	1	0	0
	L74V	0	0	1	0
	M184V	0	1	1	0
	L210W	0	1	0	1
	T215Y	0	2	2	1
	K219Q	1	0	1	1
	<b>Sub-Total</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>4</b>
N N R T I	K103N	0	0	3	0
	V106I	0	3	1	1
	V108I	0	0	1	0
	V179D	0	1	1	0
	Y181C	0	0	1	0
	Y188L	0	1	0	0
	H221Y	0	0	1	0
	<b>Sub-Total</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>26</b>	<b>5</b>	<b>5</b>

$N_{TD}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram TD;  $N_{TT}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram TT;  $N_{HAART}$  – número de mutações identificadas no grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram terapia HAART. **MF1** – sequências maternas associadas ao nascimento de um primeiro filho; **MF2** – sequências maternas associadas ao nascimento de um segundo filho.

No grupo de sequências correspondentes a mães que cumpriram TD (n=5) apenas a sequência M15F1 (associada ao nascimento de um primeiro filho) apresentou uma mutação associada à resistência aos NRTI (K219Q), não sendo observadas mutações associadas à resistência aos NNRTI.

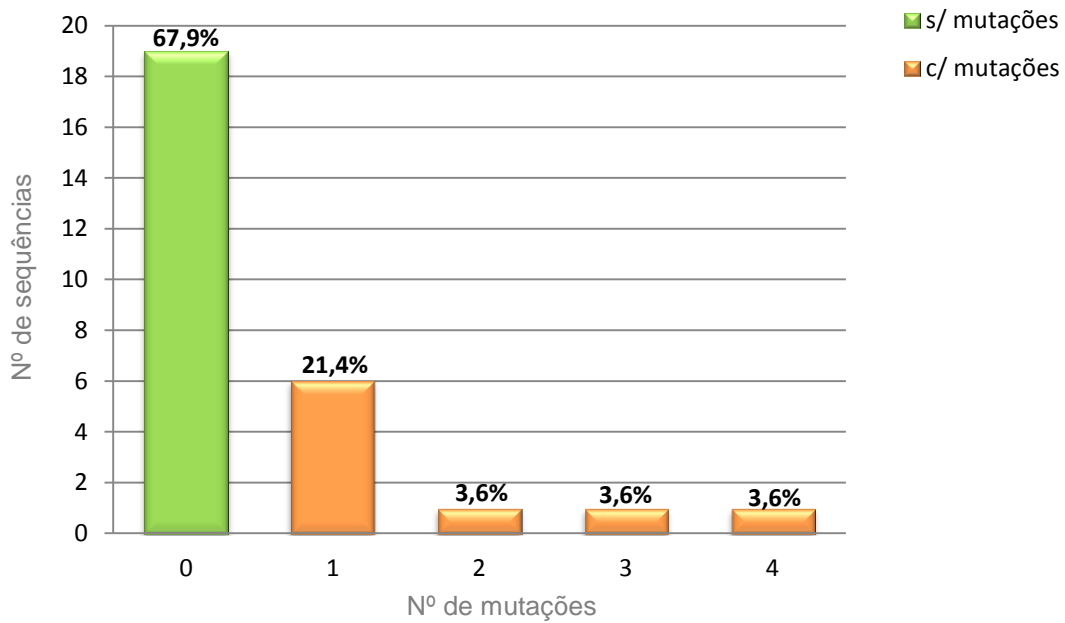
No grupo de sequências correspondentes a mães que cumpriram TT (n=39), que incluía um número semelhante de sequências derivadas de primeiras amostras (n=19) e de sequências derivadas de segundas amostras (n=20), observou-se que em 16 (41%) existia pelo menos uma mutação associada à resistência aos RTI. As mutações mais observadas foram T215Y (associada aos NRTI) e a V106I (associada aos NNRTI).

No grupo de sequências correspondentes a mães que cumpriram HAART (n=9), observou-se quem em 2 (22,2%) das sequências existia pelo menos uma mutação associada à resistência aos NRTI, e apenas 1 (11,1%) sequência revelou uma mutação associada à resistência aos NNRTI (V106I).

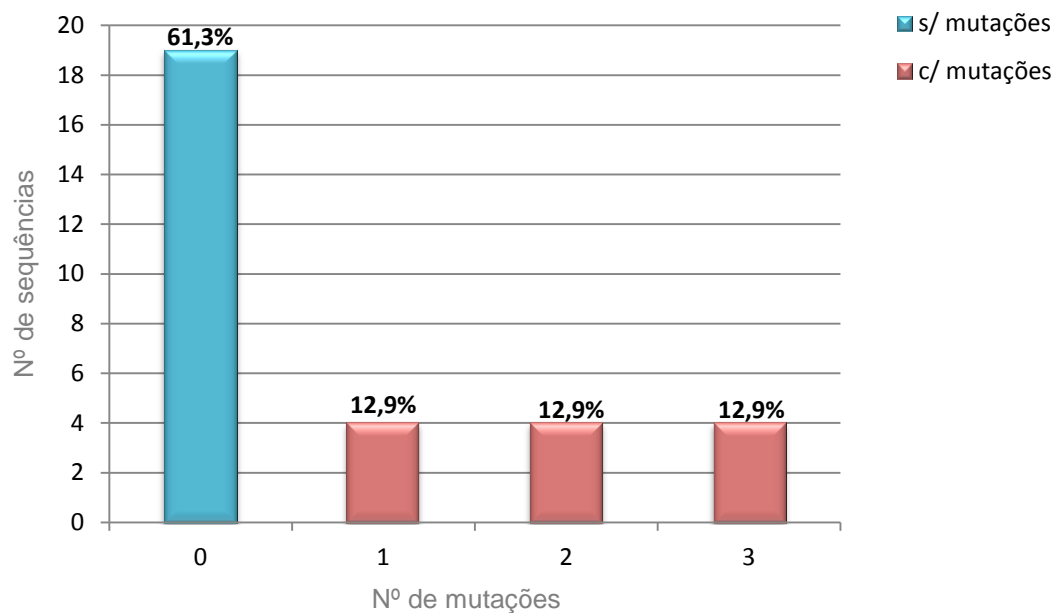
#### **F) Distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” pelo número de mutações de resistência aos RTI**

A análise das 59 sequências aminoacídicas “consenso” revelou existir uma maior prevalência de mutações associadas à resistência aos NRTI, em particular à zidovudina. Assim, as mutações especificamente associadas aos NRTI identificadas, M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y e K219Q (colectivamente designadas na literatura como TAM) encontram-se associadas à resistência à zidovudina, a mutação L74V encontra-se associada a elevados níveis de resistência à didanosina e a mutação M184V encontra-se associada a elevados níveis de resistência à lamivudina e à emtricitabina. Quanto aos NNRTI, três mutações (K103N, Y181C e Y188L) identificadas nas sequências em estudo, estão associadas a elevados níveis de resistência a fármacos como a nevirapina e o efavirenz.

A distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” obtidas, de primeiras (n=28) e segundas amostras (n=31) atendendo ao número de mutações observado em cada uma das sequências encontra-se descrito nas Figuras 12 e 13.



**Figura 12** – Distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de primeiras amostras pelo número de mutações de resistência aos RTI observado em cada uma das sequências derivadas de amostras colhidas até 2005.



**Figura 13** – Distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de segundas amostras pelo número de mutações de resistência aos RTI observado em cada uma das sequências derivadas de amostras colhidas após 2005 (ano a partir do qual foi iniciada a terapia HAART como prevenção da TMF do HIV-1).

Assim, do grupo de sequências derivadas de primeiras amostras para o grupo de sequências derivadas de segundas amostras observou-se um incremento, respectivamente, de 32,1% para 38,7% no número de sequências com pelo menos uma mutação de resistência aos RTI.

Relativamente às sequências em que se encontrou apenas uma mutação de resistência, verificou-se um redução de 21,4% para 12,9%, respectivamente, do grupo de primeiras amostras para o grupo de segundas amostras maternas.

Quanto às sequências em que se observaram duas mutações distintas, no grupo de sequências derivadas de primeiras amostras maternas, a sequência **M8F1** (S/TAR) apresentou as mutações T215Y e K219Q (associadas à resistência à zidovudina e à stavudina), enquanto no grupo de sequências derivadas de segundas amostras, foram encontradas 4 sequências com diferentes perfis de mutações. Deste modo, as sequências **M10F2** (HAART com os fármacos zidovudina, lamivudina, ritonavir e nevirapina) e **M28F2** (TT com os fármacos zidovudina, lamivudina e nevirapina) apresentaram as mutações T215Y e K219Q (associadas à resistência à zidovudina e à stavudina), a sequência **M25F2** (TT com os fármacos zidovudina, lamivudina e nevirapina) apresentou as mutações M184V (associada a elevados níveis de resistência à lamivudina e emtricitabina) e K103N (associada a elevados níveis de resistência à nevirapina e ao efavirenz) e por fim a sequência **M29F2** (S/TAR) apresentou as mutações T215Y (associada à resistência à zidovudina e à stavudina) e V179D (associada à redução da eficácia da etravirina).

Nas sequências em que foram encontradas três mutações distintas, de um modo geral encontraram-se duas mutações associadas aos NRTI e uma mutação associada aos NNRTI. Para o grupo de primeiras amostras a sequência **M12F1** (TT com os fármacos zidovudina, lamivudina e nelfinavir) apresentou as mutações D67N e K70R (associadas a níveis intermédios de resistência à zidovudina e à stavudina) e a mutação V106I (associada à redução da eficácia dos NNRTI), já no grupo de segundas amostras a sequência **M6F2** (TT com os fármacos zidovudina, lamivudina e indinavir) apresentou as mutações T215Y e K219Q (associadas à resistência à zidovudina e à stavudina) e V106I (associada à redução da eficácia dos NNRTI) e a sequência **M23F2** (TT com os fármacos zidovudina, lamivudina e nevirapina) apresentou as mutações M41L e A62V (associadas a baixos níveis de resistência à zidovudina e à stavudina) e K103N (associada a elevados níveis de resistência à nevirapina e ao efavirenz). Na sequência **M21F2** (TT com os fármacos zidovudina, lamivudina e nevirapina) foram encontradas

as mutações V108I, Y181C e H221Y (associadas a elevados níveis de resistência efavirenz e a nevirapina).

A sequência **M2F1**, derivada de uma primeira amostra materna, apresentou quatro mutações (M41L, V106I, M184V e L210W), já a sequência **M2F2**, derivada de uma segunda amostra apresentou três mutações (M41L, V106I e L210W) distintas. Neste caso, a mãe M2 cumpriu TT (com os fármacos zidovudina, lamivudina e nevirapina) de prevenção na primeira gravidez e passou para um regime HAART (com os fármacos tenofovir, didanosina, nevirapina e ritonavir) na segunda gravidez. Das mutações identificadas nas sequências M2F1 e M2F2, as mutações M41L e L210W estão associadas à resistência à zidovudina e à stavudina, a mutação M184V está associada a elevados níveis de resistência à lamivudina e à emtricitabina e a mutação V106I está associada à redução da eficácia dos NNRTI.

Analisando apenas os 25 casos para o qual se obteve sequência “consenso” para as duas amostras maternas (1ª amostra/1º filho; 2ª amostra/2º filho) verificou-se que em 11 (44%) dos casos foi encontrada pelo menos uma mutação de resistência aos RTI. Destes 11 casos observou-se que, no caso **M5** (1ª e 2ª gravidez cumpriu TT) o número de mutações encontradas manteve-se igual ao longo do tempo, nos casos **M2** (1ª gravidez cumpriu TT; 2ª gravidez cumpriu HAART), **M8** (1ª gravidez S/TAR; 2ª gravidez cumpriu TT), **M9** (1ª gravidez cumpriu TT; 2ª gravidez cumpriu HAART), **M15** (1ª gravidez cumpriu TD; 2ª gravidez cumpriu HAART) e **M26** (1ª e 2ª gravidez cumpriu TT) o número de mutações diminuiu da sequência derivada da 1ª amostra para a sequência derivada da 2ª amostra, e nos casos **M6**, **M11**, **M17**, **M27** (1ª e 2ª gravidez cumpriram TT) e **M25** (1ª gravidez cumpriu TD; 2ª gravidez cumpriu TT) o número de mutações aumentou da sequência derivada da 1ª amostra para a sequência derivada da 2ª amostra.

#### **4.4.2 Caracterização de polimorfismos naturais na região RT**

As 59 sequências aminoacídicas “consenso” obtidas no presente estudo foram analisadas quanto à presença de polimorfismos genéticos, não directamente associados à resistência aos anti-retrovíricos. Das 219 posições de aminoácidos analisadas, 50,2% (110/219) apresentaram pelo menos uma posição polimórfica comparativamente com a sequência de referência do subtipo B (Anexo 3 – Figura 12).

De uma forma geral, as sequências “consenso” de subtipos não-B (n=42) apresentaram maior percentagem de polimorfismos naturais em relação às sequências “consenso” do subtipo B (n=17). Dos polimorfismos encontrados, os mais observados foram o L214F em 48 (81,4%) sequências, V35T ou T200A em 39 (66,1%) sequências. Os polimorfismos genéticos naturais observados nas 59 sequências aminoacídicas “consenso” estudadas encontram-se descritos na Tabela 13.

**Tabela 13** – Polimorfismos naturais da região RT do gene *pol* do HIV-1 observados no conjunto das 59 sequências aminoacídicas “consenso” analisadas.

Polimorfismos naturais	Classificação filogenética das sequências		
	Subtipos não-B (n= 42)	Subtipo B (n=17)	TOTAL (n=59)
V35T	37 (88,1%)	2 (11,8%)	<b>39</b> (66,1%)
V60I	27 (64,3%)	2 (11,8%)	<b>29</b> (49,2%)
R83K	0	6 (35,3 %)	<b>6</b> (10,2%)
A98S	24 (57,1%)	3 (17,6%)	<b>27</b> (45,8%)
E122K	6 (14,3%)	13 (76,4%)	<b>19</b> (32,2%)
D123S	22 (52,4%)	2 (11,8%)	<b>24</b> (40,7%)
D123E	2 (4,8%)	7 (41,2%)	<b>9</b> (15,3%)
K173I/T	29 (69,0%)	0	<b>29</b> (49,2%)
Q174K	30 (71,4%)	0	<b>30</b> (50,9%)
D177E	36 (85,7%)	2 (11,8%)	<b>38</b> (64,4%)
T200A	36 (85,7%)	3 (17,6%)	<b>39</b> (66,1%)
Q207E	11 (26,2%)	0	<b>11</b> (18,6%)
Q207K	22 (52,4%)	0	<b>22</b> (37,3%)
R211S	16 (38,1%)	0	<b>16</b> (27,1%)
R211K	12 (28,6%)	11 (64,7%)	<b>23</b> (39,0%)
L214F	34 (81%)	14 (82,4%)	<b>48</b> (81,4%)
H235Q	21 (50%)	8 (47,1%)	<b>29</b> (49,2%)

Foi ainda observado que o motivo de resíduos aminoacídicos descrito como essencial para a manutenção da actividade catalítica da enzima ( $D_{110}D_{185}D_{186}$ ) e também os resíduos correspondentes ao local de ligação dos dNTPs ( $K_{65}$ ,  $R_{72}$ ,  $Y_{115}$  e  $Q_{151}$ ) [142] (Anexo 3 – Figura 12) não se encontravam conservados em três sequências. Relativamente à tríade catalítica, as sequências M15F1 e M6F2 apresentaram o motivo alterado, respectivamente para  $D_{110}A_{185}D_{186}$  e  $D_{110}A_{185}H_{186}$ . Quanto ao local de ligação dos dNTP a sequência M33F2 apresentou alteração de um resíduo correspondendo a mutação R72K.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

A actual epidemia do HIV/SIDA é o resultado directo da eficácia da transmissão de HIV. Em menos de uma década a SIDA tornou-se a maior causa de morte em mulheres com menos de 45 anos de idade e em crianças, entre o primeiro e o quinto ano de vida [79]. O relatório da *AIDS Epidemic Update*, publicado em 2012, indica existirem 34 milhões de infectados por HIV no Mundo, em que aproximadamente 6% dos casos são registados em crianças com menos de 15 anos de idade, sendo a transmissão vertical a principal causa de infecção por HIV-1 neste grupo [68].

Porém, nos últimos anos a implementação de um conjunto de medidas terapêuticas e clínicas têm permitido prevenir a TMF do HIV-1, conduzindo a um decréscimo significativo da taxa de transmissão vertical do vírus em países desenvolvidos nos quais existe acesso a anti-retrovíricos [79,80,82].

Vários regimes terapêuticos provaram ser eficientes para a redução da transmissão vertical por HIV-1 [80,86]. Desde 1994, que a administração da zidovudina (AZT) é efectuada por rotina a mulheres grávidas infectadas por HIV-1. Contudo, em 1996, devido ao aumento na prevalência de mutações de resistência aos anti-retrovíricos, foram iniciados regimes terapêuticos mais complexos, com administração de anti-retrovíricos de várias classes [86]. Actualmente, devido à maior eficácia na supressão vírica, a terapia HAART é o esquema terapêutico mais frequentemente usado no tratamento da infecção por HIV-1 [107].

No presente estudo pretendeu-se caracterizar a diversidade genética através da região RT do gene *pol* numa população de mães múltíparas infectadas por HIV-1; identificar os polimorfismos genéticos presentes nessa região e correlaciona-los com os diferentes subtipos víricos em circulação na população estudada; identificar mutações de resistência aos RTI e determinar a sua proporção em função da variação do cumprimento de diferentes regimes terapêuticos de prevenção da transmissão vertical do HIV-1.

O grupo alvo do presente estudo foi constituído por 34 mães multíparas infectadas por HIV-1, tendo sido analisadas para cada caso duas amostras maternas colhidas a quando do nascimento dos filhos (1ª amostra/1º filho; 2ª amostra/2º filho) e durante o período de tempo que decorreu entre os anos de 1999 a 2008.

Para o período de tempo até 2004 (inclusive), o qual incluiu todas as amostras maternas associadas ao nascimento do 1º filho, observou-se que a média de idades das mães era de 26,9 anos. No período de tempo após 2004, que incluiu todas as amostras maternas associadas ao nascimento de um 2º filho, verificou-se que a média de idades das mães subiu para 31,1 anos. Assim, na população estudada, a média de tempo entre o nascimento de um 1º e de um 2º filho foi de 4,2 anos.

Relativamente à naturalidade das mães incluídas no presente estudo, observou-se que uma proporção significativa dos casos era de naturalidade africana (n=11;32,4%), nomeadamente mães originárias de países das ex-colónias portuguesas e com os quais Portugal ainda mantém estreitas relações sociais e políticas.

Na população estudada, observamos que 10,3% (7/68) dos nascimentos ocorreram sem cumprimento de medidas de prevenção da TMF do HIV-1. Nestas condições, ocorreram apenas dois casos de transmissão vertical do vírus, ambos partos de primeiros filhos e ocorridos no ano de 2001. Por outro lado, observou-se que 89,7% (61/68) das amostras maternas analisadas foram associadas ao cumprimento de TAR de prevenção. Durante a primeira gravidez, constatou-se que 85,3% (29/34) das mães cumpriram TAR de prevenção, tendo esta proporção aumentado para 94,1% (32/34) na segunda gravidez. Assim, verificou-se que mais três mães iniciaram TAR de prevenção durante a segunda gravidez, e que duas mães, mesmo conhecendo o seu estado serológico para o HIV não cumpriram as medidas de prevenção a quando da segunda gravidez.

Durante o período do estudo, e em acordo com o tipo de TAR administrado durante a gravidez, observou-se que as alterações nos regimes de prevenção seguiram as actualizações das linhas de orientação internacionais da TAR de prevenção ao longo do tempo. Na verdade ocorreu uma evolução no tipo de TAR de prevenção administrada durante a gravidez, ou seja, a TD de prevenção no final dos anos 90, passou a ser substituída pela TT, sendo este o regime terapêutico mais frequentemente administrado (n=45; 66,2%) no grupo populacional estudado.

No entanto, entre 1999 e 2003, 26,1% (6/23) de mães fizeram TD (2 NRTI) de prevenção na gravidez (nascimento do 1º filho), e entre 2005 e 2008, 33,3% (10/30) de mães iniciaram HAART (2 NRTI + 1 NNRTI + 1 PI) como estratégia de prevenção (nascimento do 2º filho).

A matriz inicial deste estudo foi o DNA proviral extraído a partir de CMSP, seguindo-se a amplificação, por *nested* PCR, da região RT do gene *pol* do HIV-1. No início do presente estudo, para além da amplificação de um fragmento da região da RT pretendia-se também amplificar um fragmento da região da PR, uma vez que, nos últimos anos os PI têm sido bastante utilizados no esquema terapêutico padrão para o tratamento da infecção por HIV-1. Por isso, na primeira reacção de amplificação por *nested* PCR foram utilizados quatro *primers* externos (Material e Métodos - 3.4). Contudo, devido ao insucesso na amplificação do fragmento da PR e à escassez de tempo para continuar a realização deste trabalho prático optou-se por apenas efectuar a análise da RT e o estudo específico da PR ficou adiado para um futuro próximo.

Os protocolos de amplificação realizados neste estudo tiveram por base os descritos na literatura [119,137], tendo-se também em conta a temperatura de desnaturação e hibridação dos *primers*, a enzima utilizada na reacção de amplificação e as dimensões estimadas do fragmento de DNA a amplificar. A hibridação dos *primers* na sequência alvo é determinante para o sucesso da amplificação. Temperaturas de hibridação mais baixas reduzem a especificidade do ensaio e aumentam a possibilidade de ocorrer a amplificação de produtos inespecíficos. Se a temperatura de hibridação for demasiado alta, reduz-se a sensibilidade do ensaio aumentando o insucesso na obtenção de produtos. A amplificação de fragmentos de genomas com elevada variabilidade genética, como é o caso do HIV-1, torna ainda mais importante a correcta escolha das temperaturas de hibridação dos *primers*.

Do total de 68 amostras maternas submetidas a amplificação, foram obtidos 66 (97%) produtos da região RT do gene *pol* do HIV-1, o que denota a elevada sensibilidade do ensaio implementado. O insucesso na amplificação de duas amostras poderá estar relacionado com a baixa concentração de DNA proviral já que a maioria das amostras foram obtidas de mães que estavam sujeitas à pressão da TAR de prevenção da TMF do HIV-1.

A maioria dos produtos de PCR resultantes da 2ª reacção de amplificação mostrou a presença do fragmento específico pretendido (aproximadamente 650 pb), e por isso, foram de imediato purificados e sequenciados. Porém, em alguns dos amplificados observou-se também a presença simultânea de produtos de amplificação de massa molecular diferente à esperada, e que poderiam dever-se a uma eventual interferência do excesso dos 4 *primers* externos, usados e transferidos da primeira para a segunda reacção de amplificação. Nestes casos, a purificação do produto de amplificação foi realizada através da excisão da banda de interesse do gel de agarose.

Do total de 66 amostras entregues na UTI para sequenciação foram posteriormente obtidas 59 (89,4%) sequências nucleotídicas “consenso”, as quais corresponderam a 25 casos de mães múltiparas com sequências “consenso” para as duas amostras (correspondentes ao primeiro e ao segundo filho), e 9 casos de mães múltiparas com sequência “consenso” apenas para uma das amostras (correspondentes ao primeiro ou ao segundo filho).

Numa primeira fase as sequências nucleotídicas “consenso” RT do gene *pol* do HIV-1 foram sujeitas a uma análise por BLAST, de forma a obter a primeira informação molecular sobre a sua similaridade com sequências de referência dos diferentes subtipos víricos presentes na base de dados. Esta análise revelou, desde logo que 45,8% (27/59) das sequências possuíam similaridade com sequências de referência do subtipo G, 28,8% (17/59) com sequências de referência do subtipo B, 13,6% (8/59) com sequências de referência do subtipo C, 6,8% (4/59) com sequências de referência da forma recombinada AG, 3,4% (2/59) com sequências de referência do subtipo A e 1,7% (1/59) com sequências de referência do subtipo D.

No entanto, uma classificação mais detalhada das sequências foi efectuada por estimativa filogenética, que teve por base o alinhamento das 59 sequências “consenso” obtidas com 59 sequências de referência dos subtipos, sub-subtipos e das principais CRF do grupo M do HIV-1.

O método seleccionado na construção da árvore filogenética foi o de *Neighbor-Joining*, pela sua aplicabilidade a estudos de vírus com elevada taxa de evolução, e também pela sua eficiência e rapidez na obtenção de resultados, mesmo a quando da análise de um grande conjunto de dados [139]. Assim, quando duas sequências diferentes em análise derivam de uma sequência ancestral comum, é reconhecido que ao longo do tempo vão divergindo pela acumulação de substituições nucleotídicas. Perante as diferenças existentes entre as sequências é calculada uma matriz de distâncias nucleotídicas que serve de base para a construção da árvore filogenética. No entanto, o valor real de substituições pode ser subestimado devido à possibilidade de ocorrência de substituições consecutivas na mesma posição. Deste modo, torna-se necessário recorrer a modelos matemáticos para estimar o número real de substituições nucleotídicas que terão ocorrido ao longo do tempo. No presente estudo, para o cálculo de matrizes de distância foi utilizado o modelo da substituição de nucleótidos “Kimura 2-parâmetro”, que assume taxas diferentes entre transições (A-G, C-T) e transversões (A-C, A-T, G-C, G-T) [140].

Numa primeira análise da topologia da primeira árvore filogenética construída (Figura 7) constatou-se a existência de relações epidemiológicas entre as duas sequências “consenso” obtidas para cada uma das mães incluídas no presente estudo. Foi também observada uma clara separação entre os grupos de sequências pertencentes aos diferentes subtipos, sendo os agrupamentos suportados por valores de *bootstrap* significativos (>70%). A análise da região RT do gene *pol* do HIV-1 revelou uma elevada diversidade genética do vírus na população em estudo, com 5 subtipos representados (A, B, C, D e G), bem como a presença da forma recombinada do tipo CRF02\_AG. Os resultados obtidos permitem afirmar que 67,8% (40/59) do total de sequências da RT analisadas pertencem a subtipos não-B. Estes resultados estão de acordo com vários estudos [49,51,143,144], que reportam a introdução de infecções por estirpes não-B em vários países da Europa. A elevada diversidade de HIV-1 descrita em Portugal, comparativamente à reportada em outros países europeus, pode ser explicada pela heterogeneidade da população residente no país e pelos frequentes movimentos migratórios da população, nomeadamente idas e regresso de indivíduos após estadias prolongadas em países fora do espaço europeu [52,53].

As sequências classificadas como subtipo G (n=25) apresentaram elevada proximidade filogenética, quer com sequências de referência do subtipo G obtidas em Portugal e Espanha, quer com a forma recombinada CRF14\_BG. De referir que na região RT, alvo do presente estudo, a CRF14\_BG é classificada de subtipo G.

Segundo alguns autores [51], as estirpes de HIV-1 do subtipo G em circulação em Portugal terão sido introduzidas em toxicodependentes, a partir da comunidade imigrante africana residente no país [145,147]. No presente estudo, 80% das amostras classificadas na região RT de subtipo G derivam de mães com naturalidade portuguesa. A co-circulação dos subtipos B e G e a sua elevada prevalência no país, possibilitou o aparecimento de novas formas genéticas recombinadas B/G, tendo a sua disseminação ocorrido essencialmente através de utilizadores de drogas injectáveis [51,146,147].

As sequências classificadas como recombinantes AG (n=4), mais propriamente tipo CRF02\_AG, apresentam ancestral comum com o agrupamento classificado de subtipo G. De facto, a CRF02\_AG é classificada na região RT, alvo do presente estudo, como subtipo G. Alguns estudos sugerem que contrariamente ao que foi anteriormente estabelecido, o subtipo G não seja um subtipo puro, sendo a CRF02\_AG a sua forma ancestral parcial [148]. No entanto, estudos mais recentes repõem a classificação anteriormente estabelecida [149]. No presente estudo, os dois casos classificados como possíveis formas recombinadas do tipo CRF02\_AG derivam de uma mãe com naturalidade portuguesa e outra angolana.

O maior número de infecções a nível mundial, são causadas pelo subtipo C que predomina no continente africano e asiático, nomeadamente em países como a África do Sul, Moçambique, Índia e China [38,48]. A disseminação de estirpes víricas do subtipo C pela Europa encontra-se associada à transmissão heterossexual por imigrantes de regiões onde essas estirpes são endémicas [38,150]. No presente estudo todas as sequências classificadas de subtipo C derivam de mães naturais de países africanos, nomeadamente três de Moçambique e duas de Angola.

O subtipo A é predominante na Europa do Leste, África Central e Oriental e no Norte da Ásia [25,38]. No agrupamento classificado como subtipo A observou-se a inclusão das sequências M20F1 e M20F2, ambas obtidas de uma mãe de naturalidade Angolana.

Relativamente às sequências classificadas como subtipo B (n=14), foram todas obtidas de mães com naturalidade portuguesa, verificando-se que estas formavam um grupo homogéneo e robusto com as sequências de referência do subtipo B. No agrupamento de sequências classificadas como subtipo D, que apenas por razões históricas permanece classificado num subtipo diferente do subtipo B [47], foi observada a inclusão de uma sequência (M21F2), derivada de uma amostra colhida de uma mãe de origem angolana. Pela topologia da árvore filogenética observou-se existir um posicionamento ambíguo para 5 sequências em estudo, não sendo possível classificá-las quanto ao subtipo vírico.

De forma a classificar as 5 sequências (M15F1, M15F2, M23F2, M27F1 e M27F2) não classificadas na primeira árvore, foi construída uma segunda árvore filogenética (Figura 8). Esta teve como base a adição de um maior número de sequências de referência. Assim foi construído um alinhamento múltiplo com as 5 sequências “consenso” e com um total de 53 sequências de referência dos subtipos G, B e respectivas CRF conhecidas.

Pela análise da topologia da segunda árvore construída observou-se a clara separação do agrupamento classificado como subtipo B, do agrupamento classificado como subtipo AG e do agrupamento classificado como subtipo G.

No agrupamento B, suportado por um valor de *bootstrap* de 78%, observou-se a inclusão das sequências M23F2, M27F1 e M27F2, embora se apresentem separadas das restantes sequências de referência utilizadas, nomeadamente das sequências de referência do subtipo B consideradas puras. A distribuição das sequências do agrupamento B e o seu posicionamento num ramo isolado da árvore sugere que estas possam apresentar recombinação intra-subtipo e ser formas geneticamente mais heterogéneas na região RT analisada, demarcando-se assim das sequências de referência utilizadas.

Na construção da segunda árvore não foi possível obter a classificação das restantes duas sequências (M15F1 e M15F2). Atendendo à sua posição na árvore, e estando agrupadas a sequências de referência classificadas de subtipo G (na região RT) sem um valor de *bootstrap* significativo, foi investigada a hipótese destas poderem representar formas víricas potencialmente recombinadas. Assim foi realizada uma análise de *bootscanning*, recorrendo ao programa *SimPlot* (Figuras 9 e 10).

Os resultados obtidos sugeriram que as sequências em análise derivaram da eventual recombinação de duas formas recombinadas, CRF14\_BG/CRF02\_AG, classificadas na região RT de subtipo G. De referir, que ainda não foi descrito na literatura nenhum caso de recombinação genética entre as CRF14\_BG e CRF02\_AG, e que as sequências em causa foram obtidas de uma mãe com naturalidade angolana cujas amostras foram colhidas com um intervalo de tempo de 6 anos. Apesar da classificação das sequências M15F1 e M15F2 na região RT ter sido idêntica, será fundamental proceder de futuro à sequenciação do genoma completo do vírus, de forma a confirmar os resultados obtidos.

A disponibilidade crescente de anti-retrovíricos de diferentes classes alterou significativamente a composição dos regimes terapêuticos de TAR administrados no tratamento da infecção HIV/SIDA [112,151]. A inibição da replicação vírica e a preservação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> permitiu melhorar o prognóstico da infecção. Porém, os efeitos adversos e a toxicidade dos fármacos são algumas das desvantagens dos regimes terapêuticos mais complexos. O HIV-1 pode manter-se por longos períodos de tempo em reservatórios e a baixa taxa de adesão à terapêutica por parte dos doentes pode conduzir à selecção de variantes resistentes [131,152].

A avaliação da proporção de mutações associadas à resistência aos RTI foi realizada pela distribuição das sequências aminoacídicas “consenso” em grupos específicos com a associação da informação conhecida sobre a evolução de regimes de TAR de prevenção da transmissão do HIV-1 da mãe ao filho ao longo do tempo.

De um modo geral observou-se um incremento na proporção de sequências com mutações de resistência 32,1% para 38,7%, respectivamente, do grupo das sequências obtidas de primeiras amostras (mães que pela primeira vez cumpriram TAR de prevenção da transmissão do HIV-1 ao filho) para o grupo de sequências obtidas de segundas amostras (mães que cumpriram pela segunda vez TAR de prevenção da transmissão do HIV-1 ao filho). Comparativamente, para as sequências associadas ao nascimento do 2º filho foram observadas mais 3 mutações de resistência que no grupo de sequências associadas ao nascimento do 1º filho.

Especificamente, verificou-se um aumento de 21,4% para 29% na proporção de sequências com mutações de resistência aos NRTI e um aumento de 17,9% para 25,8% na proporção de sequências com mutações de resistência aos NNRTI. Os resultados obtidos foram de encontro ao esperado, uma vez que 85,3% das mães tiveram exposições cumulativas a regimes anti-retrovíricos que variam no tempo e que provavelmente conduziram a diferentes pressões selectivas na população de vírus.

No grupo populacional em análise observou-se a existência de casos de prevenção da TMF com administração de regimes de TT ao longo de todo o período de estudo (1999-2008). Porém, verificou-se que os últimos casos de administração de TD de prevenção ocorreram em 2003 e que o regime HAART como prevenção foi iniciado em 2005. Assim, ainda no enquadramento da discussão de resultados até agora apresentados, seria de esperar que nos grupos de sequências analisadas derivadas de amostras maternas colhidas antes e depois do ano de 2003 se observasse uma modificação do padrão e da proporção de mutações de resistência aos RTI, pela introdução da administração de regimes terapêuticos HAART, considerados mais eficazes na prevenção da TMF do HIV-1. No entanto, foi observado um aumento na proporção de sequências com mutações de resistência aos RTI de 34,6% para 36,4% nos grupos analisados. Relativamente as mutações associadas especificamente aos NRTI observou-se um aumento de 19,2% para 30,3%, nas mutações associadas aos NNRTI verificou-se uma ligeira redução na proporção de mutações, respectivamente, de 23,1% para 21,2%. Foi observada maior diversidade de mutações no grupo de sequências derivadas de amostras colhidas depois de 2003. No entanto, há que salientar que a maioria das mães pertencentes ao grupo de amostras colhidas depois de 2003 e que cumpriram TT ou HAART como prevenção da TMF, já tinha cumprido outros regimes de TAR a quando da primeira gravidez, o que poderá ter influenciado os resultados obtidos no presente estudo quanto à proporção de mutações de resistência aos RTI encontrada. Na verdade, apenas 17,6% das sequências incluídas no grupo designado de “depois de 2003” são derivadas de primeiras amostras, correspondem a mães que apenas cumpriram um único regime de TAR para a prevenção da transmissão do HIV-1 ao filho.

Apesar da diferente amostragem entre os grupos analisados observou-se uma redução na proporção de sequências com mutações associadas à resistência aos RTI de 35,8% para 33,3% na análise comparativa entre o grupo de sequências de mães que cumpriram TAR de prevenção (n=53) com o grupo de sequências de mães que não cumpriram qualquer medida de prevenção (n=6). No entanto, no grupo de mães que não cumpriram TAR, foram encontradas as mutações T215Y e K219Q associadas à resistência à zidovudina e à stavudina, e a mutação V179D associada à redução da eficácia da etravirina.

Actualmente, ainda não é conhecido o efeito da administração de anti-retrovíricos a mulheres infectadas com vírus resistentes, bem como quais as consequências de mutações associadas à resistência aos anti-retrovíricos na transmissão vertical do HIV-1. Esta é uma área emergente, para a qual existe informação limitada e contraditória [84]. Assim, se por um lado em alguns estudos não foi observada qualquer associação entre a presença de mutações de resistência e a transmissão do HIV-1 ao filho, por outro lado, outros estudos mostraram um efeito estatisticamente significativo na transmissão vertical de vírus resistentes, da mãe infectada ao seu filho [153-155]. No presente estudo, para o grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR e em que ocorreu a transmissão do HIV-1 ao filho (M16F1 e M18F1) não foi encontrada nenhuma mutação associada à resistência aos RTI. Contrariamente, no grupo de sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR e não transmitiram o vírus ao filho, em 50% das sequências foram encontradas mutações de resistência aos RTI, nomeadamente as mutações V179D, T215Y ou K219Q. Contudo, salienta-se que ambos os grupos foram constituídos por um reduzido número de casos analisados, o que limita a possibilidade de esclarecer este assunto.

Adicionalmente, os resultados obtidos da análise comparativa entre grupos de sequências obtidas de mães que cumpriram diferentes regimes de TAR também devem ser interpretados com cuidado. De facto, o reduzido número de sequências incluídas nos grupos TD e HAART, pode gerar algum viés nos resultados. Com excepção do grupo HAART, constatou-se que ao longo do tempo, a proporção de sequências com mutações associadas à resistência aos RTI aumentou. Para o grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram TD observou-se que 20% apresentavam mutações de resistência, sendo que esta proporção aumentou para 41% no grupo de sequências de mães que cumpriram

TT. Uma proporção menor, mas ainda significativa, de mutações de resistência aos RTI de 22,2% foi obtida no grupo de sequências correspondente a mães que cumpriram HAART.

No grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram TD (n=5), constituído por sequências derivadas de primeiras amostras, apenas a sequência M15F1 apresentou a mutação K219Q, associada à resistência à zidovudina e à stavudina. Porém, a segunda sequência da mesma mãe (M15F2), associada ao cumprimento de HAART, não apresentou qualquer mutação de resistência aos RTI. Este resultado poderá sugerir uma maior eficácia da terapia HAART na supressão de populações víricas.

Desde 1997, que em Portugal, foram implementados os primeiros protocolos para a prevenção da TMF do HIV-1 [76,78]. De regimes terapêuticos simples, com administração apenas da zidovudina (monoterapia), passou a implementar-se ao longo do tempo regimes terapêuticos mais complexos (TD, TT, e actualmente a HAART), sempre com o objectivo de alcançar a completa supressão da replicação vírica, a restauração do sistema imunitário e a redução da prevalência de mutações de resistência [156]. Vários estudos vêm demonstrar que a resistência aos anti-retrovíricos tem vindo a decrescer de forma significativa [17,158,159]. Esta descida, associada à implementação de regimes terapêuticos mais complexos e de elevada eficácia (HAART), veio inverter a tendência observada em anos anteriores, em que eram administrados regimes terapêuticos de fraca potência [160].

No grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram TT (n=39), cerca de metade correspondiam a primeiras amostras. Para os NRTI verificou-se um aumento de 21,1% para 30% na proporção de sequências com mutações de resistência. Quanto às mutações especificamente associadas aos NNRTI, para além do aumento na proporção de sequências com mutações de resistência de 26,3% para 30%, constatou-se também uma maior diversidade de mutações no grupo de sequências derivadas de segundas amostras. No grupo de sequências obtidas de mães que cumpriram HAART (n=9), observou-se uma proporção de 22,2% sequências com pelo menos uma mutação associada à resistência aos NRTI e apenas a sequência M2F2 apresentava a mutação V106I, associada à redução da eficácia dos NNRTI. Assim, no presente estudo, contrariamente ao esperado, uma considerável proporção de sequências obtidas de mães que cumpriram HAART apresentou mutações de resistência aos RTI. No entanto, tal

como já foi referido anteriormente, não se pode descartar o facto de as sequências do grupo HAART derivarem de segundas amostras, ou seja, corresponderem a mães que já tinham sido sujeitas a outros regimes de TAR no passado, nomeadamente regimes de TD e de TT durante a primeira gravidez. Deste modo, os resultados obtidos podem não representar a realidade, uma vez que para avaliar a eficácia da terapia HAART quanto à prevalência de mutações de resistência, deveriam ser estudados casos de mães que só cumpriram este tipo de regime terapêutico. Porém, no presente estudo não foram incluídos casos de mães que fizeram a prevenção nestas condições.

No cômputo geral constatou-se uma maior prevalência de mutações associadas aos NRTI, nomeadamente à zidovudina, o que é expectável dado ser o anti-retrovírico padrão incluído nos regimes de TAR há mais tempo. Foram identificadas as mutações M184V (nas sequências M2F1 e M25F2) e L74V (na sequência M27F2), associadas a elevados níveis de resistência aos NRTI (lamivudina, emtricitabina e didanosina). De salientar que esta classe de anti-retrovíricos apresenta uma elevada barreira genética sendo necessária a acumulação sucessiva de mutações para o desenvolvimento de resistência [113,125]. Adicionalmente, a identificação das mutações K103N (nas sequências M11F2, M23F2 e M25F2), Y181C (na sequência M21F2) e Y188L (na sequência M26F1), foram associadas a elevados níveis de resistência aos NNRTI (nevirapina e efavirenz). Ao contrário dos NRTI, esta classe de anti-retrovíricos apresenta uma baixa barreira genética, uma vez que apenas uma ou duas mutações podem conferir um perfil fenotípico de resistência [129,130]. No presente estudo associou-se como factor causal da selecção de mutantes víricos a administração de anti-retrovíricos, dado que, de uma forma geral, as mutações identificadas nas sequências em estudo estão de acordo com os fármacos utilizados nos regimes de TAR de prevenção da transmissão do HIV-1 ao filho, utilizados pelas mães durante a gravidez.

Verificou-se ainda, para sequências derivadas da mesma mãe, que a M2F1 (1ª amostra; TT) e a M2F2 (2ª amostra; HAART) apresentaram, respectivamente, um decréscimo de 4 (M41L, V106I, M184V e L210W) para 3 (M41L, V106I e L210W) mutações de resistência distintas. De facto, a resistência do HIV-1 aos anti-retrovíricos é o resultado da elevada taxa de replicação e mutação deste vírus. Esta taxa de mutação permite a acumulação de variação na população de vírus [56]. A mudança do regime terapêutico conduz a alterações ambientais selectivas levando a que a estirpe com maior

capacidade de replicação nas novas condições seja capaz de emergir e tornar-se dominante [114].

Foi ainda realizada a pesquisa de polimorfismos naturais da região RT nas 59 sequências aminoacídicas “consenso” obtidas. O significado biológico e a relevância clínica dos polimorfismos naturais são assuntos ainda controversos. Apesar do seu impacto ser praticamente nulo no desenvolvimento de perfis de resistência fenotípica à TAR, a presença de polimorfismos naturais pode, por um lado, aumentar a capacidade replicativa do vírus, e por outro lado, contribuir na evolução para um potencial perfil fenotípico resistente, em resposta à pressão selectiva imposta pelos anti-retrovíricos [113,162,163].

Os resultados obtidos neste trabalho estão em acordo com dados descritos na literatura [137,163-165], onde foi observada maior frequência de polimorfismos naturais em sequências de subtipos não-B.

## **6. CONCLUSÕES**

## 6. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento do presente estudo que incluiu a análise de 68 amostras maternas colhidas na altura pós-parto entre 1999 e 2008, e que foram obtidas de uma população de 34 mães multíparas infectadas por HIV-1, cuja maioria cumpriu regimes de TAR de prevenção da transmissão do vírus ao filho, observou-se:

- Uma média de idade materna de 26,9 anos (primeiro filho) e um tempo médio de 4,2 anos para o nascimento do segundo filho;
- Associação da naturalidade africana a 32,4% das mães incluídas no estudo;
- Aumento de 85,3% para 94,1% na proporção de casos de cumprimento de TAR de prevenção entre a primeira e a segunda gravidez;
- Existência de dois casos de mães que conhecendo o seu estado de infecção HIV-1 não cumpriram TAR de prevenção da transmissão do vírus ao filho;
- Dois casos de transmissão vertical do HIV-1 diagnosticados no grupo estudado ocorreram na ausência de medidas de prevenção;
- Evolução na complexidade dos regimes de TAR de prevenção da transmissão HIV-1 da mãe ao filho ao longo do período de estudo;
- O tipo de regime de TAR mais frequentemente administrado entre 1999 a 2008 foi a TT (66,2%), sendo que os últimos casos de prevenção realizada por TD ocorreram em 2003 e os primeiros casos a iniciarem prevenção por HAART em 2005;
- Uma sensibilidade de 97% para amplificação da RT do gene *pol* do HIV-1 e um sucesso de 89,4% para a sequenciação da região alvo;
- Uma elevada diversidade genética do HIV-1 no grupo estudado, com 41,2% de casos classificados de subtipo G, 29,4% de casos de subtipo B e 14,7% de casos de subtipo C;
- A identificação de casos classificados de subtipos A e D, forma recombinada do tipo CRF02\_AG e uma potencial forma recombinada CRF14\_BG/CRF02\_AG;
- Incremento na proporção de mutações associadas à resistência aos RTI a partir do grupo de sequências TD para o grupo de sequências TT;

- Ausência de mutações de resistência aos RTI no grupo de mães que não cumpriram TAR de prevenção e que transmitiram o vírus ao filho;
- Presença de mutações associadas à resistência aos RTI (T215Y, K219I e V179D) em sequências obtidas de mães que não cumpriram TAR e não transmitiram o vírus ao filho;
- Maior prevalência de mutações associadas aos NRTI, em particular à zidovudina;
- A identificação das mutações M184V e L74V associadas a elevados níveis de resistência aos NRTI (lamivudina, emtricitabina e didanosina);
- A identificação das mutações K103N, Y181C e Y188L associadas a elevados níveis de resistência aos NNRTI (nevirapina e efavirenz);
- Maior frequência de polimorfismos naturais identificados em sequências de subtipos não-B.

Num futuro próximo seria importante realizar uma análise molecular alargada a outras regiões genómicas do HIV-1 neste grupo de amostras, em particular, para o caso classificado como potencial forma recombinada CRF14\_BG/CRF02\_AG. O estudo de um maior número de amostras clínicas, obtidas neste tipo de população presentemente estudada, também pode ser o caminho futuro para melhor avaliar *in vivo* a presença de mutações de resistência, bem como determinar a possível influência do subtipo vírico na emergência de mutações de resistência aos anti-retrovíricos. Estudos de casos de mães múltiplas que cumpriram apenas regimes de terapia HAART podem ser essenciais para melhor compreender a sua eficácia como medida preventiva da transmissão mãe-filho.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] – Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, *et al.* 2000. Principles of Virology – Molecular Biology, Pathogenesis and Control of Animal Diseases. 2<sup>nd</sup> Ed. ASM Press. Washington DC pp 623-50.
- [2] – Siliciano RF (ed.). 2006. Acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Wiley J. Encyclopedia of Life Sciences. (disponível em <http://www3.interscience.wiley.com>).
- [3] – Barré-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, *et al.* 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovírus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
- [4] – Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, *et al.* 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**: 343–346.
- [5] – International Committee on Taxonomy of Viruses (disponível em <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> - acedido a 15/07/2013).
- [6] - Requejo HI. 2006. Worldwide molecular epidemiology of HIV. *Rev. de Saúde Pública* **40**:331-345.
- [7] - Stebbing J and Moyle G. 2003. The clades of HIV: their origins and clinical significance. *AIDS Rev* **5**:205-213.
- [8] – Turner BG, Summers MF. 1999. Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**:32.
- [9] – Freed EO, Martin MA. 2007. HIVs and their replication, p.2107-2185. In Knipe DM, Howley PM (ed.), Fields Virology, 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins and Wolters Kluwer Health, Philadelphia, U.S.A.
- [10] – Pereira JM, Tavares L. 2002. Retrovírus. In Ferreira WFC, Sousa JCF (eds) *Microbiologia* Volume 3, Edições Lidel, Lisboa, pp.275-314.
- [11] – Freed EO. 2001. HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* **26**:13-33.
- [12] – Hutchinson JF. 2001. Biology and Evolution of HIV. *Annu. Rev. Anthropol.* **30**:85-108.
- [13] – Carrasco L, Almendral del Rio JM. 2006. Retroviridae, p. 281-305. Hélice, Madrid, Espanha.
- [14] – Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* **34**:233-244.
- [15] – Farnet CM, Haseltine WA. 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J. Virol.* **65**:1910-1915.
- [16] – Levy JA. 1993. Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Microbiological Reviews* **57**:183–289.
- [17] – Markovitz DM, Hannibal M, Perez VL, *et al.* 1990. Differential regulation of human immunodeficiency viruses (HIVs): A specific regulatory element in HIV-2 responds to stimulation of the T-cell antigen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**:9098–9102.
- [18] – Foley B, Leitner T, Apetrei C, *et al.* 2013. HIV Sequence Compendium 2013 (disponível em <http://www.hiv.lanl.gov/>).
- [19] – Moore JP, Doms RW. 2003. The entry of entry inhibitors: A fusion of Science and medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:10598-10602.
- [20] – Berger EA, Murphy PM, Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:657-700.
- [21] – Azevedo-Pereira JM. Ciclo biológico de VIH. In: (F Antunes, ed). 2011. Manual sobre SIDA (4<sup>a</sup> ed). Permanyer Portugal, Lisboa pp. 13-26.
- [22] – Levy JA. 1998. HIV and Pathogenesis of AIDS, 3rd Ed. ASM Press, Washington, DC.
- [23] – Bieniasz PD. 2009. The Cell Biology of HIV-1 Virion Genesis. *Cell Host & Microbe* Vol. 5, 550-558.
- [24] – Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, *et al.* 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science.* **288**:55-56.
- [25] – Mccutchan FE. 2006. Global Epidemiology of HIV. *Journal of Medical Virology* **78**:7–12.
- [26] – Simon F, Maucière P, Roques P, *et al.* 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature medicine* **4**:1032–1037.
- [27] – Plantier JC, Leoz M, Dickerson JE, *et al.* 2009. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nature medicine* **15**:871–872.

- [28] – Taylor BS, Sobieszczyk ME, McCutchan FE, *et al.* 2009. The Challenge of HIV-1 Subtype Diversity. *The New England Journal of Medicine* **358**:1590–1602.
- [29] – Korber B, Muldoon M, Theiler J, *et al.* 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**:1789-1796.
- [30] – Sharp P, Bailes ME, Chaudhuri RR, *et al.* 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**:867-876.
- [31] – Geretti AM. 2006. HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:1-7.
- [32] – Meadows DC, Gervay-Hague J. 2006. Current developments in HIV chemotherapy. *Chem. Med. Chem.* **1**:16-29.
- [33] – Thomson MM, Pérez-Álvarez L, Nájera R. 2002. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet* **2**:461-471.
- [34] – Takebe Y, Kusagawa S, Motomura K. 2004. Molecular epidemiology of HIV: trackings AIDS pandemic. *Pediatr. Int.* **46**:236-244.
- [35] – Peeters M, Gueye A, Mboup S, *et al.* 1997. Geographical distribution of HIV-1 group O viruses in Africa. *AIDS* **4**:493-498.
- [36] – Ayouba A, Souquières S, Njinku B, *et al.* 2000. HIV-1 group N among HIV-1 seropositive individuals in Cameroon. *AIDS* **14**:2623-2625.
- [37] – Kandathil J, Ramalingam S, Kannangai R, *et al.* 2005. Molecular epidemiology of HIV. *Indian J. Med. Res.* **121**:333-344
- [38] – Buonaguro L, Tornesello ML, Buonaguro FM. 2007. Human immunodeficiency virus type 1 subtype distribution in the worldwide epidemic: pathogenic and therapeutic implications. *J. Virol.* **81**:10209-10219.
- [39] – Fang G, Weiser B, Kuiken C, *et al.* 2004. Recombination following superinfection by HIV-1. *AIDS* **18**:153-159.
- [40] – Thomson MM, Nájera R. 2005. Molecular epidemiology of HIV-1 variants in the global Aids pandemic: an update. *AIDS Reviews* **7**:210-224.
- [41] – Gerhardt M, Mloka D, Tovanabutra S, *et al.* 2005. In-depth, longitudinal analysis of viral quasispecies from an individual triply infected with late-stage human immunodeficiency virus type 1, using a multiple PCR primer approach. *J Virol* **79**:8249-8261.
- [42] – Arien KK, Vanham G, Arts EJ. 2007. Is HIV-1 evolving to a less virulent form in humans? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:141-51.
- [43] – Wainberg MA, Brenner BG. 2010. Role of HIV subtype diversity in the development of resistance to antiviral drugs. *Viruses* **2**:2493-508.
- [44] – Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. 2005. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J. Med. Res.* **121**:287-314.
- [45] – Paraskevis D, Pybus O, Magiorkinis G, *et al.* 2009. Tracing the HIV-1 subtype B mobility in Europe: a phylogeographic approach. *Retrovirology* **6**:49.
- [46] – Spira S, Wainberg MA, Loemba H, *et al.* 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:229-240.
- [47] – Butler I, Pandrea I, Marx PA, *et al.* 2007. HIV Genetic diversity: biological and public health consequences. *Curr. HIV Res.* **5**:23-45.
- [48] – Bártolo I, Rocha C, Bartolomeu J, *et al.* 2009. Highly divergent subtypes and new recombinant forms prevail in the HIV/AIDS epidemic in Angola: New insights into the origins of the AIDS pandemic. *Infect. Genet. Evol.* **9**:672-682.
- [49] – Esteves A, Parreira R, Venenno T, *et al.* 2002. Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes AIDS. *Res. Hum. Retroviruses* **18**:313-325.
- [50] – Antunes R, Figueiredo S, Bartolo I, *et al.* 2003. Evaluation of the clinical sensitivities of three viral load assays with plasma samples from a pediatric population predominantly infected with human immunodeficiency virus type 1 subtype G and BG recombinant forms. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3361-7.

- [51] – Esteves A, Parreira R, Piedade J, *et al.* 2003. Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gag recombinant strains among injecting drugs users in Lisbon, Portugal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **19**:511-517.
- [52] – Palma AC, Araújo F, Duque V, *et al.* 2007. Molecular epidemiology and prevalence drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect. Genet. Evol.* **7**:391-398.
- [53] – Duque V, Holguín A, Silvestre M, *et al.* 2003. Human immunodeficiency virus type 1 recombinant B/G subtypes circulating in Coimbra, Portugal. *Clin. Microbiol. Infect.* **9**:422-425.
- [54] – Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, *et al.* 1995. Rapid Turnover of Plasma Virions and CD4 Lymphocytes in HIV-1 Infection. *Nature* vol. 373.
- [55] – Rambaut A, Posada D, Grandall KA, *et al.* 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat. Rev. Genet.* **5**:52-61.
- [56] – Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, *et al.* 1996. HIV-1 dynamics *in vivo*: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**:1582-1586.
- [57] – Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**:1169-1171.
- [58] – Makeyev EV, Bamford DH. 2003. Evolutionary potential of an RNA virus. *J. Virol.* **78**:2114-2120.
- [59] – Michael NL. 1999. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* **11**:466-474.
- [60] – Peeters M, Sharp P. 2000. The genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* **14** Suppl **3**:S129-40.
- [61] – Goodrich DW, Duesberg PH. 1990. Retroviral recombination during reverse transcription. *Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2050-6.
- [62] – Paixão MT, Pádua E. Transmissão da infecção por HIV. In: (F Antunes, ed). 2011. Manual sobre SIDA (4ª ed). Permanyer Portugal, Lisboa pp. 105-113.
- [63] – Mathers B, Degenhardt ML, Phillips B, *et al.* 2008. Global epidemiology of injecting drug use and HIV among people who inject drugs: a systematic review. *Lancet* **372**:1733-1745.
- [64] – Wiessing L, Van de Laar MJ, Donoghoe MC, *et al.* 2008. HIV among injecting drugs users in Europe increasing trends in the East. Euro Surveil (disponível em <http://www.eurosurveillance.org/>).
- [65] – Gir E, Canini RMS, Prado MA, *et al.* 2004. A Feminização da AIDS: Conhecimento de mulheres soropositivas sobre a transmissão e prevenção do HIV-1. *DST – J bras. Doenças Sex. Transm.* **16**:73-76.
- [66] – Ammann AJ, Cowan M J, Wara DW, *et al.* 1983. Acquired immunodeficiency in an infant: possible transmission by means of blood products. *Lancet* **956-958**.
- [67] – Kourtis AP, Duerr A. 2003. Prevention of perinatal HIV transmission: a review of novel strategies. *Expert Opin. Investig. Drugs* **12**:1535-44.
- [68] – UNAIDS Technical Update mother-to-child transmission of HIV; September 2000.
- [69] – UNAIDS. 2012 Report on the global AIDSS epidemic. 2012. (Disponível em [http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120\\_globalreport2012/globalreport/](http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/20121120_globalreport2012/globalreport/))
- [70] – WHO. Breastfeeding and replacement feeding practices in the context of mother-to-child transmission of HIV. Maio 2012.
- [71] – Thorne C, Newell ML. 2007. HIV. *Seminars Fetal & Neonatal Med.* **12**:174-81.
- [72] – Newell ML. 1998. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS* **12**:831-837.
- [73] – Rouzious C, Costagliola D, Burgard M, *et al.* 1995. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Am J Epidemiol.* **142**:1330-1337.
- [74] – Bertolli J, St Louis ME, Simonds RJ, *et al.* 1996. Estimating the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus in a breastfeeding cohort in Kinshasa, Zaire. *J. Infect. Dis.* **174**:722-726.

- [75] – Kalish LA, Pitt J, Lew J, *et al.* 1997. Defining the time of fetal or perinatal acquisition of human immunodeficiency virus type 1 infection on the basis of age at first positive culture. Women and Infants Transmission Study (WITS). *J. Infect. Dis.* **175**:712-715.
- [76] – DDI, URVE. Infecção VIH/SIDA – A situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2012. URVE 2013; Doc 144.
- [77] – Pádua E, Miguel R, Almeida C, *et al.* 2003. Evolução da transmissão vertical do VIH (1999-2002): protocolo de estudo do Laboratório de Referência da SIDA. *Rev. Port. Doenç. Inf.* **2**:22.
- [78] – Pádua E, Almeida C, Nunes B, *et al.* 2009. Assessment of mother-to-child HIV-1 and HIV-2 transmission: an AIDS reference laboratory collaborative study. *HIV Med.* **10**:182-190.
- [79] – Sison AV, Campos JM. 1992. Laboratory methods for early detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Newborns and Infants. *Clinical Microbiology Reviews* **5**:238-247.
- [80] – Panel on Treatment of HIV-Infected Pregnant Women and Prevention of Perinatal Transmission. Recommendations for Use of Antiretroviral Drugs in Pregnant HIV-1-Infected Women for Maternal Health and Interventions to Reduce Perinatal HIV Transmission in the United States. 31 Julho 2012. p. 1-214. (Disponível em <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/perinatalgl.pdf>)
- [81] – Surjushe A, Maniar J. 2008. Prevention of mother-to-child transmission. *Indian J, Dermatol. Venereol. Leprol.* **74**:200-207.
- [82] – Taylor GP, Hermione-Lyall EG, Mercey D, *et al.* 1999. British HIV association guidelines for prescribing antiretroviral therapy in pregnancy. *Sex. Transm. Inf.* **75**:90-97.
- [83] – European Collaborative Study. HIV-infected pregnant women and vertical transmission in Europe since 1986. *AIDS* **15**:761-770.
- [84] – Nolan M, Glenn M, Mofenson LM. 2002. Antiretroviral prophylaxis of perinatal HIV-1 transmission and the potential impact of antiretroviral resistance. *J. AIDS* **30**:216-229.
- [85] – Connor EM, Sperlings RS, Gelber R, *et al.* 1994. Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N. Engl. J. Med.* **331**:1173-1180.
- [86] – Mofenson LM. 2002. U.S. Public Health Service task force recommendations for use of antiretroviral drugs in pregnant HIV-1 infected women for maternal health and interventions to reduce perinatal HIV-1 transmission in United States. *Morbidity Mortality Weekly Rep.* **22**:1-38.
- [87] – Coordenação Nacional para a Infecção VIH/SIDA. 2007. Recomendações Portuguesas para o tratamento da infecção VIH/SIDA. ISBN.
- [88] – Vandergraaff N, Engelman A. 2007. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Rev. Mol. Med.* **9**:1-19.
- [89] – Thompson MA, Aberg JA, Cahn P, *et al.* 2012. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2012 recommendations of the International AIDS Society – USA panel. *JAMA* Vol **308**:387-402.
- [90] – Tamesgen Z, Warnke D, Kasten MJ. 2006. Current status of antiretroviral therapy. *Expert Opin. Pharmacother.* **7**:1541-1554.
- [91] – Clavel F, Hance AJ. 2004. HIV Drug Resistance. *N. Engl. J. Med.* **350**:1023-1035.
- [92] – De Clercq E. 2008. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**:307-320.
- [93] – Menendez-Arias L. 2009. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Res.* **85**:210-231.
- [94] – Doroana M. Análogos não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa. In: (F Antunes, ed). 2011. Manual sobre SIDA (4ª ed). Permanyer Portugal, Lisboa pp. 338-345.
- [95] – Ali A, Bandaranayake R, Cai Y, King, *et al.* 2010. Molecular Basis for Drug Resistance in HIV-1 Protease. *Viruses* **2**:2509-2535.
- [96] – Wensing AMJ, van Maarseveen NM, Nijhuis M. 2010. Fifteen years of HIV Protease Inhibitors: raising the barrier to resistance. *Antiv Research* **85**:59-74.
- [97] – Condra JH, Schleif WA, Blahy OM. 1995. *In vivo* emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature* **374**, 569-571.

- [98] – Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, *et al.* 1987. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. *N. Engl. J. Med.* **317**:185-191.
- [99] – Hoffman C, Rockstroh JK, Kamps BS. 2007. *HIV Medicine 2007* 15<sup>th</sup> ed by Flying Publisher. Paris, Cagliari, Wuppertal. (disponível em: <http://hivmedicine.com/hivmedicine2007.pdf>).
- [100] – HIV Trialists Collaborative Group. 1999. Zidovudine, didanosine and zalcitabine in the treatment of HIV infection: Meta-analyses of the randomised evidence. *Lancet* **353**:2014-2025.
- [101] - Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, *et al.* 1997. Treatment with indinavir, zidovudine and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.* **337**:734-739.
- [102] – Hammer SM, Squires KF, Hughes MD, *et al.* 1997. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N. Engl. J. Med.* **337**:725-733.
- [103] – Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, *et al.* 1998. Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* **351**:543-549.
- [104] – Moyle G, Gatell J, Perno CF, *et al.* 2008. Potential for new antiretrovirals to address unmet needs in the management of HIV-1 infection. *AIDS Patient Care STDS* **22**:459-471.
- [105] – Gordon CP, Griffith R, Keller PA. 2007. Control of HIV through the inhibition of HIV-1 integrase: a medical chemistry perspective. *Med.Chem.* **3**:199-220.
- [106] – De Clercq E. 2009. The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years. *Rev. Med. Virol.* **19**:287-299.
- [107] – Kim HK, Daar ES. 2009. Newer antiretroviral agents and how to use them. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **11**:327-334.
- [108] – World Health Organization. 2006. Anti-retroviral drugs for treating pregnant women and preventing HIV infection in infants in resource-limited settings: towards universal access. Recommendations for a public health approach Geneva: World Health Organization.
- [109] – Chun T, Nickle DC, Justement JS, *et al.* 2005. HIV-infected individuals receiving effective antiviral therapy for extended periods of time continually replenish their viral reservoir. *The Journal of Clinical Investigation* **115**:3250–3255.
- [110] – Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, *et al.* 1999. Persistence of HIV-1 Transcription in Peripheral-blood Mononuclear Cells in Patients Receiving Potent Antiretroviral Therapy. *The New England Journal of Medicine* **340**:1614–1622.
- [111] – Deeks SG. 2003. Treatment of antiretroviral-drug resistant HIV-1 infection. *Lancet* **326**:2002-2011.
- [112] – Havlir DV, Richman DD. 1996. Viral dynamics of HIV: Implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann. Intern. Med.* **124**:984-994.
- [113] – Benzie A, Bertoli A, Boffito M, *et al.* 2006. Antiretroviral Resistance in Clinical Practice. Coordinating ed., A. M. Geretti. Medscript Lda, London.
- [114] – Condra JH, Emini EA. 1997. Preventing HIV-1 drug resistance. *Sci. Med.* **4**:14-23.
- [115] – Bean P, Patnaik M, Graziano FM, *et al.* 2000. Therapeutic drug monitoring of antiretroviral agents. *AM. Clin. Lab.* **19**:20-22.
- [116] – Kuritzkes D. 1999. Clinical implications of antiretroviral resistance. HIV Clinical Management. Medscape Inc.
- [117] – Hanna GJ, Balaguera HU, Freedberg KA, *et al.* 2003. Drug-selected resistance mutations and non-B subtypes in antiretroviral-naïve adults with established human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **188**: 986–991.
- [118] – Tang JW, Pillay D. 2004. Transmission of HIV-1 drug resistance. *J. Clin. Virol.* **30**:1–10.
- [119] – Steegen K, Demecheleer E, De Cabooter N, *et al.* 2006. A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *J. Virol. Methods* **133**:137-145.
- [120] – Johnson VA, Brun-Vezinet F, Clotet B, *et al.* 2010. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: December 2010. *Top HIV Med* **18**:156-163.

- [121] – Nakahara K, Wakasa-Morimoto C, Kobayashi M, *et al.* 2009. Secondary mutations in viruses resistant to HIV-1 integrase inhibitors that restore viral infectivity and replication kinetics. *Antiviral Res* **81**:141-146.
- [122] – Schupbach J. Human Immunodeficiency Viruses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, *et al.* (eds). 2003. *Manual of Microbiology*. 8th ed V2 1235-81. New York: Pergamon.
- [123] – Wilson JW, Bean P. 2000. A Physician's Primer to Antiretroviral Drug Resistance Testing. *The AIDS Reader* **10**:469-78.
- [124] – Larder B, Wang D, Harrigan PR. 2001. Identification of a set of nucleoside associated mutations that are common cause of nucleoside cross resistance. *Antiviral Ther.* **6**:S7.
- [125] – Tang MW and Shafer RW. 2012. HIV-1 Antiretroviral Resistance Scientific Principles and Clinical Applications. *Drugs* **2012** **72**: e1-e2.
- [126] – White KL, Margot NA, Ly JK, *et al.* 2005. A combination of decreased NRTI incorporation and decreased excision determines the resistance profile of HIV-1 K65R RT. *AIDS* **19**:1751-1760.
- [127] – Soriano V, de Mendoza C. 2002. Genetic mechanisms of resistance to NRTI and NNRTI. *HIV Clin. Trials* **3**:237–248.
- [128] – Antinori A, Zaccarelli M, Cingolani A, *et al.* 2002. Cross resistance among nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors limits recycling efavirenz after nevirapine failure. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:835-8.
- [129] – Lecossier D, Shulman NS, Morand-Joubert L, *et al.* 2005. Detection of minority populations of HIV-1 expressing the K103N resistance mutation in patients failing nevirapine. *J Acquir Immune Defic Syndr* **38**: 37-42.
- [130] – Dykes C, Fox K, Loyd A, *et al.* 2001. Impact of clinical reverse transcriptase sequences on the replication capacity of HIV-1 drug-resistant mutants. *Virology* **285**:193-203.
- [131] – Camacho R. Resistência aos anti-retrovíricos. Patogénese, monitorização laboratorial e impacto na clínica do infectado por HIV. In: (F Antunes, ed). 2011. Manual sobre SIDA (4ª ed). Permanyer Portugal, Lisboa pp. 411-424.
- [132] – Wilson JW. 2003. Update on antiretroviral drug resistance testing: Combining laboratory technology with patient care. *AIDS* **13**:25-38.
- [133] – Duque V. 2005. Subtipos Genéticos e Resistência do HIV. Edições Minerva, A. Meliço-Silvestre and JG Saravaiva da Cunha. Coimbra, Portugal.
- [134] – Baccin TG. *Genotipagem do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 no Estado do Rio Grande do Sul: Determinação da frequência dos subtipos e das mutações de resistência aos anti-retrovirais em indivíduos sob falha terapêutica*. 2007. Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- [135] – Stuyver L, Wyseur A, Rambout A, *et al.* 1997. Line probe assay for rapid detection of drug-selected mutations in the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:284-291.
- [136] – Winters B, Vermeiren H, Lecocq P, *et al.* 2004. The Virtual Phenotype™ analysis of an HIV-1 genotype provides an accurate prediction of the virus susceptibility to antiretroviral drugs. 2<sup>nd</sup> European HIV Drug Resistance Workshop 2004, Rome, Italy.
- [137] – Videira e Castro S. 2010. Diversidade genética e resistência aos anti-retrovirais inibidores enzimáticos de vírus da imunodeficiência humana tipo-1 (HIV-1) de uma população de toxicod dependentes por via endovenosa da Grande Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Médica da Universidade Nova de Lisboa.
- [138] – Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**:2731–2739.
- [139] – Saitou N, Masatoshi N. 1987. The Neighbour-Joining method – a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**:406-425.
- [140] – Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**:111-120.

- [141] – Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, *et al.* 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverts in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* **73**:152-160.
- [142] – Sarafinos SG, Marchand B, Das K, *et al.* 2009. Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition. *J. Mol. Biol.* **385**:693-713.
- [143] – Couturier E, Damond F, Roques P, *et al.* 2000. HIV-1 diversity in France, 1996-1998. *AIDS* **14**:289-296.
- [144] – García-Albert L, Ortiz M, García-Saiz A; The Group for Study of Subtype Prevalence In Spain. 2001. HIV type 1 non-B subtype prevalence In Spain, 1997-1998. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**:1317-1320.
- [145] – Thomson MM, Nájera R. 2007. Increasing HIV-1 Genetic Diversity in Europe. *J. Infect Dis.* **196**:1120-1124
- [146] – Delgado E, Thomson MM, Villahermosa ML, *et al.* 2002. Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **29**:536-543.
- [147] – Bártolo I, Borrego P, Abecassis AB, *et al.* 2010. Origem e história epidemiológica da forma recombinante circulatória de VIH-1 CF14\_BG. III Congresso da CPLP VIH/SIDA\*IST, Lisboa (disponível em <http://www.congressohiv-cplp2010.com/apresentacoes.html>).
- [148] – Abecassis AB, Lemey P, Vidal N, *et al.* 2007. Recombination confounds the early evolutionary history of human immunodeficiency virus type 1: subtype G is a circulating recombinant form. *J. Virol.* **81**:8543-8551.
- [149] – Zhang M, Foley B, Schultz AK, *et al.* 2010. The role of recombination in the emergence of a complex and dynamic HIV epidemic. *Retrovirology* **7**:25.
- [150] – Thomson MM, Delgado E, Mnajón N, *et al.* 2001. HIV-1 genetic diversity in Galicia Spain: BG intersubtype recombinant viruses circulating among injecting drug users. *AIDS* **15**:509-516.
- [151] – Lipsky JJ. 1996. Antiretroviral drugs for AIDS. *Lancet* **348**:800-803.
- [152] – Clarke JR, White NC, Weber JN. 2000. HIV compartmentalization: Pathogenesis and clinical implications. *AIDS Reviews* **2**(1).
- [153] – Palumbo P, Holland B, Dobbs T, *et al.* 2001. Antiretroviral Resistance Mutations among Pregnant Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Women and Their Newborns in the United States: Vertical Transmission and Clades. *J. Inf. Dis.* **184**:1120-1126.
- [154] – Welles SL, Pitt J, Colgrove R, *et al.* 2000. HIV-1 genotypic zidovudine drug resistance and the risk of maternal-infant transmission in the women and infants transmission study. The Women and Infants Transmission Study Group. *AIDS* **14**:263-271.
- [155] – Johnson VA, Petropoulos CJ, Woods CR, *et al.* 2001. Vertical transmission of multidrug-resistant HIV-1 and continued evolution of drug resistance in an HIV-1 infected infant. *J. Infect. Dis.* **183**:1688-1693.
- [156] – Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. Department of Health and Human Services (DHHS). (Disponível em <http://www.hivatis.org> - acessado à 19/9/2013).
- [157] – Kagan R, Winters M, Merigan T, *et al.* 2004. HIV type 1 genotypic resistance in a clinical database correlates with antiretroviral utilization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**:1-9.
- [158] – Pillay D, Green H, Matthias R, *et al.* 2005. Estimating HIV-1 drug resistance in antiretroviral-treated individuals in the United Kingdom. *J. Infect. Dis.* **192**:967-973.
- [159] – Di Giambenedetto S, Bracciale L, Colafigli M, *et al.* 2007. Declining prevalence of HIV-1 drug resistance in treatment-failing patients: a clinical cohort study. *Antivir. Ther.* **12**:835-839.
- [160] – Larder B, Hertogs Kl. 2000. Virco Study. *4<sup>th</sup> Workshop on HIV Drug Resistance and Treatment Strategies*. Sitges.
- [161] – Holguín AC, Suñe C, Hamy F, *et al.* 2006. Natural polymorphisms in the protease gene modulate the replicative capacity of non-B HIV-1 variants in the absence of drug pressure. *J. Clin. Virol.* **36**:264-271.

- [162] – Anta L, Blanco JL, Llibre JM, et al. 2013. Resistance to the most recent protease and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors across HIV-1 non-B subtypes. *J Antimicrob Chemother.* **68**:1994-2002.
- [163] – Monno L, Scudeller L, Brindicci G, et al. 2009. Genotypic analysis of the protease and reverse transcriptase of non-B HIV type 1 clinical isolates from naïve and treated subjects. *Antiviral Res.* **83**:118-126.
- [164] – Pérez-Alvarez L, Carmona R, Muñoz M, et al. 2003. High incidence of non-B and recombinant HIV-1 strains in newly diagnosed patients in Galicia, Spain: study of genotypic resistance. *Antivir. Ther.* **8**:355-360.
- [165] – Vergne L, Peeters M, Mpoudi-Ngole E, et al. 2000. Genetic diversity of protease and reverse transcriptase sequences in non-subtype-B human immunodeficiency virus type 1 strains: evidence of many minor drug resistance mutations in treatment-naïve patients. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3919-3925.

## **8. ANEXOS**

## Anexo 1

**Tabela 1** – Dados demográficos, epidemiológicos e clínicos dos 34 casos de mães múltiparas infectadas por HIV-1 analisados.

Naturalidade das mães	Designação	Idade	Ano do parto	TAR (S/N)	Terapia (D/T/H)	Designação	Ano do parto	TAR (S/N)	Terapia (D/T/H)
Portugal	M1F1	34	2003	N	-	M1F2	2005	S	T
Portugal	M2F1	28	2002	S	T	M2F2	2005	S	H
Portugal	M3F1	21	2002	S	T	M3F2	2007	S	T
Angola	M4F1	28	2001	S	T	M4F2	2004	S	T
Portugal	M5F1	28	2002	S	T	M5F2	2003	S	T
Portugal	M6F1	30	2004	S	T	M6F2	2007	S	T
Portugal	M7F1	18	2002	S	T	M7F2	2008	S	T
Portugal	M8F1	21	2002	N	-	M8F2	2005	S	T
Portugal	M9F1	20	2005	S	T	M9F2	2006	S	H
Moçambique	M10F1	31	2005	S	T	M10F2	2008	S	H
Portugal	M11F1	ND	1999	S	T	M11F2	2003	S	T
Portugal	M12F1	31	1999	S	T	M12F2	2005	S	T
Portugal	M13F1	26	2000	S	T	M13F2	2004	S	T
Portugal	M14F1	26	2000	S	D	M14F2	2006	S	H
Angola	M15F1	27	2000	S	D	M15F2	2006	S	H

Portugal	M16F1	26	2001	N	-	M16F2	2005	S	T
Moçambique	M17F1	29	2001	S	T	M17F2	2005	S	T
Portugal	M18F1	19	2001	N	-	M18F2	2006	N	-
Moçambique	M19F1	33	2001	S	D	M19F2	2006	S	H
Angola	M20F1	26	2002	S	T	M20F2	2008	S	H
Angola	M21F1	28	2002	S	T	M21F2	2008	S	T
Portugal	M22F1	32	2002	S	T	M22F2	2006	S	T
Portugal	M23F1	17	2002	S	D	M23F2	2006	S	T
Angola	M24F1	30	2002	S	T	M24F2	2006	S	H
Portugal	M25F1	34	2002	S	D	M25F2	2006	S	T
Portugal	M26F1	19	2002	S	T	M26F2	2007	S	T
Portugal	M27F1	27	2002	S	T	M27F2	2007	S	T
Angola	M28F1	25	2002	S	T	M28F2	2007	S	T
ND	M29F1	ND	2003	N	-	M29F2	2008	N	-
Portugal	M30F1	29	2003	S	D	M30F2	2007	S	T
Portugal	M31F1	31	2003	S	T	M31F2	2007	S	H
Portugal	M32F1	20	2004	S	T	M32F2	2007	S	T
Angola	M33F1	36	2004	S	T	M33F2	2007	S	H
Angola	M34F1	31	2004	S	T	M34F2	2008	S	T

**Legenda:** Sombreado – casos em que ocorreu transmissão do HIV-1 da mãe ao filho; ND- Informação não disponível; S/N – Sim/Não; D/T/H – Dupla, Tripla e HAART.

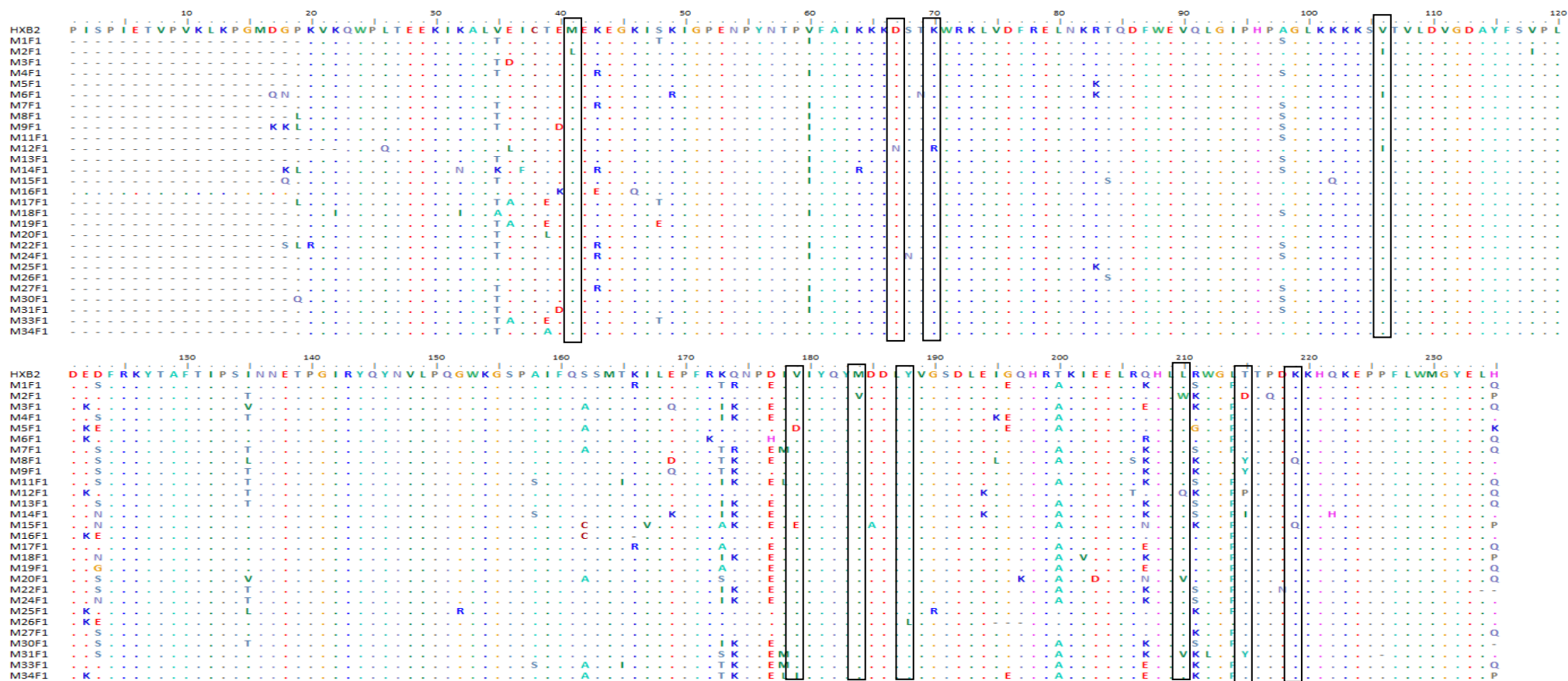
## Anexo 2

**Tabela 1** – Resultados da análise por BLAST. Para cada amostra é apresentada a classificação molecular obtida da análise por BLAST, bem como a sequência presente na base de dados de *Los Alamos de HIV* com maior similaridade à sequência “consenso” construída.

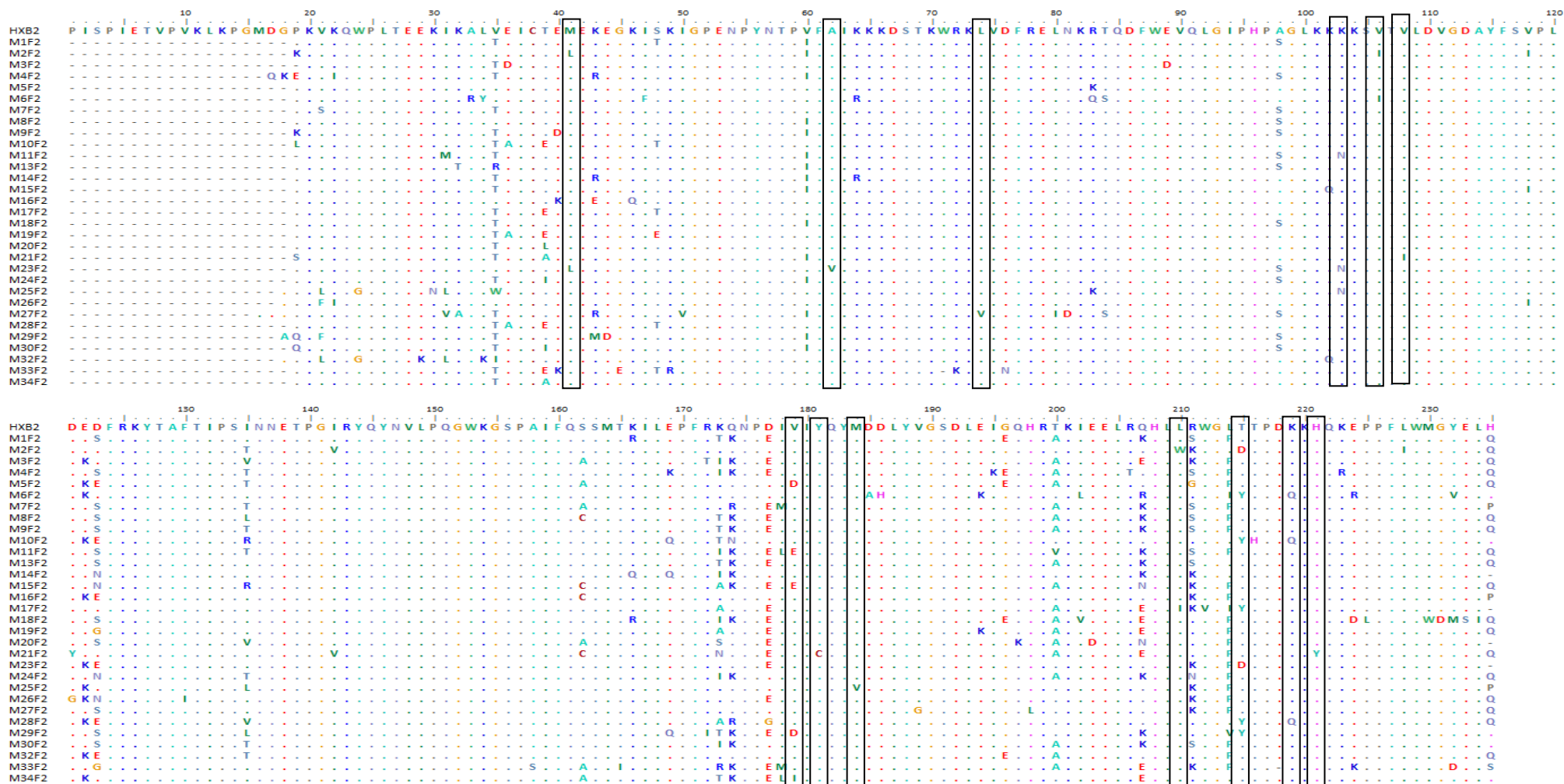
Sequência	Subtipo BLAST	Identidade	Nº de acesso da sequência
M1F1	G	637/647 (98%)	<a href="#">DQ663724</a>
M1F2	G	642/650 (98%)	<a href="#">DQ663724</a>
M2F1	B	631/647 (97%)	<a href="#">AF112906</a>
M2F2	B	628/648 (96%)	<a href="#">AY316023</a>
M3F1	AG	637/650 (98%)	<a href="#">AY901679</a>
M3F2	AG	632/651 (97%)	<a href="#">EU177960</a>
M4F1	G	635/650 (97%)	<a href="#">HQ700006</a>
M4F2	G	631/648 (97%)	<a href="#">AY017457</a>
M5F1	B	636/648 (98%)	<a href="#">EF011576</a>
M5F2	B	636/650 (97%)	<a href="#">EF011576</a>
M6F1	B	633/650 (97%)	<a href="#">JQ395974</a>
M6F2	B	623/652 (95%)	<a href="#">AF541416</a>
M7F1	BG	645/650 (99%)	<a href="#">DQ663759</a>
M7F2	BG	641/650 (98%)	<a href="#">DQ663759</a>
M8F1	BG	625/643 (97%)	<a href="#">DQ103907</a>
M8F2	BG	631/650 (97%)	<a href="#">DQ103907</a>
M9F1	G	636/649 (97%)	<a href="#">GQ399331</a>
M9F2	G	645/648 (99%)	<a href="#">GQ399331</a>
M10F2	C	622/657 (94%)	<a href="#">EF602604</a>
M11F1	BG	640/650 (98%)	<a href="#">DQ103907</a>
M11F2	G	634/648 (97%)	<a href="#">DQ666385</a>
M12F1	B	615/638 (96%)	<a href="#">AF541416</a>
M13F1	G	639/650 (98%)	<a href="#">AY901546</a>
M13F2	G	627/650 (96%)	<a href="#">HQ700146</a>
M14F1	BG	627/648 (96%)	<a href="#">AF423759</a>
M14F2	BG	632/651 (97%)	<a href="#">AF423759</a>
M15F1	G	616/649 (94%)	<a href="#">GQ462408</a>
M15F2	G	623/650 (95%)	<a href="#">FJ491434</a>

M16F1	B	1302/1302 (100%)	<u>DQ663718</u>
M16F2	B	635/649 (97%)	<u>DQ663718</u>
M17F1	C	637/652 (97%)	<u>GQ463376</u>
M17F2	C	629/651 (96%)	<u>JQ617120</u>
M18F1	G	634/649 (97%)	<u>HQ700016</u>
M18F2	G	640/654 (97%)	<u>GQ400013</u>
M19F1	C	635/650 (97%)	<u>GQ463369</u>
M19F2	C	633/650 (97%)	<u>GQ463369</u>
M20F1	A	622/650 (95%)	<u>EU068355</u>
M20F2	A	619/648 (95%)	<u>EU068355</u>
M21F2	D	634/645 (98%)	<u>DQ141206</u>
M22F1	G	631/638 (98%)	<u>GQ400356</u>
M23F2	B	621/650 (95%)	<u>AY032669</u>
M24F1	G	646/653 (98%)	<u>HQ700014</u>
M24F2	G	636/650 (97%)	<u>HQ700014</u>
M25F1	B	634/650 (97%)	<u>DQ666411</u>
M25F2	B	623/650 (95%)	<u>DQ177231</u>
M26F1	B	617/652 (94%)	<u>HM043591</u>
M26F2	B	627/651 (96%)	<u>EF368737</u>
M27F1	B	634/650 (97%)	<u>DQ877874</u>
M27F2	B	618/644 (95%)	<u>DQ877874</u>
M28F2	C	629/649 (96%)	<u>FJ523888</u>
M29F2	BG	621/650 (95%)	<u>DQ103907</u>
M30F1	BG	642/646 (99%)	<u>DQ103907</u>
M30F2	BG	641/648 (98%)	<u>DQ103907</u>
M31F1	BG	633/646 (97%)	<u>DQ103907</u>
M32F2	B	629/648 (97%)	<u>FJ861801</u>
M33F1	C	626/651 (96%)	<u>GU188765</u>
M33F2	C	610/649 (93%)	<u>HE588166</u>
M34F1	AG	622/649 (95%)	<u>EF067291</u>
M34F2	AG	616/652 (94%)	<u>EF067291</u>

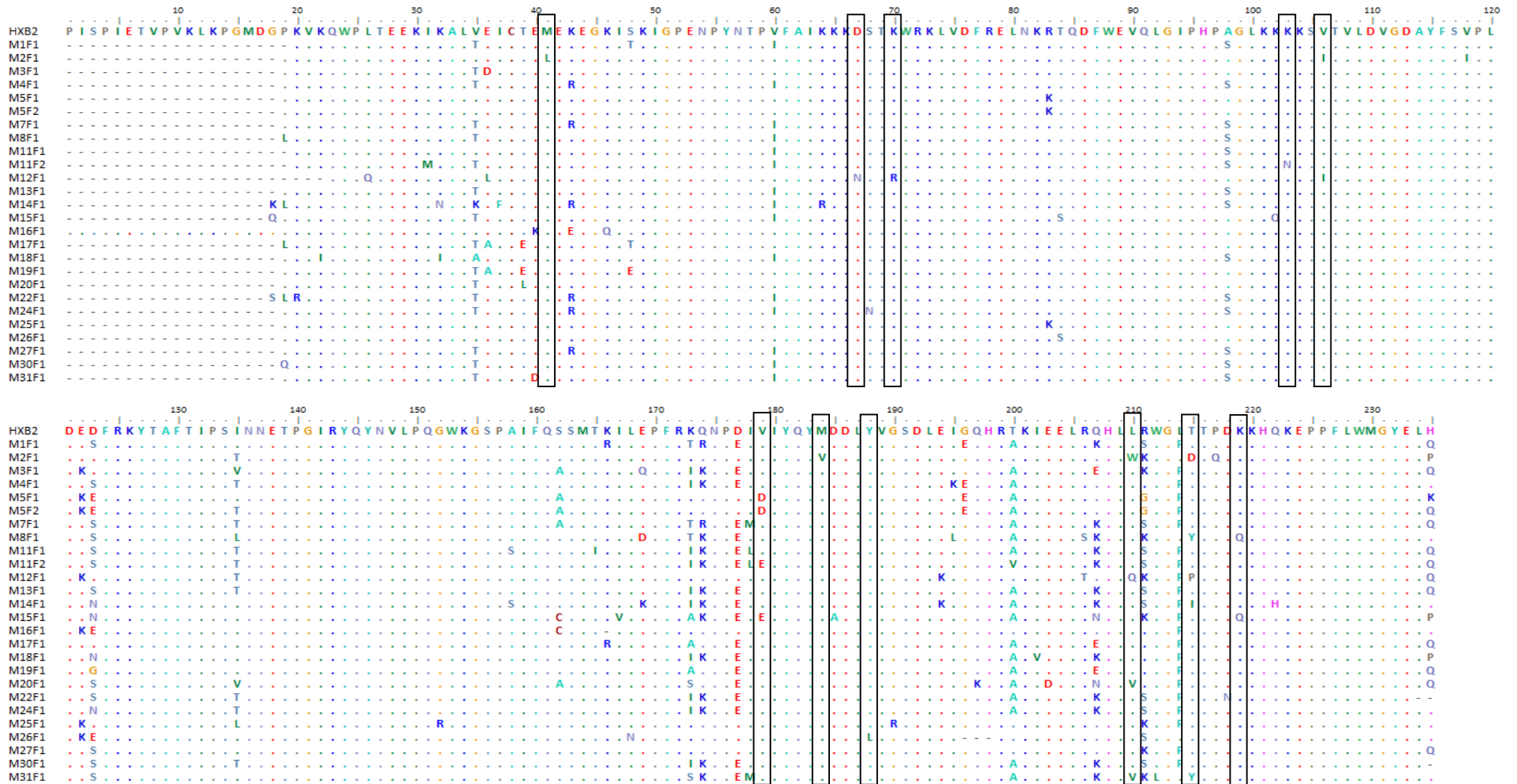
## Anexo 3



**Figura 1** – Alinhamento das 28 seqüências aminoácídicas “consenso” derivadas de primeiras amostras (associadas ao nascimento do 1º filho). As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.

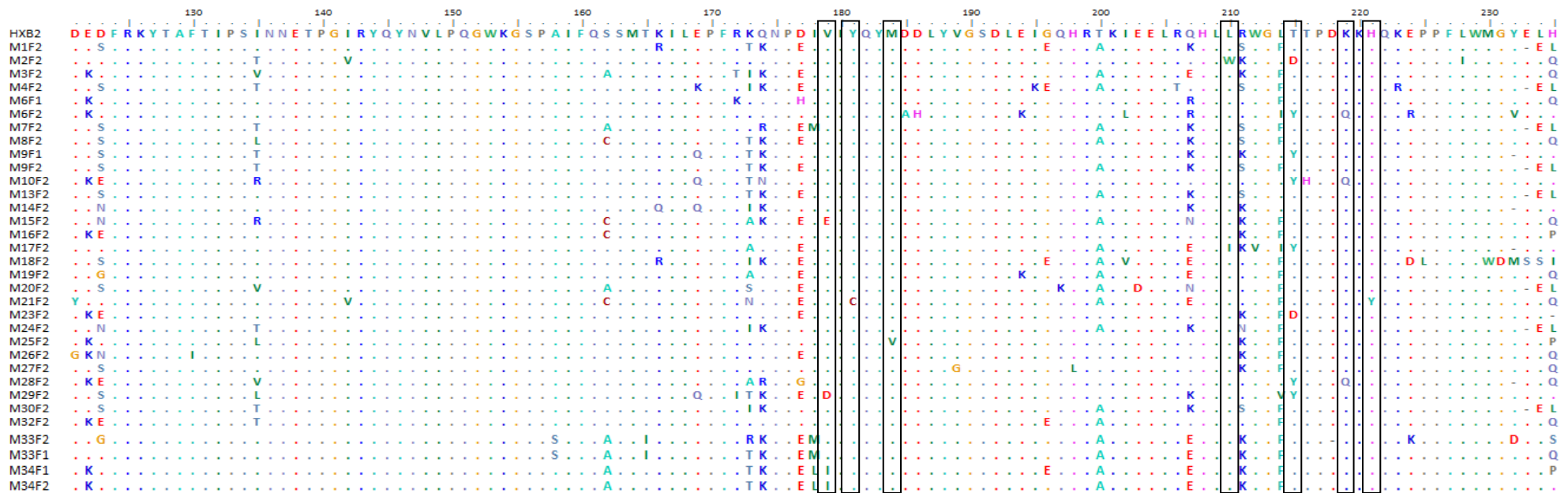


**Figura 2** – Alinhamento das 31 seqüências aminoácidas “consenso” derivadas de segundas amostras (associadas ao nascimento do 2º filho). As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.

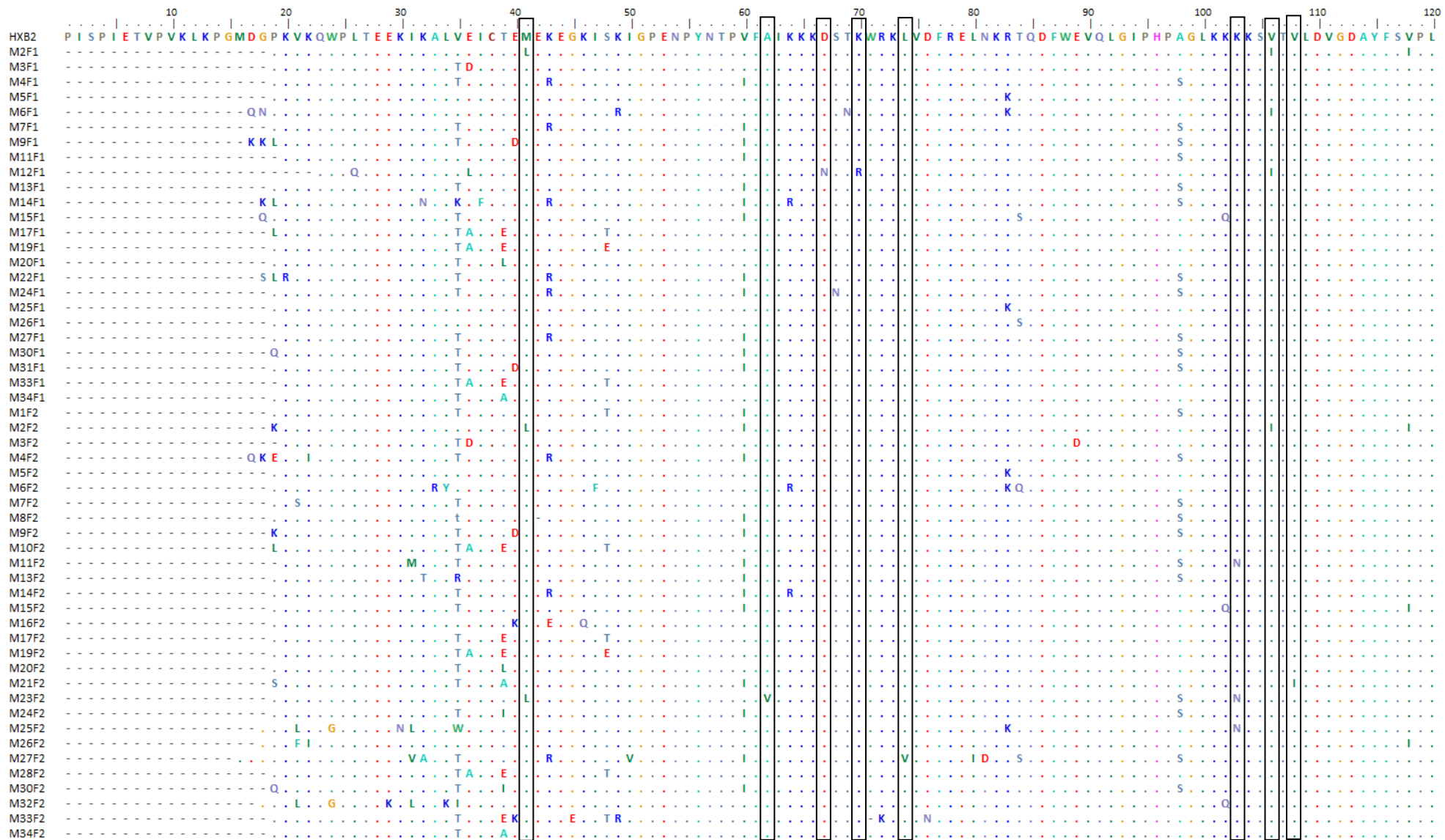


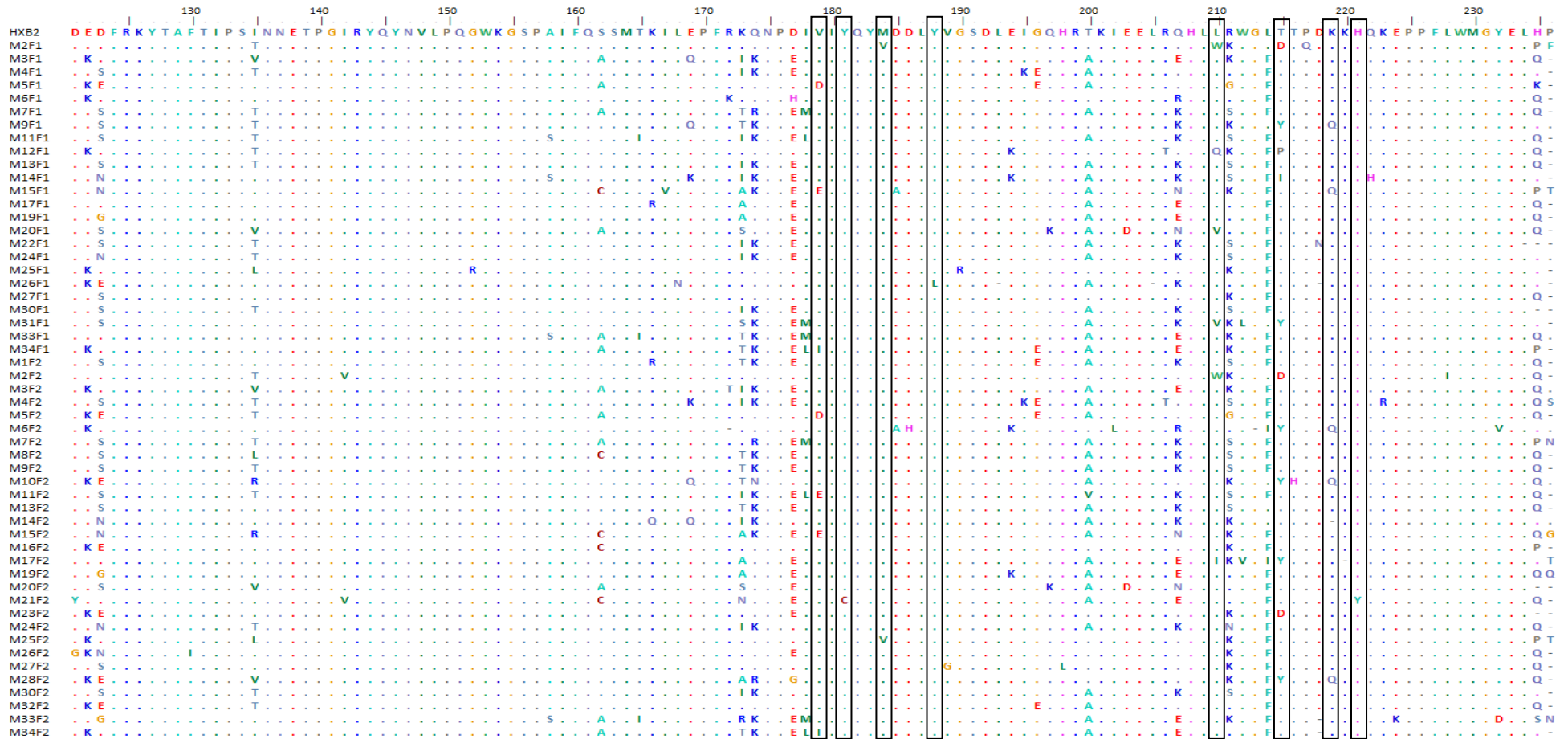
**Figura 3** - Alinhamento das 26 seqüências aminoacídicas “consenso” derivadas de amostras colhidas antes de 2003. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.



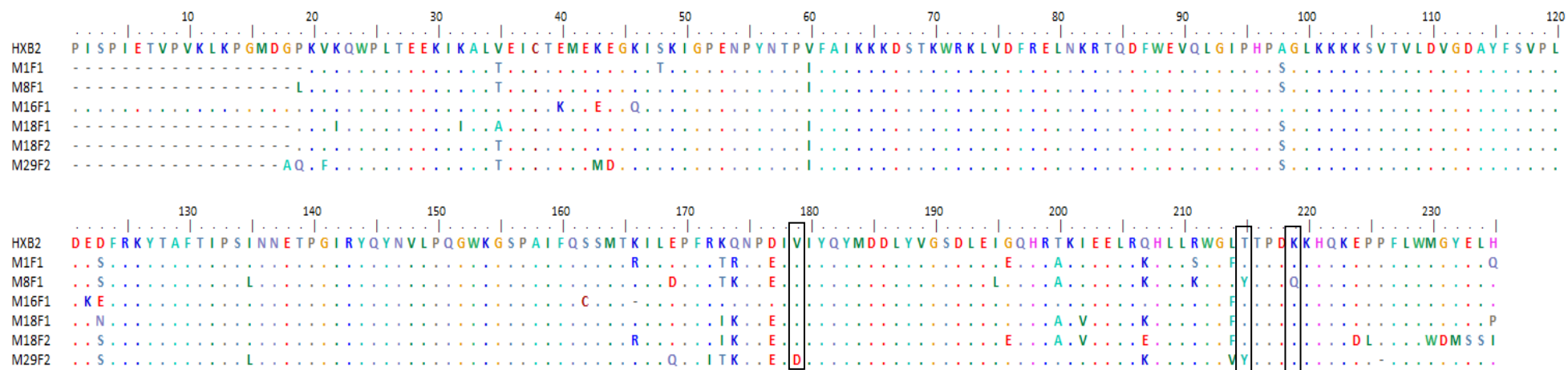


**Figura 4** - Alinhamento das 33 sequências aminoacídicas “consenso” derivadas de amostras colhidas depois de 2003. As sequências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da sequência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As sequências “consenso” em estudo foram comparadas com a sequência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as sequências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.





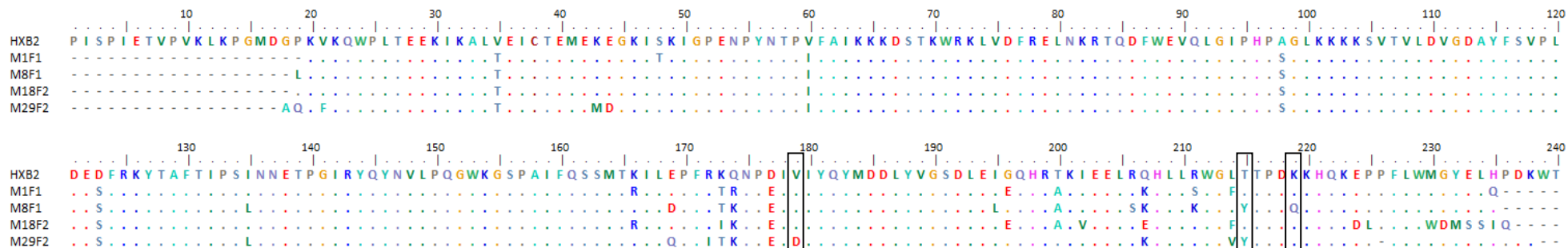
**Figura 5** - Alinhamento das 53 seqüências aminoácidas “consenso” correspondentes a mães que cumpriram TAR de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 durante a gravidez. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.



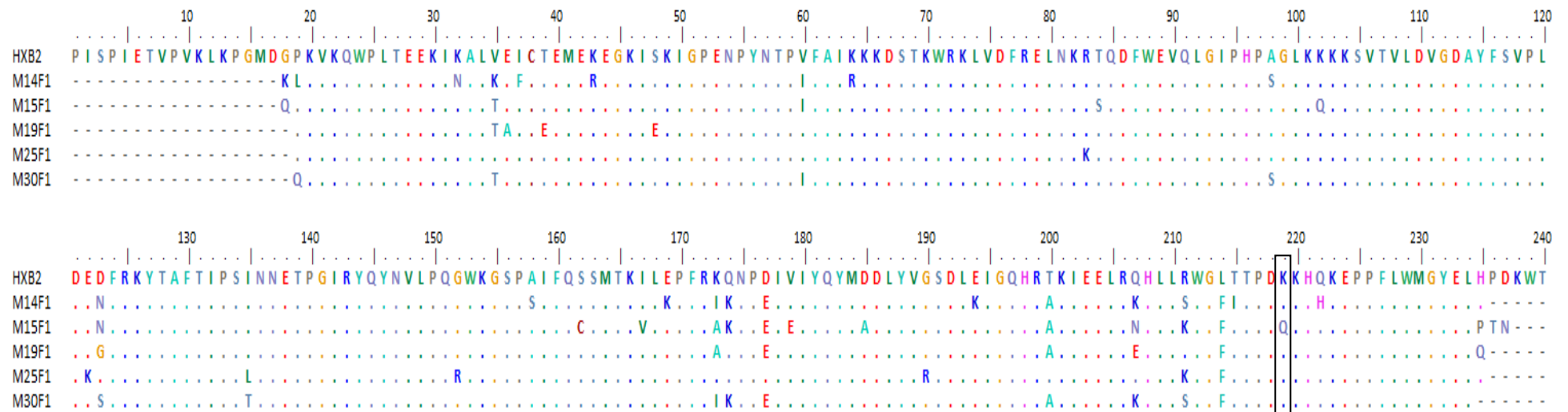
**Figura 6** - Alinhamento das 6 seqüências aminoacídicas “consenso” correspondentes a mães que não cumpriram TAR de prevenção da transmissão vertical do HIV-1 durante a gravidez. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.



**Figura 7** - Alinhamento das 2 seqüências aminoacídicas “consenso” obtidas de mães que não cumpriram TAR e ocorreu TMF do HIV-1. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento.

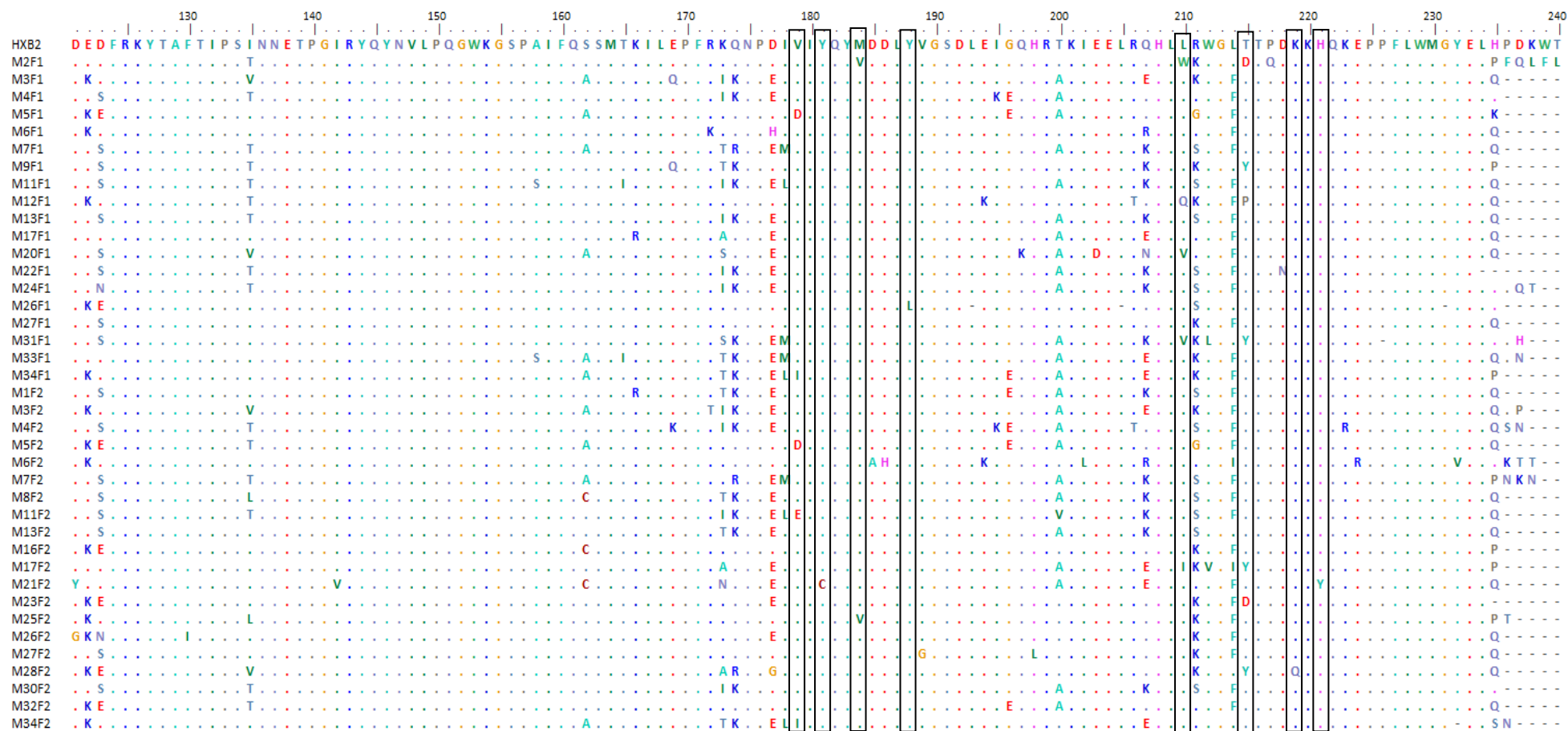


**Figura 8** - Alinhamento das 4 seqüências aminoacídicas “consenso” obtidas de mães que não cumpriram TAR e não ocorreu TMF do HIV-1. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.

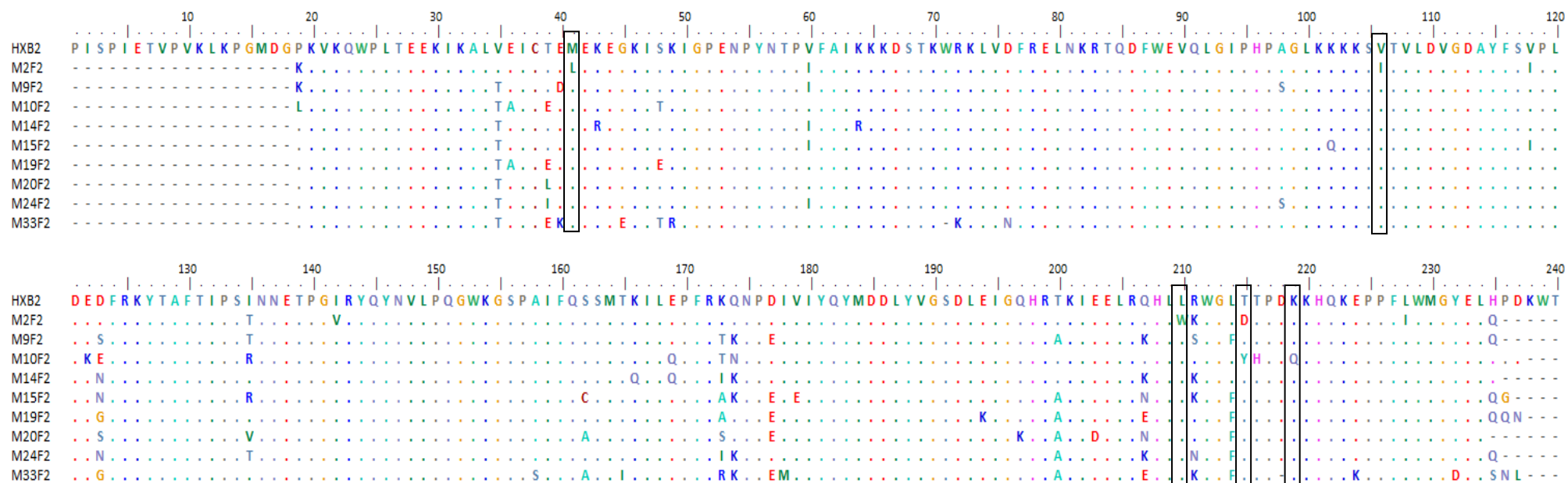


**Figura 9** - Alinhamento das 5 sequências aminoácidas “consenso” derivadas de mães que cumpriram TD. As sequências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da sequência em estudo e 1 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º filho. As sequências “consenso” em estudo foram comparadas com a sequência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as sequências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.

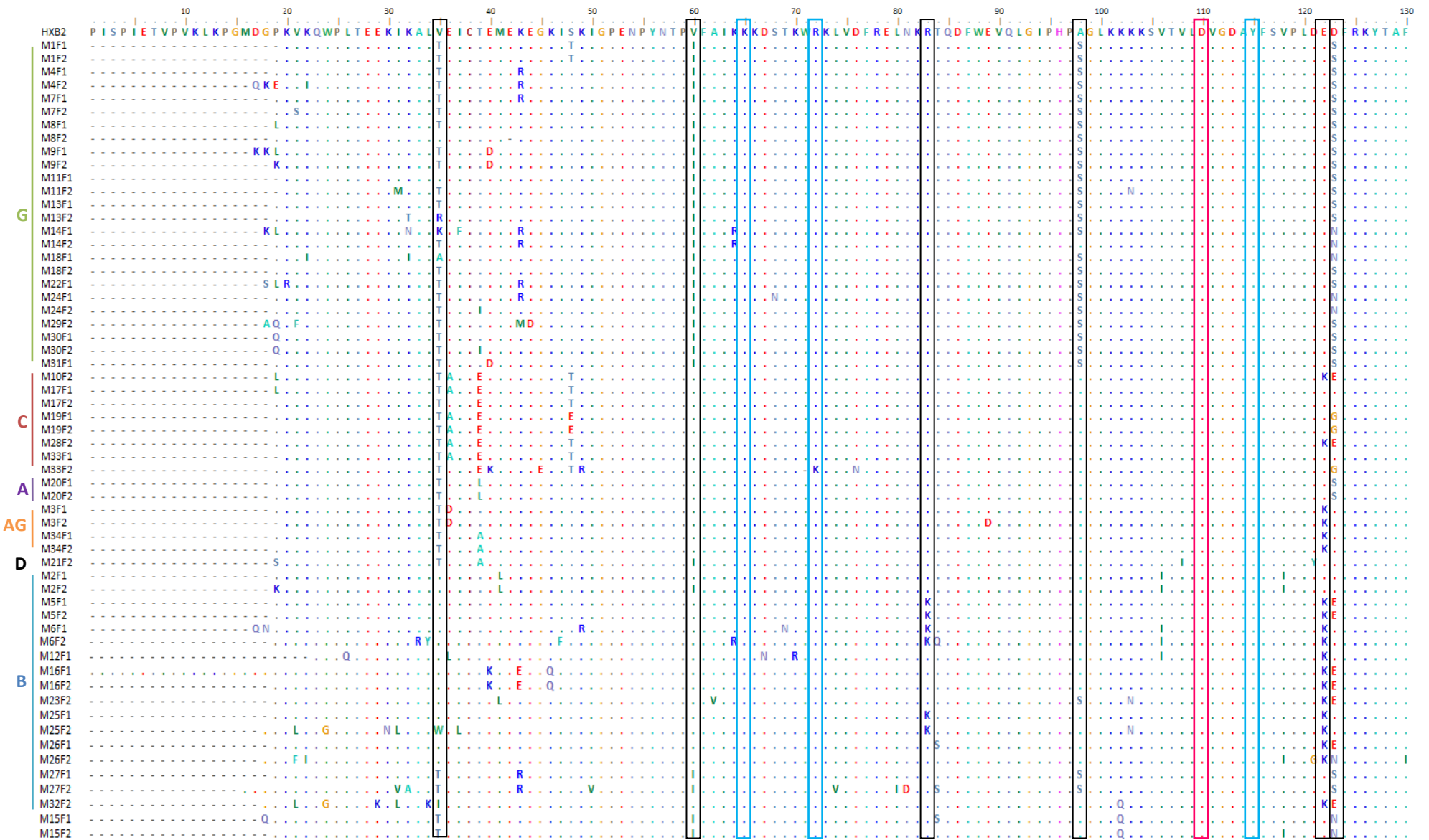


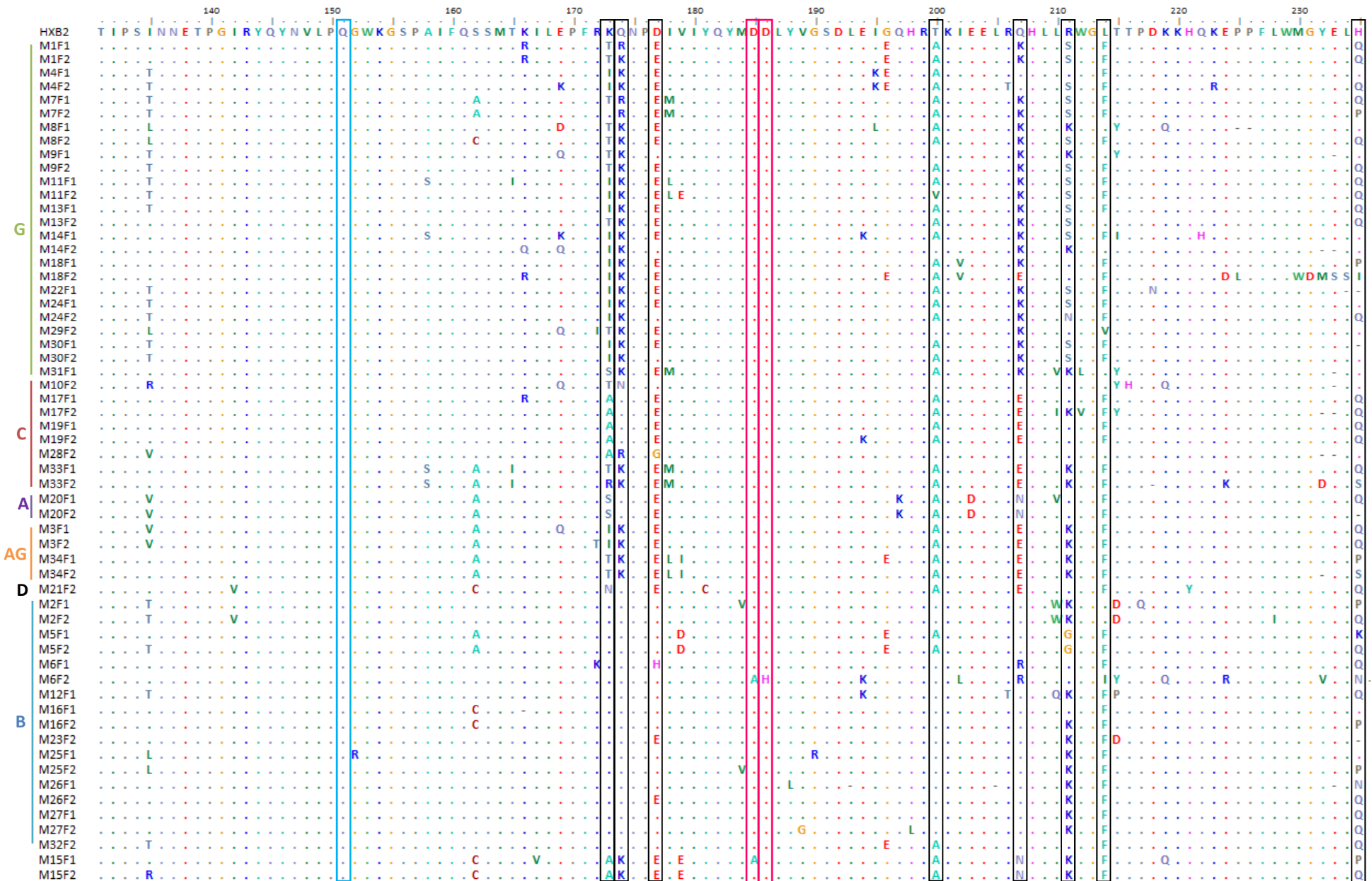


**Figura 10** – Alinhamento das 39 seqüências aminoacídicas “consenso” derivadas de mães que cumpriram TT. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.



**Figura 11** – Alinhamento das 9 seqüências aminoácidas “consenso” derivadas de mães que cumpriram HAART. As seqüências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da seqüência em estudo e 2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 2º filho. As seqüências “consenso” em estudo foram comparadas com a seqüência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso K03455). Os pontos indicam semelhança entre as seqüências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos encontram-se assinaladas as mutações de resistência aos RTI observadas.





**Figura 12** – Alinhamento aminoacídico das 59 sequências “consenso” da região RT obtidas no presente estudo. As sequências encontram-se identificadas com o prefixo M (mãe) e F (filho) seguidos, respectivamente, do número da sequência em estudo e 1/2 que significa tratar-se de amostras associadas ao nascimento do 1º ou 2º filho. As sequências “consenso” em estudo foram comparadas com a sequência de referência HXB2 (*GeneBank*, nº de acesso: K03455) e ordenadas de acordo com a sua classificação vírica (subtipos indicados à esquerda). Os pontos indicam semelhança entre as sequências e os traços correspondem aos *gaps* introduzidos de forma a manter o correcto alinhamento. Nos rectângulos pretos encontram-se assinalados os polimorfismos naturais observados; nos rectângulos rosa encontram-se assinalados os resíduos de aspartato correspondentes a tríade catalítica D<sub>110</sub>D<sub>185</sub>D<sub>186</sub>; nos rectângulos azuis encontram-se assinalados os resíduos correspondentes ao local de ligação dos dNTPs (K<sub>65</sub>, R<sub>72</sub>, Y<sub>115</sub>, Q<sub>151</sub>).