

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



## **Genotipagem do VIH e Análise de Resistência à Droga dos Seropositivos da Guiné –Bissau**

**Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

José Lopes Zinga Jorge

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Filomena Trabucho Caeiro - FCUL

Doutor Aladje Baldé - Investigador BioISI

2015

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Genotipagem do VIH e Análise de Resistência à Droga dos  
Seropositivos da Guiné –Bissau**

**Mestrado em Biologia Molecular e Genética**

José Lopes Zinga Jorge

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Maria Filomena Trabucho Caeiro – FCUL

Doutor Aladje Baldé – Investigador BioISI

2015

## ABREVIATURAS

3TC	Lamivudina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARV	<i>Antiretroviral therapy</i>
ARN	Ácido ribonucleico
AZT	Zidovudina
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
BioEdit	<i>Biological sequence alignment editor</i>
CA	Proteína da cápside
CRFs	Formas recombinantes circulantes
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CCR5	C-c receptor quemoquina tipo 5
CD4	<i>Cluster of differentiation</i>
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
d4T	Estavudina
DBS	<i>Dried Blood Spots</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EFV	Efavirenz
FTA	<i>Flinder Technology Associates</i>
GAP	Proteína ativadora de GTPase
Gp	Glicoproteína
HAART	<i>Highly active antirretroviral therapy</i>
IP	Inibidor de protéase
IN	Integrase
Kb	Kilobases
LPV/r	Lopinavir, ritonavir
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MA	Proteína da matriz
ml	Mili litro
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
Nef	<i>Negative regular factor</i>

NC	Nucleocapside
ng	Nanograma
NNRTI	<i>Non-nucleoside Reverse Transcriptase inhibitors</i>
NRTI	<i>Nucleoside reverse transcriptase inhibitors</i>
nM	Nanomolar
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PHYLIP	<i>Phylogeny program</i>
PR	Protéase
Rev	Regulator of expression virion protein
Rv	Retrovirus
RT	Transcriptase reversa
Sida	Síndrome da imunodeficiência adquirida
Siv	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
SPSS	<i>Statistical package for the social science</i>
Su	Proteína de superfície
Tat	<i>Tran-Activador of Transcription</i>
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembranar
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
Vpr	<i>Viral Protein R</i>
Vpx	<i>Viral protein X</i>
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
μl	Microlitro

## ÍNDICE

1.1	<i>Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)</i> .....	9
1.2	<i>Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)</i> .....	9
1.2.1	Diversidade Genética de VIH.....	9
1.2.2	Origem Filogenética .....	10
1.2.3	Epidemiologia da infecção por VIH-1 na Guiné – Bissau .....	11
1.3	<i>Estrutura e organização do genoma viral</i> .....	11
1.3.1	Ciclo replicativo .....	12
1.3.2	Protease viral .....	13
1.3.3	Transcriptase viral .....	13
1.3.4	Inibidores de enzimas retrovirais.....	13
3.1	<i>População estudada</i> .....	14
3.2	<i>Desenho de oligonucleotidos para amplificação do gene protease e de transcriptase</i> 15	
3.3	<i>Preparação do ADN</i> .....	15
3.3.1	Preparação de amostras de sangue imobilizado em FTA .....	15
3.3.2	Extração de ácidos Nucleicos .....	15
3.3.3	Preparação dos ácidos nucleicos de sangue periférico .....	16
3.4	<i>Reação de Transcrição Reversa</i> .....	16
3.4.1	Amplificação de genes <i>protease</i> e <i>transcriptase reversa</i> por PCR.....	16
3.4.2	Separação e análise de fragmentos RT e PR resultantes da segunda reação PCR. 17	
3.4.3	Purificação do produto PR e RT.....	18
3.5	<i>Sequenciação de gene PR e TR</i> .....	18
3.6	<i>Análise de sequências de PR e TR obtidas</i> .....	18
3.6.1	Análises filogenéticas.....	18
4.1	<i>Análise das sequencias RT e PR resultantes da segunda reação PCR</i> .....	19
4.2	<i>Análise Filogenética</i> .....	20
4.3	<i>Subtipo mais frequente</i> .....	20
4.4	<i>Mutações observadas</i> .....	21
4.4.1	Mutações aos inibidores da protease .....	21
4.4.2	Mutações aos Inibidores da Transcriptase Reversa.....	21
4.4.3	Resistência aos Antirretrovirais.....	22

## ÍNDICE DAS TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de RT-PCR e na primeira reação de PCR ....	15
Tabela 2 – Sequências dos <i>primers</i> utilizados na segunda reação PCR .....	15
Tabela 3- Perfil da resistência aos inibidores da Protease, de acordo com o Stanford HIV Drug Resistance Database (n=18) .....	22
Tabela 4- Perfil da resistência aos inibidores da Transcriptase Reversa Análogos ao Nucleosídeo, de acordo com o Stanford HIV Drug Resistance Database. (n=19) .....	22
Tabela 5 - Perfil da resistência aos inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogos ao Nucleosídeo, de acordo com o Stanford HIV Drug Resistance Database.(n=19) .....	23
Tabela 6 - Prevalência das mutações para a <i>Protease</i> N=18 .....	XXIX
Tabela 7- Prevalência das mutações para a <i>Transcriptase Reversa</i> N=19 .....	XXIX
Tabela 8 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 1 (PR1-RT21) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXX
Tabela 9 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 2 (PR2-RT22) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXX
Tabela 10 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 3 (PR3-RT23) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXX
Tabela 11 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 4 (PR4-RT24) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXX
Tabela 12 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 5 (PR5-RT25) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXI
Tabela 13 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 6 (PR6-RT26) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXI
Tabela 14 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 7 (PR7-RT27) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXI
Tabela 15 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 8 (PR8-RT28) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXI
Tabela 16- Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 9 (PR9-RT29) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXII
Tabela 17 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 10 (PR10-RT30) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXII
Tabela 18 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 11 (PR11-RT31) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXII
Tabela 19 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 12 (PR12-RT32) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXII
Tabela 20 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 13 (PR13-RT33) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXIII
Tabela 21 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 14 (PR14-RT34) referentes aos genes <i>PR</i> e <i>RT</i> . .....	XXXIII

Tabela 22 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 15 (PR15-RT35) referentes aos genes <i>PR e RT</i> .....	XXXIII
Tabela 23 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 16 (PR16-RT36) referentes aos genes <i>PR e RT</i> .....	XXXIII
Tabela 24 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 17 (PR17-RT37) referentes aos genes <i>PR e RT</i> .....	XXXIV
Tabela 25 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 18 (PR18-RT38) referentes aos genes <i>PR e RT</i> .....	XXXIV
Tabela 26 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 19 (RT39) referentes aos genes <i>PR e RT</i> .....	XXXIV

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do genoma VIH, e as diferentes posições dos <i>primers</i> utilizados no estudo ao longo do referido genoma.....	17
Figura 2 - Gel de agarose evidenciando o fragmento de interesse (gene <i>protéase</i> 456pb), onde M: corresponde ao DNA Ladder; PR1 a PR19 amostras submetidas a separação por electroforese. ....	19
Figura 3 - Gel de agarose evidenciando o fragmento de interesse (gene <i>transcriptase reversa</i> 646pb), onde M: corresponde ao DNA Ladder; RT1 a RT16 amostras submetidas a separação por electroforese. ....	20
Figura 4 - Relações filogenéticas entre as 37 sequencias de VIH – 1, referentes aos genes (18)PR e (19)RT.....	20

## RESUMO

A síndrome da imunodeficiência humana tem sido a principal causa de morte em muitos países em vias de desenvolvimento, particularmente nos continentes Africano e Asiático, desde a década de 80, altura que o vírus VIH foi caracterizado como agente etiológico da SIDA.

A grande diversidade genética deste vírus (VIH-1), decorrente de vários factores que atuam em concordância, levou a classificá-lo em três grupos distintos (M, N e O). O grupo M responsável pela pandemia de VIH a nível mundial, diversificou-se em nove subtipos, incluindo os sub-subtipos (A1-A5, F1-F2), múltiplas formas recombinantes únicas (FRU) e muitas outras formas recombinantes circulantes (FRC), ao passo que os grupos N e O são quase endémicos ao continente Africano.

O advento da terapia antirretroviral tornou possível caracterizar a SIDA como doença crónica, através da administração de inibidores da Transcriptase Reversa, Protease e Integrase numa terapia conhecida por *Highly Active Antirretroviral Therapy* (HAART). O teste de genotipagem em pacientes infectados pelo VIH-1 ajuda a seleccionar melhor a terapia antirretroviral e auxiliar nos casos de falha terapêutica. Este trabalho teve como objectivo mapear mutações, assim como determinar o perfil de resistência aos antirretrovirais fornecidos aos pacientes infectados por VIH na Guiné-Bissau e com este intuito foram genotipados 20 pacientes de ambos os géneros, nomeadamente n=12 (60%) femininos e n=8 (40%) masculinos, em tratamento ARV no hospital Nacional Simão Mendes na Guiné-Bissau.

De acordo a *Stanford HIV Drug Resistance Database*, das n=37 sequências analisadas n=18 (48,6%) referentes ao gene *protease* e n=19 (51,4%) referentes à *transcriptase reversa*, a forma recombinante CRF02\_AG n= 35 (94,5%) é a mais predominante, seguida pelos tipos D e G, ambos com frequência de 2,7%.

Na população em estudo não foram observadas as principais mutações de resistência aos inibidores da protéase, mas foram observadas varias mutações secundárias, dentre elas, com maior frequência, n=18 (100%) K20I, L89M, I13V, H69K.

Relativamente aos inibidores da transcriptase reversa não análogos ao nucleótido, as principais mutações observadas foram K103N (10,5%), E138A, L100I e V90I, cada uma delas com frequência de 5,2%, e várias outras mutações secundárias.

**Palavras chave:** Antirretroviral, Mutação, Resistência, VIH.

## **Abstract**

The human immunodeficiency syndrome has been the leading cause of death in many developing countries, particularly in Africa and Asia, since 80s when HIV virus was recognized as the etiological agent of AIDS. The huge diversity of HIV virus (HIV-1), due to several factors that act in agreement, led to classify it into three different groups (M, N and O). The M group, responsible for the worldwide HIV pandemic, differentiate into nine subtypes, including sub-subtypes (A1-A5, F1-F2), multiple unique recombinant forms (FRU) and many other circulating recombinant forms (CRF), while the group N and O are nearly endemic to the African continent.

With the advent of antiretroviral therapy has made possible to consider AIDS as chronic disease, by administering inhibitors of reverse transcriptase, protease and integrase in a therapy named by Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART).

The genotyping test in patients infected with HIV-1 helps to better antiretroviral selection therapy and support in cases of treatment failure. The aim of this work is to map mutations, as well as determine the resistance profile to antiretroviral drugs provided to HIV infected patients in Guinea-Bissau and, with this intention, 20 patients of both genders were genotyped: 12 (60%) female and 8 (40%) men in ARV treatment at the Simão Mendes National Hospital in Guinea – Bissau.

According to Stanford HIV Drug Resistance Database, from the 37 sequences analysed, 18 (48.8%) for *protease* gene and 19 (51.4%) for *reverse transcriptase*, the recombinant form CRF02\_AG is the most prevalent, followed by types D and G both with frequency (2.7).

In the population study the main mutations of resistance to protease inhibitors were observed, but several secondary mutations were find, among which more often n=18(100%) K20I, L89M, I13V, H69K.

For reverse transcriptase inhibitors nucleotide analogues, the main changes observed were K103N (10.5%), E138A, L100I and V90I, each with 5.2% frequency and several other secondary mutations. We observed that M184V + T215Y (10.5%), and M184IM, K70V (5.2%), M184V + T215Y (10.5%), as the major mutations of resistant to reverse transcriptase inhibitor.

**Keywords:** Antiretroviral, Mutations, Resistance, HIV.

## **INTRODUÇÃO**

### **1.1 Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA)**

A síndrome da imunodeficiência humana, foi reconhecida como uma doença emergente em 1981, quando um elevado número de jovens homossexuais sucumbiam por infecções oportunistas estranhas. Subsequentemente o retrovírus VIH-1 foi caracterizado como agente etiológico da SIDA e cinco anos mais tarde, ou seja, em 1986 o VIH-2 foi igualmente descoberto causando SIDA em pacientes na região Oeste Africana [1]. Desde então tem sido a principal causa de morte em muitos países em vias de desenvolvimento, particularmente na África subsariana e Ásia onde se encontram cerca de 70% das pessoas infectadas globalmente [2].

Por este facto, a SIDA pode ser encarada como uma das principais doenças infecciosas que apoqueta a humanidade nos últimos 30 anos, transformando-se claramente num problema de saúde pública mundial [3]. Caracteriza-se por uma crónica e progressiva degeneração do sistema imunológico, disfunção neurológica severa e anomalias cognitivas que ocorrem nas primeiras fases da infecção que frequentemente podem terminar com alguma demência e debilidades físicas [4].

### **1.2 Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)**

O vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e 2 (VIH-1 e VIH-2), pertencem à família *Retroviridae* e ao género *Lentivirus* [5, 6]. O VIH-1 é amplamente distribuído pelo mundo sendo responsável pela pandemia a nível global, e o VIH-2 é quase restrito à região Oeste do Continente Africano com poucos casos descritos na Europa, Índia e nos Estados Unidos da América. A infecção pelo VIH-2, caracteriza-se por ser menos patogénica, menos prevalente, e com uma progressão lenta da doença [2, 7 e 8].

#### **1.2.1 Diversidade Genética de VIH**

VIH apresenta uma alta diversidade genética decorrente de vários factores que atuam em concordância levando a rápida evolução viral, dentre estes, destacam-se os

inúmeros erros da enzima transcriptase reversa na incorporação de nucleótidos durante o processo da transcrição reversa (RT) e à elevada taxa de replicação vírica no hospedeiro, aproximadamente  $10^{10}$  viriões por dia num indivíduo com infecção crónica [9].

Estudos filogenéticos em amostras de VIH de diferentes regiões geográficas, levaram a classifica-lo em três distintos grupos isto é, M (major), O (outlier), e N (não - M, não - O) [8, 10]. Os dois últimos grupos são extremamente raros, quase que endémicos no Congo Democrático, Camarões e algumas vezes em pacientes relacionados a estes países Africanos [11, 12]. O grupo M é responsável pela pandemia de VIH a nível mundial, por ser altamente divergente apresenta-se subdividido em subtipos (A, B, C, D, F, G, H, J e K). Os subtipos A e F subdividem-se ainda em A1-A5 e F1-F2 respectivamente [11, 13].

Quando dois ou mais subtipos e/ou sub-subtipos do VIH, infectam simultaneamente uma célula, fenómeno conhecido como superinfecção, originam as formas recombinantes circulantes (CRFs), que aumentam ainda mais a diversidade genética deste vírus, com base nisto são atualmente conhecidas 61 CRFs [10, 11].

### **1.2.2 Origem Filogenética**

Evidências atuais sugerem que o VIH é um vírus de origem zoonótica introduzido na população humana através de infecções cruzadas entre espécies, pelo vírus da imunodeficiência dos símios (SIV) – que infecta primatas Africanos não humanos [3, 6 e 14].

Dados filogenéticos e propriedades biológicas, demonstram que o VIH-1 partilha muitas semelhanças em termos de organização genómica com o SIV isolado de uma subespécie de Chimpanzé - *Pan troglodytes, troglodytes* (SIVcpz) [14, 15]. Para além dos genes reguladores e estruturais comuns a todos os lentivírus de primatas, o VIH-1 e o SIVcpz possuem adicionalmente o gene *Vpu* que não existe nos outros lentivírus [15].

No entanto o VIH-2 é intimamente relacionado ao lentivírus isolado de *Sooty mangabeys* (SIVsm) - outro primata Africano, com o qual partilha uma organização genómica similar [14], codificando igualmente uma proteína acessória *Vpx* que não existe em outros lentivírus [3]. Análise de sequências parciais da proteína gag de vários

vírus permitiram determinar que o VIH-2 é coincidentemente endêmico nas regiões geográficas que são o habitat natural do *Sooty mangabey*, nomeadamente, a Costa Oeste Africana, do Sul do rio Casamance no Senegal ao rio Sassandra na Côte d'Ivoire (zonas contíguas ao epicentro da epidemia pelo VIH-2), Senegal, Guiné-Bissau, Guiné Conakry, Cote d'Ivoire, em sobreposição com Serra Leoa e Libéria onde foram identificadas novas cepas do vírus VIH-2, reforçando assim a teoria de que esta seja a mais plausível origem para o VIH-2 [3, 15].

Acredita-se que, o contacto direto do homem com o sangue e outros fluidos destes animais (*Sooty mangabeys* e *Pan troglodytes troglodytes*), como consequência da caça e alimentação de carne contaminada mal cozida, seja a explicação mais plausível da transmissão de lentivirus de primatas não humanos para o homem, uma vez que, estes animais servem para o consumo humano em algumas comunidades do Continente Africano e os órfãos destes são tratados como animais de estimação [2, 3, 15].

### **1.2.3 Epidemiologia da infecção por VIH-1 na Guiné – Bissau**

Análises filogenéticas sugerem que a forma recombinante CRF02\_AG introduzida em finais de 1970 e o sub-subtipo A3, são respectivamente as formas de VIH-1 mais prevalentes na Guiné –Bissau. Estes dados permitiram ainda concluir que o VIH-1 se disseminou no país partindo de Bissau, e a maior parte das infecções ocorreram entre 1981-1983, elevando a média de infectados de 350 para 4232 [16].

Apesar da Guiné-Bissau ser conhecido como o país com maior prevalência de VIH-2 da região Oeste Africana (8 – 10%) [17,18] nos últimos anos tem se verificado um decréscimo, de 8,9%, 7,4% e 4,4% em 1987, 1996 e 2006, respectivamente, e um substancial aumento na prevalência de VIH-1 [13, 17].

### **1.3 Estrutura e organização do genoma viral**

O VIH é um retrovírus (RV), cujo genoma são duas moléculas de RNA de cadeia simples com cerca de 9,33 kb (kilobases) [31], contém três genes comuns a todos retrovírus, nomeadamente os genes *Gag* – precursor das proteínas p17 da matriz (MA), p24 da cápside (CA), p7 da nucleocápside (NC), e ainda a proteína p6; o gene *Pol* – que codifica proteínas responsáveis pelas atividades enzimáticas do vírus, tais como a

protéase (PR), transcriptase reversa (RT), integrase (IN) e RNase H, e finalmente o gene *Env* – que codifica para o precursor das proteínas do invólucro viral gp160, que origina as proteínas transmembranar (TM) gp41 e de superfície (SU) gp120 [19, 20]. Paralelamente a estes genes, o genoma VIH possui ainda os genes *Tat*, *Rev*, *Nef*, *Vif*, *Vpr* e *Vpu* (VIH-1) ou *Vpx* (VIH-2), conhecidos como acessórios. O genoma é flanqueado pelas sequências repetitivas terminais longas (LTR/*long terminal repeats*), que contêm promotores necessários à transcrição do genoma viral [20].

### 1.3.1 Ciclo replicativo

O VIH, é um retrovírus que utiliza a interação entre suas proteínas de superfície e as presentes na membrana das células hospedeiras, como estratégia para iniciar a infecção e colonização destas células. É assim que o ciclo replicativo do VIH tem sido dividido em duas fases.

Entre os intervenientes da primeira etapa fazem parte as glicoproteínas de superfície gp120 e gp41 codificadas pelo gene *Env*, que medeiam a entrada do vírus na célula hospedeira, inicialmente estabelece-se a interação entre a gp120 e as moléculas CD4 presentes á superfície da célula alvo, como consequência, ocorrem alterações na conformação estrutural da gp120 e da molécula CD4, assim como na estrutura da gp41 que se torna apta a interagir com coreceptores de quimiocinas, particularmente CCR5 e CXCR4 que facilitam a entrada do VIH na célula hospedeira

A fusão das proteínas de superfície do vírus com as proteínas de membrana da célula alvo, culmina com a libertação do material genético viral no citoplasma da célula, onde por intermedio da proteína transcriptase reversa é retrotranscrito em cDNA, que é integrado no genoma da célula hospedeira com auxilio da proteína viral integrase processo que no fundo é de carácter obrigatório na replicação retroviral. Uma vez o pró-vírus integrado a célula hospedeira, passa a expressar os genes virais e o conjunto de RNAs transcritos são transportados para o citoplasma onde são traduzidos ou vão constituir as novas partículas virais, processo regulado pela proteína Rev. A adição do ácido mistirico às poliproteinas virais recém sintetizadas, fornece um domínio hidrofóbico necessário a interação com a membrana celular, facilitando a montagem das partículas virais. O ciclo termina com a libertação e maturação dos viriões [21, 22, 23].

### **1.3.2 Protease viral**

A protéase (PR), é a enzima que intervém na clivagem das poliproteínas Gag e Gag-Pol durante a fase de maturação do virião infeccioso, resultando na produção de enzimas e proteínas estruturais do capsídeo [19, 20]. Provavelmente, é a enzima mais estudada como possível alvo para conter a propagação viral, como resultado desenvolveram-se antirretrovirais que são administrados em combinação com inibidores da transcriptase reversa e da integrase em um único esquema terapêutico denominado *highly active anti-retroviral therapy* (HAART) [24, 25], que tem levado a inibição da replicação viral e conseqüentemente a redução do índice de mortalidade associado ao VIH [26].

### **1.3.3 Transcriptase viral**

A transcriptase reversa (RT) codificada pelo gene *Pol*, na sua forma ativa apresenta-se como um heterodímero constituído por duas subunidades, p66 intervém na incorporação de nucleótidos e p51 mantém a conformação apropriada da enzima durante a transcrição reversa. A RT é fundamental no ciclo replicativo do VIH, uma vez que é responsável pela síntese da dupla cadeia de DNA partindo de uma molécula de RNA cadeia simples do genoma viral. Pela sua importância no ciclo replicativo, grande parte dos agentes terapêuticos concebidos para inibir a replicação viral, têm esta enzima como alvo, como por exemplo os inibidores não nucleosídicos da transcriptase reversa (NNRTI) e os inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (NRTI) [27, 28 e 29].

### **1.3.4 Inibidores de enzimas retrovirais**

Três enzimas essenciais do VIH, protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN), têm sido alvos preferenciais no desenvolvimento de inibidores capazes de conter a replicação do VIH [26].

Atualmente 24 Antirretrovirais (ARV) licenciados estão disponíveis para o tratamento do VIH, que se agrupam nas seis seguintes categorias; 1- Inibidores da *transcriptase reversa*, seis nucleosídicos e um nucleotídico (NRTI); 2 - cinco inibidores não nucleotídicos da transcriptase reversa; 3 – nove inibidores da protease; 4 – um inibidor de fusão, 5 – um receptor de quimiocinas (CCR5) antagonista; 6 – um inibidor da

integrases [30]. Estudos recentes revelam que a integrase pode ser um alvo terapêutico melhor aproveitado, pelo facto de não existir um gene homólogo no homem [26].

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo deste estudo é genotipagem do VIH e análise de resistência às drogas em pacientes da Guiné-Bissau com vista a fornecer uma primeira pista sobre os resultados da implementação do programa de fornecimento gratuito de antirretrovirais aos pacientes deste país no quadro da cooperação com o estado Brasileiro. Por outro lado, este trabalho visa também entre outros objetivos permitir a implementação de um programa nacional de vigilância em resistência ao VIH, garantindo a seleção de primeira linha de regime adequado de terapia antirretroviral no país e desta forma alcançar a supressão viral durável abaixo do limite de detecção da carga viral e conseguir controlar a dinâmica de replicação do VIH.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 População estudada**

Em Maio de 2013, 20 pacientes de ambos géneros, nomeadamente 12 (60%) feminino e 8 (40%) masculino, em tratamento ARV no Hospital Nacional Simão Mendes na Guiné-Bissau, foram aleatoriamente seleccionados a participarem voluntariamente no estudo, dando o seu consentimento informal. Aprovado pela Comissão Nacional de Ética do INASA (Instituto Nacional da Saúde), o estudo incluiu pacientes com uma média de idade de 35 anos, observados durante as visitas regulares de acompanhamento, cujo tempo de duração do tratamento ARV entre eles varia de 1 a 8 anos. A contagem média de células CD4 foi de 4000 células/mL (desvio padrão, 156 células/mL).

O regime atual de dois inibidores nucleosídeos RT (NRTIs) (estavudina [d4T] / zidovudina [AZT] e lamivudina [3TC]), e um inibidor da RT não nucleósido (ITRNN) (nevirapina [NVP] ou efavirenz [EFV]), foi o regime de primeira linha administrado a 14 pacientes (70%) e 6 pacientes (30%) receberam um inibidor de segunda linha para a protease (lopinavir / ritonavir [LPV/ r]).

### 3.2 Desenho de oligonucleotídeos para amplificação do gene *protéase* e de *transcriptase*

Para amplificação do gene *PR* e *RT*, delinear-se *primers* a partir de regiões conservadas, dos referidos genes (Fig. 1), usando como referência a sequência *HXB2* do VIH-1 disponível no NCBI (National Center of Biotechnology Information). Estes *primers* cuja as sequências e posições estão descritas nas tabelas 1 e 2, foram delineados de modo a permitir a amplificação de quase todos os subtipos de VIH-1.

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados na reação de RT-PCR e na primeira reação de PCR

<i>Primer</i>	Sequências nucleotídicas 5' - 3'	Gene alvo	Posição no genoma
GAG2	GAGGAAGCTGCAGAATGGG	<i>Protease</i>	730 - 748
PR1	ATGATGCAGAGAGGCAATTT	<i>Protease</i>	1463 - 1482
RT137	TTCTGTATGTCATTGACAGTCCAGC	<i>Transcriptase</i>	2845 - 2869
RT3303	TAAATTTGTATRTCATTGAC	<i>Transcriptase</i>	2855 - 2875

Tabela 2 – Sequências dos *primers* utilizados na segunda reação PCR

<i>Primer</i>	Sequências nucleotídicas 5' - 3'	Gene alvo	Posição no genoma
PR3	AGAGCCAACAGCCCCACCA	<i>Protease</i>	1693 - 1717
PR4	GGGCCATCCATTCCTGGCTT	<i>Protease</i>	2130 - 2149
RT1	CCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA	<i>Transcriptase</i>	2148 - 2176
RT4	AGTTCATAACCCATCCAAAG	<i>Transcriptase</i>	2775 - 2794

### 3.3 Preparação do ADN

#### 3.3.1 Preparação de amostras de sangue imobilizado em FTA

Em tubos EDTA (K3), foram recolhidos 5 mL de sangue periférico, e 50 µl de sangue total foram imediatamente imobilizados em papel de filtro Whatman 903 (Schleicher e Schuell 903). Os papéis de filtro foram secos *overnight* à temperatura ambiente e armazenados a - 20 °C até ao momento de processamento.

#### 3.3.2 Extração de ácidos Nucleicos.

Os ácidos nucleicos foram extraídos na Guiné Bissau, utilizando o robot nucleSence EasyMAG do Biomerieux, o protocolo implementado foi de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.3.3 Preparação dos ácidos nucleicos de sangue periférico

O extractor automático NucliSENS miniMAG (BioMerieux) foi usado para o isolamento de ácidos nucleicos recorrendo a tecnologia BOOM, com a sílica magnética, de acordo com a seguinte ordem de eventos resumidamente descritos; em cada tubo contendo 500 µl do plasma, adicionou-se 2 mL de *lysis Buffer* (BioMerieux), mistura incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos, 1 mL desta foi transferida para tubos descartáveis com auxílio de uma pipeta, 70 µl da sílica foram adicionados e misturados. Finalmente o tubo descartável com amostras foi transferido para o extrator automático de ácidos nucleicos “NucliSENS EasyMAG” previamente programado.

### 3.4 Reação de Transcrição Reversa

Com o objectivo de obter cDNA para a reação de PCR, procedeu-se à reação de transcrição reversa, seguindo os seguintes passos: Num tubo de 0,2 mL preparou-se uma reação de 20 µl no total, onde foram adicionados 4 µl de tampão de transcrição reversa (5x), 1 µl de cada um dos *primers* GAG2, PR1, RT137, RT3303 e 9 µl de RNA (100 ng/µl). Com ajuda de vórtex misturou-se a solução que, após ser incubada a 70 °C durante 5 min, foi transferida para o gelo durante 5 min, seguidamente adicionou-se 2 µl de dNTPs *mix* e 1 µl de enzima transcriptase reversa. A reação foi misturada por agitação e com o toque de dedo, e novamente incubada no Termo ciclador - 2720 Applied Biosystems a 42 °C durante 90 min.

O produto total desta reação (20 µl de cDNA) foi utilizado como cadeia molde na primeira reação de amplificação por PCR.

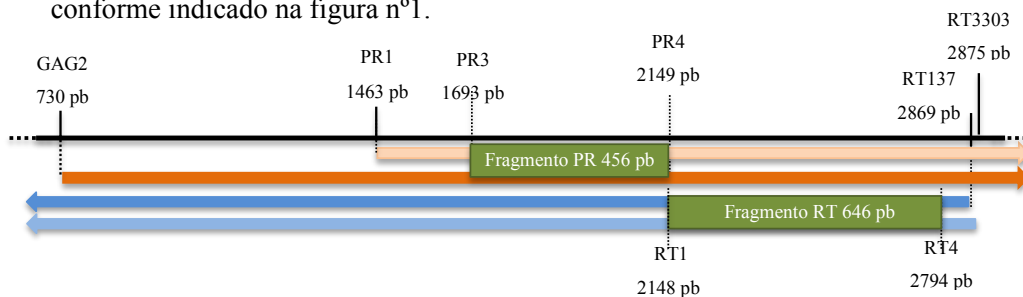
#### 3.4.1 Amplificação de genes *protease* e *transcriptase reversa* por PCR

Com objectivo de aumentar a especificidade e sensibilidade da PCR, reação de amplificação dos genes *PR* e *TR* foi realizada em duas etapas sucessivas (*nested PCR*). Aos 20 µl produto da reação de transcrição reversa, como referido no ponto anterior, já tinham sido adicionados os *primers* GAG2, PR1, RT137 e RT3303, adicionou-se apenas 5 µl de tampão de PCR (10x *Dream Taq Buffer*), 1 µl da enzima (*Dream Taq DNA Polymerase*) e 24 µl de dH<sub>2</sub>O, perfazendo o volume final de 50 µl da primeira reação PCR.

Os tubos foram colocados no Termo ciclador - 2720 Applied Biosystems obedecendo o seguinte programa: 1 ciclo de 94 °C durante 5 min; 40 ciclos a 94 °C por 30s, 50 °C por 2 min e 72 °C por 30s; finalmente 1 ciclo a 72 °C durante 7 min.

Na etapa de *nested* PCR, 4µl do produto da primeira reação foi utilizado como molde, aos quais foram adicionados 5 µl de Tampão (10x), 1 µl de dNTPs, 1 µl de cada um dos *primers* PR3, PR4, RT1 e RT4, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl da enzima *Dream Taq DNA Polymerase* (Thermo Scientific), 0,5 µl de BSA e 32 µl de dH<sub>2</sub>O, totalizando um volume final de 50 µl, com o seguinte programa PCR: 95 °C durante 5 min; 35 ciclos a 94 °C por 30s, 50 °C durante 2 min e 72 °C por 30 segundos; por fim 72 °C durante 7 min.

A utilização simultânea na mesma reação dos *primers* GAG2, PR1, RT137, RT3303 (os dois primeiros *forward* e os últimos *reverse*, como indicam o sentido das setas na Fig. 1), originou de pelo menos quatro fragmentos de tamanhos diferentes, que submetidos a amplificação com *primers* específicos (Tabela 2), levou a obtenção dos fragmentos de interesse: para o gene *protease* (456 pb) e *transcriptase reversa* (646 pb) conforme indicado na figura nº1.



**Figura 1 - Representação esquemática do genoma do VIH, e as diferentes posições dos *primers* utilizados no estudo.**

### **3.4.2 Separação e análise de fragmentos RT e PR resultantes da segunda reação PCR.**

A separação dos fragmentos amplificados na segunda reação PCR efetuou-se usando o aparelho de electroforese “BIO-RAD Power PAC 3000”. Num gel de agarose a 1 %, previamente corado com GelRed™ (Biotium), foram aplicados 10 µl do produto de PCR e submetidos a uma voltagem constante de 70 volts durante 120 min.

A visualização dos resultados foi feita usando o aparelho de detecção Molecular imagens Gel Doc™ XR+ imagem system BIO-RAD.

### **3.4.3 Purificação do produto PR e RT.**

A visualização dos fragmentos RT e PR por electroforese em gel de agarose, revelou a presença de vários fragmentos não específicos (Figs. 2 e 3). Por este facto as bandas correspondentes aos fragmentos desejados (RT e PR) foram excisadas do gel de agarose, e foi feita a purificação com o kit SureClean Plus, (BIOLINE) de acordo com os procedimentos do fornecedor. O DNA recuperado, foi dissolvido em 15 µl e 1 µl foi usado para quantificação por espectrofotómetro.

### **3.5 Sequenciação de gene PR e TR**

Recorremos aos serviços da sequenciação externa para realizar a genotipagem dos genes *protease* e *transcriptase reversa*.

### **3.6 Análise de sequências de PR e TR obtidas**

Todas as validações e subsequente manipulação dos resultados da sequenciação, bem como as interpretações de dados de genotipagem foram executados com pacotes de *software* e programas do algoritmo de genotipagem gratuitamente disponíveis na internet.

O perfil de electroferograma foi visualizado e manualmente editado usando o Chromas (<http://www.techne.lysium.com.au/>). O *assembly* e alinhamento foram feitos com o pacote de *software* BioEdit desenhado por Tom Hall (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). A interpretação de sequências de acordo com a resistência foi realizada usando *Stanford HIV drug resistance database* (<http://www.hivdb.stanford.edu/>).

#### **3.6.1 Análises filogenéticas.**

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando a versão 3.6 do pacote PHYLIP (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) com uma matriz de distância de máxima verossimilhança e uma transversão de transição para proporção de 2.0. Diagramas de árvore foram construídos com o *software* Treeview, versão 1.4 (incluído

no pacote PHYLIP). Diferenças de nucleótidos foram calculados usando o *software* Infoalign Emboss (<http://embossgui.sourceforge.net/demo/infoalign.html>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise das sequencias RT e PR resultantes da segunda reação PCR .

A Fig. 2 representa o gel de agarose a 1% através do qual foram separados e visualizados os produtos resultantes da segunda reação PCR (nested PCR). A não separação entre as bandas de 500 e 400 pb do DNA Leader, não impediu a identificação do fragmento de interesse (PR) com 460 pb, representada pela banda mais intensa da referida figura.

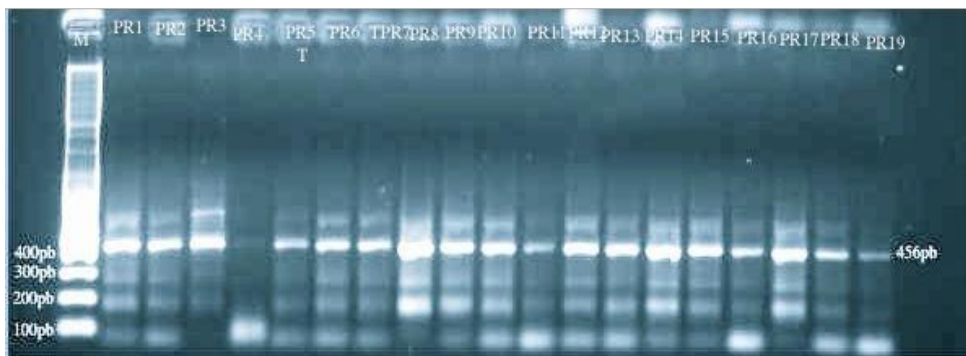


Figura 2 - Gel de agarose evidenciando o fragmento de interesse (gene *protease* 456pb), onde M: corresponde ao DNA Ladder;.

A Fig. 3 representa igualmente um gel de agarose a 1%, através do qual foram separados e visualizados fragmentos RT com 646 pares de bases. Verifica-se nesta imagem a sobreposição entre as bandas de 100 e 200 pb, 300 e 400 pb, e a banda de 500 pb também não está completamente separada da banda de 600 pb, apesar de mais uma vez aparecerem várias bandas não específicas, o fragmento de interesse é inconfundivelmente a mais intensa, situada um pouco acima da região dos 600 pares de bases.

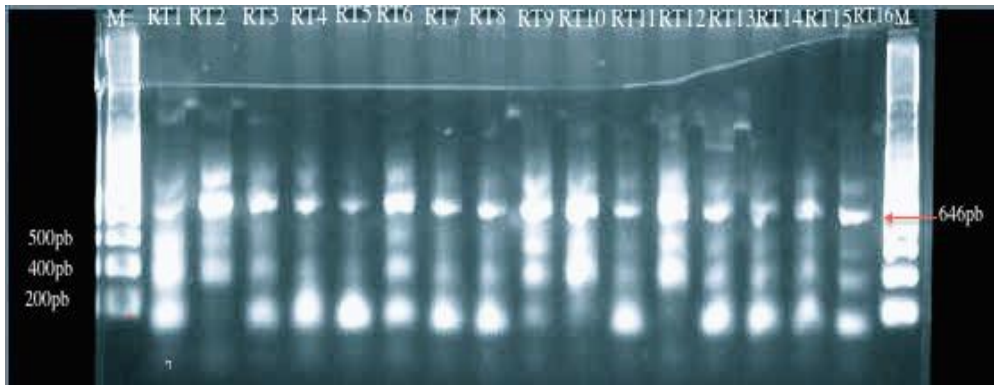


Figura 3 - Gel de agarose evidenciando o fragmento de interesse (gene *transcriptase reversa*, 646pb), onde M: corresponde ao DNA Ladder.

#### 4.2 Análise Filogenética

A análise filogenética das sequências *RT* e *PR* obtidas após sequenciação, quando comparadas com os genes *RT* e *PR* do genoma de referência (*HBX2*), levou a classificá-las em três (3) grandes grupos bastante divergentes entre si, destacando assim a grande diversidade existente entre os isolados obtidos. Apesar desta diversidade, de todos os isolados, PR12\_RT32 é o mais afastado de todos em termos filogenéticos.

De realçar também que, a sequência de referência (PR\_RT *HBX2*) formou um subgrupo completamente separado dos demais, como se pode confirmar na Fig 4.

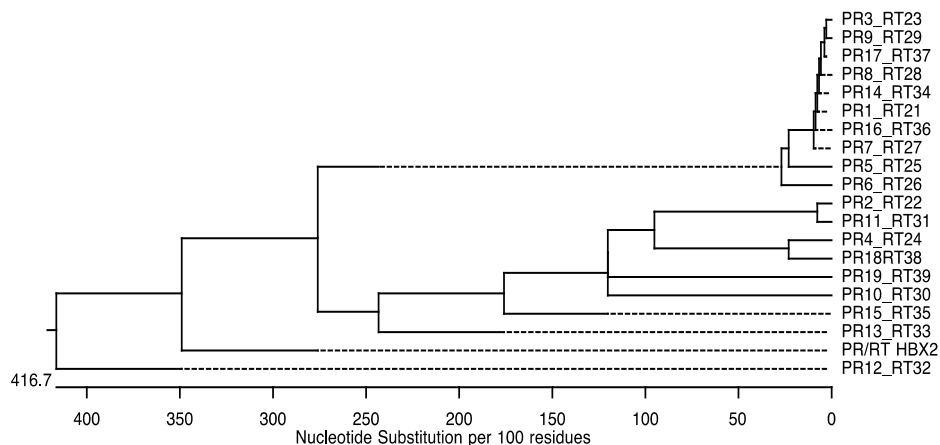


Figura 4 - Relações filogenéticas entre as 37 sequências de VIH – 1, referentes aos genes *PR*(18) e *RT* (19).

#### 4.3 Subtipo mais frequente

De acordo com a Standford HIV Drug Resistance Database, as 37 sequências analisadas neste estudo 18 (48,6%) referentes ao gene *protease* e 19 (51,4%) referentes ao gene

*transcriptase reversa*, a forma recombinante CRF02\_AG 35 (94,5%), é a mais predominante, seguida pelos subtipos D e G, ambos com frequência de 2,7% cada uma (Tabelas 8 – 26 em Anexos).

#### **4.4 Mutações observadas**

##### **4.4.1 Mutações aos inibidores da protease**

Na população em estudo, 18 sequências da *PR* (100%) submetidas a análise através da Stanford HIV Drug Resistance Database não apresentaram as principais mutações de resistência aos antirretrovirais desta classe. Por sua vez, observou-se uma grande diversidade de mutações secundárias, sendo as mutações K20I, L89M, I13V, H69K (100%); R41K (88,8%), K14R (77,7%), K70R (66,6%) e G17E (55,5%) as mais frequentes (Tabela 6 em Anexos).

##### **4.4.2 Mutações aos Inibidores da Transcriptase Reversa**

###### **4.4.2.1 Mutações aos NRTI**

As principais mutações de resistência aos Inibidores da *Transcriptase Reversa* Não Análogos de nucleosídeos observados foram: K103N (10,5%); E138A, L100I e V90I (5,2%) .

###### **4.4.2.2 Mutações NNRTI**

Relativamente as principais mutações de Resistência aos Inibidores da *Transcriptase Reversa* Análogos de nucleosídeos, observados na população em estudo, destacam-se M184V+T215Y (10,5%), M184IM e K70V as duas com frequência de 5,2%.

Tal como acontece com o gene *protease*, foram igualmente observadas várias outras mutações concernente ao gene *transcriptase reversa*, destacando-se pelas frequências D177E, T200A e S162A (94,7%), Q207E (84,2%), V35T (63,2%); T286A, E291D, Q174K e K173T (52,6%), I293V (47,4%), V245Q, V292I, P294T, E36D e V60I (42,1%), I135V (36,8%); K395R, S322T e Q174E (31,6%); R211K, T403M, A371V, G356K, G335D e D123E (10,5%), seguindo-se uma extensa lista de outras mutações com frequências inferiores a 5% (Tabela 7, em Anexos).

#### 4.4.3 Resistência aos Antirretrovirais

Em relação aos Inibidores da *protease*, não foram observadas resistências fortes e intermedia aos antirretrovirais desta classe, de realçar que 100% dos indivíduos apresentaram baixa resistência ao NFV, e susceptibilidade ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, NFV, SQV/r e TPV/r (Tabela 3).

**Tabela 3- Perfil da resistência aos inibidores da Protease, de acordo com o Stanford HIV Drug Resistance Database (n=18)**

ANTIRETROVIRAIS	F.R	P.R	R.I	P.R	R.B	P.R	S	(%)
<b>ATAZANAVIR/r (ATV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>
<b>DARUNAVIR/r (DRV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>
<b>FOSAMPRENAVIR/r (FPV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>
<b>INDINAVIR/r (IDV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>
<b>LOPINAVER/r (LPV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>
<b>NELFINAVIR (NFV)</b>	--	--	--	--	18	<b>100%</b>	--	--
<b>SAQUINAVIR/r (SQV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>
<b>TIPRANAVER/r (TPV/r)</b>	--	--	--	--	--	--	18	<b>100%</b>

F.R: Forte Resistência; R.I: Resistência Intermedia; R.B: Baixa Resistência; S: Sensível; P.R Prevalência (em %)

Relativamente aos Inibidores de *Transcriptase Reversa* Análogos de Nucleosídeo, tal como se pode observar na Tabela 6, 5,2% das mutações observadas na população induzem baixa resistência ao ABC, 10,5% resistência intermedia ao ABC, AZT e ao D4T; 15,7% forte resistência ao 3TC e ao FTC ao passo que, 84,2% conferem sensibilidade ao 3TC, ABC e DDI; 89,5% ao AZT, D4T e FTC; e 100% ao RPV (Tabela 4).

**Tabela 4- Perfil da resistência aos inibidores da Transcriptase Reversa Análogos ao Nucleosídeo, de acordo com o Stanford HIV Drug Resistance Database. (n=19)**

ANTIRETROVIRAIS	F.R	P.R	R.I	P.R	R.B	P.R	S	P.R
<b>LAMIVUDINE (3TC)</b>	3	<b>15,7%</b>	--	--	--	--	16	<b>84,2%</b>
<b>ABACAVIR (ABC)</b>	--	--	2	<b>10,5%</b>	1	<b>5,2%</b>	16	<b>84,2%</b>
<b>ZIDOVUDINE (AZT)</b>	--	--	2	<b>10,5%</b>	--	--	17	<b>89,5%</b>
<b>STAVUDINE (D4T)</b>	--	--	2	<b>10,5%</b>	--	--	17	<b>89,5%</b>
<b>DIDANOSINE (DDI)</b>	--	--	--	--	3	<b>15,7%</b>	16	<b>84,2%</b>
<b>EMTRICITABINE(FTC)</b>	3	<b>15,7%</b>	--	--	--	--	17	<b>89,5%</b>
<b>TENOFOVIR (TDF)</b>	--	--	--	--	--	--	19	<b>100%</b>

F.R: Forte Resistência; R.I: Resistência Intermedia; R.B: Baixa Resistência; S: Sensível, P.R:Prevalência (em %)

Quanto aos Inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogos de Nucleosídeo, 5,2% das mutações observadas promovem baixa resistência ao ETR, RPV e resistência intermédia ao EFV, ETR e NVP respectivamente, 5,2%, forte resistência a RPV; 10,5% a EFV e NVP; 84,2% são sensíveis a EFV e NVP; 89,5% ao RPV e 94,7% ao ETR (Tabela 5).

**Tabela 5 - Perfil da resistência aos inibidores de Transcriptase Reversa Não Análogos ao Nucleosídeo, de acordo com o Stanford HIV Drug Resistance Database.(n=19)**

ANTIRETROVIRAIS	F.R	P.R	R.I	P.R	R.B	P.R	S	(%)
EFAVIRENZ (EFV)	2	10,5%	1	5,2%	--	--	16	84,2%
ETRAVIRINE (ETR)	--	--	1	5,2%	1	5,2%	18	94,7%
NEVIRAPINE (NVP)	2	10,5%	1	5,2%	--	--	16	84,2%
RILPIVIRINE (RPV)	1	5,2%	--	--	1	5,2%	17	89,5%

F.R: Forte Resistência; R.I: Resistência Intermédia; R.B: Baixa Resistência; S: Sensível; P.R: Prevalência (em %)

## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Na população estudada, relativamente ao gene *protease*, as mutações K20I e L89M destacam-se não só pelas suas frequências (100%), mas também pelo facto da primeira ser referenciada na literatura como sendo responsável pela redução da sensibilidade ao nelfinavir (NFV), facto concordante com nossos resultados uma vez que, 100% dos pacientes se mostraram resistentes a este antirretroviral (Tabela 3).

Por sua vez, L89M é um polimorfismo comum que não é associado a baixa sensibilidade aos Inibidores da *Protease*, sendo considerado como um aminoácido de consenso em muitos subtipos não B do VIH, tendo em atenção que nenhum dos isolados se enquadraram no grupo B do VIH, podemos considerar como sendo igualmente uma concordância aos resultados obtidos [32].

As principais mutações relacionados a resistência aos Inibidores da transcriptase reversa, apesar de se apresentarem com frequências muito baixas na população em estudo, destacam-se K103N (10,5%), mutação responsável por forte resistência ao NVP, facto concordante com os resultados obtidos uma vez que forte resistência a este antirretroviral foi observada exatamente em (10,5%) dos casos (Tabela 7, em Anexos). A mutação L100I (5,2%) induz resistência intermédia ao ETR, NVP e EFV reduzindo

a sensibilidade a estes ARV em cerca de 50 vezes, e forte resistência ao RPV (Tabela 12, em Anexos) [32].

Relativamente as principais mutações de Resistência aos Inibidores da Transcriptase Reversa Análogos aos Nucleotidos, observadas na população em estudo, destacam-se a K70R (66,6%), que se traduz num fenótipo de resistência moderada ao AZT, baixa resistência ao D4T e TDF; as mutações M184V+T215Y (10,5%), a primeira causa resistência de alto nível ao 3TC e FTC e resistência de baixo nível ao DDI e ABC, ao passo que a segunda mutação T215Y, causa resistência intermedia ou de alto nível ao AZT e D4T e resistência de baixo nível ao ABC, DDI e TDF. No entanto, a presença de M184V não impede que se continue o tratamento com 3TC ou FTC, porque apresenta elevada susceptibilidade ao AZT, TDF e D4T, estando clinicamente associados a uma redução significativa da replicação do VIH-1 [32].

Quando M184V e T215Y, ocorrem simultaneamente no mesmo individuo, caso verificado em (10,5%) dos nossos resultados, induz-se um perfil de forte resistência ao 3TC e FTC, resistência intermedia ao ABC, AZT e D4T; e baixa resistência ao DDI (Tabelas 17 e 18) [32].

## **6. PERSPECTIVAS FUTURAS**

Considerando a importância do tema em abordagem, para os Países em vias de desenvolvimento, particularmente para a Guiné-Bissau, anteriormente considerado um país com maior taxa de prevalência do VIH-2, o facto de nos últimos anos se terem verificado mais infeções por VIH-1 em detrimento do VIH-2, é um indício de que provavelmente existam alguns casos de dupla infeção, e a genotipagem pode ser uma alternativa eficaz para se detectar estes casos, e permitiria elaborar esquemas terapêuticos adequados a cada individuo. Consequência óbvia desta prática seria redução das ocorrências de falhas terapêuticas, assim como teria impacto na prevenção de mutações relacionadas com os antirretrovirais.

Por este facto julgamos ser imperioso aprofundar mais os conhecimentos sobre o assunto e assim levar a cabo um trabalho mais amplo cujo impacto poderá ser notável na sociedade.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. *Origins of HIV and the AIDS Pandemic*. **Sharp, P.M., & Hahn, B.M.** 2011, Cold Spring Harb Perspect Med., pp. 1-23.
2. *Impact of Genetic Diversity of HIV-1 on Diagnosis, Antiretroviral Therapy & Vaccine Development*. **Lal, R.B., Chakrabarti, S., & Yang, Chunfu.** 2005, Indian J Med Res, pp. 121,287-314.
3. *AIDS as Zoonosis: Scientific and Public Health Implication*. **Hanh, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M. & Sharp, P.M.** s.l. : Science, 2000, pp. 607-614.
4. *Molecular Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Cloned Directly of Replication-Competent and Defective Viral Genomes*. **Li, Y . Kappes, J.C., Conway, J.A., Price, R.W., SHAW, G.M., & Hahn, B.H.** 1991, J. Virol, pp. 8(65). 3973-3985.
5. *Adaptation of HIV-1 to Its Human Host*. **Wain, L.V., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Decker, J.M., Keele, B.F., Heuverswyn, F.V., Li, Y. Takehisa, J., Ngole, E. M., Shaw, G.M., Peeters, M., Hahn, B.H., & Sharp P.M.** 2007, Mol Biol Evol., pp. 24(8), 1853-1860.
6. *Genetic Characterization of New African Simian Immunodeficiency Virus SIVsm: Geographic Clustering of Household - Derived SIV Strains with Human Immunodeficiency Virus Type2 Subtypes and Genetically Diverse Viruses from a Single Feral Sooty Mangabey Troop*. **Chen, Z., Telfer, P., Gettie, A., Reed, P., Zhang, L., Ho, D.D., & Marx, P.A.** 1996, J. Virol., pp. 6(70): 3617-3627.
7. *Association of Soluble CD14 and Inflammatory Biomarkers With HIV-2 Disease Progression*. **Thiébaud, R., Charpentier, C., Damond, F., Taieb, A., Antonie, R., Capeau, J., Chêne, G., Collin, G., Matheron, S., Descamps, D., & Brun-Vézinet, F.** 2012, HIV/AIDS, pp. 55,1417-1425.
8. *Origins And Evolution of AIDS Viruses: Estimating The Time-Escale*. **Sharp, P.M., Bailes, E., Gao, F., Beer, B.E., Hisch, V.M., & Hahn, B.H.** 2000, Biochemical Society, pp. 24,946-950.
9. *Recombination Increases Human Immunodeficiency Virus Fitness, but nor Necessary Diversity*. **Vijay, N.N.V., Vasantika., Ajmani, R., Perelson, A.S., & Dixit, N.M.** 2008, J Gen Virol, pp. 89,1467-1477.
10. *Phyldynamic profile of HIV-1 Subtype B, CRF01\_AE and the Recently Emerging CRF51\_01B among Men Who Have Sex with Men (MSM) in Singapore*. **Ng, K.T., Ng, K.Y., Khong, W.X., Chew, K.K., Singh, P.K., Yap, J.K., Tan, M.T., Leo. Y.S.,**

- Laeyendecker, O., Quinn, T.C., Kamarulzaman, A., Tee, K.K., & Ng O.T.** 2013, Plos One, pp. 8(12):1-6.
11. *Dearth of full-length HIV-1 Sequences Obscures the True HIV-1 Genetic Subtypes Distribution in SubSaharan Africa.* **Pondei, K., Abdu, A., & Orutugu, L.** 2014, Afr. J. Biotechnol., pp. 13 (21):2166-2174.
12. *High Diversity of HIV-1 Subtype F Strains in Central Africa.* **Triques, K., Bourgeois, A., Saragosti, S., Vidal, N., Ngole, E.M., Nzilambi, N., Apetrei, C., Ekwalinga, M., Delaporte, E., & Peeters, M.** 1999, Virol, pp. 259,99-109.
13. *Update on HIV-1 Diversity in Africa: A Decade in Review.* **Lihana, R.W., Ssemwanga, D., Abimiku, A., & Ndembi, Nicaise.** 2012, AIDS, pp. 14, 83-100.
14. *Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains.* **Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S., & Bhattacharya, T.** 2000, Science, pp. 288, 1788-1796.
15. *Origin of HIV-1 in the Chimpanzee *Pan Troglodytes troglodytes*.* **Gao, F., Balles, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., & Hahn, B.H.** 1999, Nature, pp. 397,436-441.
16. *HIV-1 Molecular Epidemiology in Guinea-Bissau, West Africa: Origin, Demography and Migrations.* **Esbjornsson, J., Mild, M., Mansson, F., Norrgren, N., & Medstrand, P.** 2011, Plos One, pp. 2 (6):1-12.
17. *Changes in Prevalence and incidence of HIV-1, HIV-2 and dual infections in Urban Areas of Bissau, Guinea-Bissau: Is HIV-2 Disappearing?* **Da Silva, Z.J., Oliveira, I., Anderson, A., Dias, F., Rodrigues, A., Holmgren, B., Anderson, S., & Aaby, P.** 2008, AIDS, pp. 10(22):1195-1202.
18. *Declining HIV-2 Prevalence and Incidence Among Mem in a Community Study from Guinea-Bissau.* **Larsen, O., Da Silva, Z., Sandstrom, A., Andersen, P.K., Andersson, S., Poulsen, AG., Melbye, M., Dias F., Nauc ler, A., & Aaby, P.** 1998, AIDS, pp. 13(12): 1707-1714.
19. *HIV-1 Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle.* **Freed, E.O.** 1998, Virol., pp. 251, 1-15.
20. *Mechanism of Action of Regulatory Proteins Encoded by Complex Retroviruses.* **Cullen, B. R.** 1992, Microbiol. Rev., pp. 3(56): 375-394.
21. *Early steps of Retrovirus Replicative Cycle.* **Nisole, S., & Saib, A.** 2004, Retrovirol., pp. 1, 1-20.

22. *The HIV Coreceptor Switch: a Population Dynamical Perspective*. **Regoes, R.R., & Bonhoeffer, S.** 2006, Trends in Microbiol., pp. 6(13): 269-277.
23. *HIV-1 Integrase Forms Stable Tetramers and Associates with LEDGF/p75 Protein in Human Cells*. **Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, P., Beeumen, J.V., Engelborghs, Y., De Clercq, E., & Debyser, Z.** 2003, J.Biol.Chem, pp. 1(278): 372-381.
24. *An Old Target Revisited: Two New Privileged Skeletons and an Unexpected Binding Mode For HIV-Protease Inhibitor*. **Specker, E. Bottcher, J. Lilie, H., Heine, A., Schoop, A., Muller, Griebenow, N., & Klebe, G.** 2005, Angew.Chem., pp. 44, 3140-3144.
25. *Rapid Diversity-Oriented Synthesis in Microtiter Plates for In Situ Screening of HIV Protease Inhibitors*. **Brik, A., Muldoon, J., Lin, YC., Elder, J.H., Goodsel, D.S., Olson, A.J., Fokin, V.V., Sharpless, K.B., & Wong, H.** 2003, ChemBioChem, pp. 4, 1246-1248.
26. *Broad Antiretroviral Activity and Resistance Profile of the Novel Human Immunodeficiency Virus Integrase Inhibitor Elvitegravir (JTK-303/GS-9137)*. **Shimura, K., Kodama, E., Sakagami, Y., Matsuzaki, Y., Watanabe, W., Yamataka, K., Watanabe, Y., Ohata, Y., Doi, S., Sato, M., Kano, M., Ikeda, S., & Matsuoka, M.** 2008, J. Virol., pp. 2(82): 764-774.
27. *A New Generation of Peptide-based Inhibitors Targeting HIV-1 Reverse Transcriptase Conformational Flexibility*. **Agopian, A., Gros, E., Adrian-Herrada, G., Bosquet, N., Clayette, P., & Divita G.** 2008, J. Biol. Chem., pp. 1(284): 254-264.
28. *Biochemical and Immunological analysis of Human Immunodeficiency Virus gag Gene Products p17 and p24*. **Veronese, F.DM., Copeland, T.D., Oroszlan, S., Gallo, R.C., & Sarngadharan, M.G. (1988).** 1988, J. Virol., pp. 3(62): 795-801.
29. *Reverse Transcriptase of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Functionality of Subunits of the Heterodimer in DNA Synthesis*. **Hostomsky, Z., Hostomska, Z., Fu, TB., & Taylor, J.** 1992, J. Virol., pp. 5(66): 3179-3182.
30. *HIV-1 Antiretroviral Resistance Scientific Principles and Clinical Applications*. **Tang, M.W., & Shafer, R.W.** 2012, Drugs, pp. 9(72):1-25.
31. *Organization of Immature Human Immunodeficiency Virus Type 1*. **Wilk, T., Gross, I., Gowen, B.E., Rutten, T. De Haas, F., Welker, R., Krausslich, HG., Boulanger, P., & Fuller, S.** 2001, J. Virol., pp. 2 (75): 59 - 771.
32. <http://www.hivdb.stanford.edu/>

## 8. ANEXO

Tabela 7 - Prevalência das mutações para a *Protease* N=18

MUTAÇÕES	N	%
E36D	2	10.5
D123E	5	26.3
S162A	18	94.7
Q174E	6	31.6
D177E	18	94.7
T200A	18	94.7
Q207E	16	84.2
V245Q	8	42.1
K277R	2	10.5
T286A	10	52.6
E291D	10	52.6
V292I	8	42.1
I293V	9	47.4
P294T	8	42.1
E312D	2	10.5
E138A	1	5.2
V35T	12	63.2
K49R	3	15.7
V60I	8	42.1
S68G	2	10.5
K122Q	1	5.2
I135V	7	36.8
E169A	3	15.7
K173T	10	52.6
I178M	3	15.7
G196E	3	15.7
K311R	1	5.2
V314E	1	5.2
S322T	6	31.6
G335D	5	26.3
R356K	5	26.3
M357R	2	10.5
G359S	5	26.3
K366R	2	10.5
A371V	5	26.3
I375V	3	15.7
T377L	1	5.2
K390R	6	31.6
K395R	2	10.5
T403M	5	26.3
E432D	3	15.7
I434M	1	5.2

Tabela 6- Prevalência das mutações para a *Transcriptase Reversa* N=19

Mutações	N	%	Mutações	N	%	Mutações	N	%	Mutações	N	%
K20I	18	100	F214L	1	5.2	I135L	1	5.2	I135IV	1	5.2
L10IL	1	5.5	K70V	1	5.2	M184IM	1	5.2	E204EK	1	5.2
L63LP	1	5.5	6I	2	10.5	T27S	1	5.2	K137T	1	5.2
I13V	18	100	T39LS	3	15.7	E36D	8	42.1	I202V	1	5.2
K14R	14	77.7	K49T	1	5.2	K102Q	1	5.2	V245E	1	5.2
L19P	2	11.1	I50L	1	5.2	I135T	2	10.5	A272AP	1	5.2
M36I	18	100	G51X	1	5.2	I178MV	1	5.2	L295M	1	5.2
R41K	16	88.8	P52X	1	5.2	G196EG	1	5.2	T377I	1	5.2
H69K	18	100	N54S	1	5.2	Q197H	1	5.2	K43R	1	5.2
K70R	12	66.6	N57H	1	5.2	E204Q	1	5.2	T139V	1	5.2
L89M	18	100	T58I	1	5.2	R206GR	1	5.2	E248D	1	5.2
G17E	10	55.5	V60L	1	5.2	E169Q	1	5.2	S251T	1	5.2
L63P	1	5.5	K64*	1	5.2	Q174N	1	5.2	K281R	1	5.2
V75I	1	5.5	S68N	1	5.2	Q207K	1	5.2	E297Q	1	5.2
I64M	2	11.1	D76Y	1	5.2	R211Q	1	5.2	Q334H	1	5.2
G16E	2	11.1	R78T	1	5.2	P243T	1	5.2	Y339W	1	5.2
E35D	2	11.1	N81T	1	5.2	V245H	1	5.2	A376S	1	5.2
L63A	1	5.5	K82X	1	5.2	A272S	1	5.2	K102E	1	5.2
L19IL	1	5.5	E89D	1	5.2	T369A	1	5.2	K173M	1	5.2
N37S	1	5.5	A158S	3	15.7	I375A	2	10.5	G231X	1	5.2
R41KR	1	5.5	K173I	1	5.2	A400AT	1	5.2			
K70KR	1	5.5	P176S	1	5.2	T403MT	1	5.2			
I64IM	1	5.5	L100I	1	5.2	I411X	1	5.2			
T4P	1	5.5	K49KR	2	10.5	M357K	3	15.7			
R8P	1	5.5	G99X	1	5.2	E36DE	1	5.2			
Q92X	1	5.5	D121Y	1	5.2	E40D	1	5.2			
E34Q	1	5.5	K122E	3	15.7	K122EK	1	5.2			
P39L	1	5.5	I135M	1	5.2	P294A	1	5.2			
I72R	1	5.5	R143X	1	5.2	I326V	3	15.7			
N37DN	1	5.5	E169K	2	10.5	M184V,T215Y	2	10.5			
K20R	1	5.2	I178L	2	10.5	K166Q	2	10.5			
K104R	1	5.2	E204K	1	5.2	N175Y	2	10.5			
Q174K	10	52.6	Q207G	1	5.2	K73Q	1	5.2			
T200E	1	5.2	K101Q	1	5.2	Q174A	1	5.2			
E203Q	1	5.2	S105W	1	5.2	A272P	2	10.5			
Q207D	1	5.2	I167N	1	5.2	E399D	2	10.5			
R211K	5	26.3	K173R	1	5.2	D250E	1	5.2			
			T200E	1	5.2	V435L	1	5.2			
			E204D	2	10.5	K103N	2	10.5			
			R211S	2	10.5	E79X	1	5.2			
			K219X	1	5.2	D121H	1	5.2			
			K220*	1	5.2	V35R	1	5.2			

**Tabela 8 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 1 (PR1-RT21) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (97,3%)</b>	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, R41K, I64M, H69K, K70R e L89M.	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, SQV/r e TPV/r Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
<b>RT:G (94,3%)</b>	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	K20R, V60I, K104R, D123E, G231X, K173T, Q174K, D177E, E203Q, G196E, T200E, Q207D, R211K, e F214L	Sensível a D4T 3TC, ABC, AZT, DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 9 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 2 (PR2-RT22) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF_AG (96,6%)</b>	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, R41K, L63P, H69K, K70R, L89M.	Sensível ao ATV/r, K14R, G17E, M36I, R41K, L63P, H69K, K70R, V75I e L89M. Potencial Baixo nível de resistência ao NFV	
<b>RT:CRF02_AG (94,5%)</b>	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	---	E138A	V35T, K49R, V60I, S68G, G359S, K366R, K122Q, I135V, S162A, S322TA371V, K395E, 169A, K173T, Q174E, G335D, I375V, T403M, D177E, I178M, G196E, R356K, I434M, T403M, T200A, E204K, Q207E, M375R, T377L, V245Q, T286, E291D, V292I, T403M, K390R, I293V, P294T, K311R, V314E, E432D	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV e NVP. Baixo nível de resistência ao ETR. Potencial baixo nível de Resistência ao RPV

**Tabela 10 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 3 (PR3-RT23) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (97,3%)</b>	---	K20I	I13V, K14R, L19P, M36I, R41K, H69K, K70R, L89M	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, IDV/r, LPV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial Baixo nível de resistência ao NFV.	
<b>RT:CRF02_AG (94,9%)</b>	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	E36D, D123E, S162A, T200A, Q174E, D177E, Q207E, V245Q, K277R, V292I, T286A, E291D, P294T, E312D.	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV.

**Tabela 11 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 4 (PR4-RT24) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (98,3%)</b>	---	K20I	I13V, K14R, G16E, E35D, M36I, R41K, H69K e L89M	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
<b>RT:CRF02_AG (92,7%)</b>	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	K70V	V90I	V35T, E36D, T39LS, K49T, I50L, G51X, P52X, N54S, N57H, T58I, V60I, K64*, S68N, D76Y, R78T, N81T, K82X, E89D, A158S, S162A, K173I, Q174K, P176S, D177E, T200A, Q207E e R211K	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 12 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 5 (PR5-RT25) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (94,9%)</b>	---	L101L e K20I	I13V, R41K, H69K e L89M L19P, L63A, M36I,	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (92,7%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	---	L100I	V35T, E36D, K49KR, E204K, V60I, G99X, D121Y, K122E, I135M, R143X, S162A, E169K, Q174E, D177E, T2000A, Q207G	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T, DDI FTC e TDF	Resistência Intermedia ao EFV, ETR e NVP Elevado grau de resistência ao RPV

**Tabela 13 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 6 (PR6-RT26) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (96,3%)</b>	---	K20I	I13V, L19IL, I64M, L89M, H69K M36I, N37S e R41KR	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (90,9%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	---	---	K101Q, S105W, I135L, K173R, Q174K, D177E, Y188X, T200A, E204D, Q207E, R211S, K219X, K220	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 14 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 7 (PR7-RT27) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (97,0%)</b>	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, R41K, H69K, K70KR, L63LP e L89M	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (92,7%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	M184IM	--	T27S, V35T, E36DE, V60I, S68G, K102Q, I135T, S162A, K173T, Q174K, D177E, Q207E, I178MV, G196EG, Q197H, T200A, E204Q, R206GR, R211K	Sensível ao AZT, D4T e TDF. Potencial baixo nível de resistência a DDI. Elevado grau de resistência ao 3TC e FTC	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 15 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 8 (PR8-RT28) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
<b>PR:CRF02_AG (97,3%)</b>	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, R41K, H69K, K70R e L89M	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (94,5%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	M184V, T215Y	--	V35T, E36D, V60I, I135V, A158S, S162A, K166Q, E169A, K173T, Q174K, N175Y, D177E, G196E, T200A, Q207E	Sensível ao TDF Resistência Intermedia a ABC, AZT, D4T Resistência de alto nível ao 3TC e FTC Resistência de baixo nível ao DDI	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 16- Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 9 (PR9-RT29) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
PR:CRF02_AG (97,3%)	---	K20I	I13V, K14R, G17E, E35D, M36I, R41K, H69K, K70R e L89M	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV.	
RT:CRF02_AG (94,5%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
		V90I	V35T,S162A,E169Q, K173T, A400AT, Q174N, D177E, I178M, T200A, Q207K, R211Q, P243T, V245H, A272S, T286A, E291D, V292I,I411X, I293V, P294T, S322T, G335D,T403MT, R356K, M357K, G359S, T369A, A371V, I375A, K390R, K395R, E432D	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 17 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 10 (PR10-RT30) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
PR:CRF02_AG (97,0%)	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, R41K, H69K, K70R e L89M	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (95,6%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IPR	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	V35T, E36D, E40D, K49KR, K122EK, I135V, S162A, K173T, Q174K, D177E, T200A, Q207E, R211K, V245Q, T286A, E291D, I293V, P294A, S322T, I326V.	Sensível ao 3TC, ABC, AZT, D4T, DDI, FTC e TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 18 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 11 (PR11-RT31) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
PR:CRF02_AG (96,6%)	---	K20I	I13V, K14R, G17E, K70R, L89M, M36I, R41K, I64IM e H69K	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (94,0%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	M184V,T215Y	--	V35T, E36D, V60I, I135V T200A, Q207E A158S,S162A,K166Q, E169A,K173T,Q174K, N175Y,D177E,G196E,	Sensível ao TDF	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV Resistência Intermedia ao ABC,AZT,D4T, Resistência de alto nível ao 3TC e FTC, Resistência de baixo nível ao DDI.

**Tabela 19 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 12 (PR12-RT32) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras		
PR:CRF02_AG (94,8%)	---	K20I	T4P, R8P, I13V, K14R, G17E, L89M, M36I, R41K, H69K, K70R e Q92X	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (93,8%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	E312D, K73Q, D123E, S162A, Q174E, D177E, T200A, Q207E, V245Q, K277R, T286A, E291D, V292I, I293V e P294T	Sensível ao TDF ABC, AZT, D4T 3TC, FTC e DDI	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 20 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 13 (PR13-RT33) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
PR:CRF02_AG (96,0%)	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, R41K, H69K, K70R e L89M		
RT:CRF02_AG (93,8%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	K102E, K122E, I135V, S162A, K173M, Q174K, D177E, T200A, E204D, Q207E, R211S e G231X	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T, 3TC, FTC e DDI	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 21 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 14 (PR14-RT34) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
PR:CRF02_AG (98,0%)	---	K20I	I13V, K14R, M36I, R41K, H69K, K70R e L89M		
RT:CRF02_AG (94,1%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	V35T, E36D, T39LS, V60I, A371V, D123E, I135V, S162A, K173T, I375V, Q174A, D177E, T200A, Q207E, V390R, V245Q, A272P, T286A, E291D, E399D, V292I, I293V, P294T, S322T, I326V, G335D, R356K, M357K, G366R, T403M.	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T, 3TC, FTC e DDI.	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV.

**Tabela 22 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 15 (PR15-RT35) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
PR:CRF02_AG (96,6%)	---	K20I	I13V, G16E, E34Q, M36I, P39L, R41K, H69K, I72R e L89M		
RT:CRF02_AG (95,8%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	V35T, D123E, I135V, S162A, K173T, Q174K, D177E, T200A, Q207E, A371V, I375V, K390R, E399D, T40M, V435L, R211K, V245Q, D250E, T286A, E432D, E291D, V292I, I293V, P294T, S322T, I326V, G335D, R356K, M357K, G359S	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T, 3TC, FTC e DDI	Sensível ao EFV, ETR, NVP e RPV

**Tabela 23 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 16 (PR16-RT36) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r. Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
PR:CRF02_AG (98,0%)	---	K20I	I13V, K14R, M36I, R41K, H69K, K70R e L89M		
RT:CRF02_AG (93,1%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	K103N	V35T, E36D, T39LS, V60I, E79X, D121H, K122E, S162A, Q174E, D177E, I178L, T200A, Q207E	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T, 3TC, FTC e DDI	Sensível ao ETR e RPV. Resistência de alto nível ao EFV e NVP

**Tabela 24 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 17 (PR17-RT37) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r.	
PR:CRF02_AG (96,3%)	---	K20I	I13V, K14R, G17E, M36I, N37DN, R41K, H69K, K70R e L89M	Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (94,0%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	V35R, E36D, K49R, V135IV, S162A, E169K, K173T, Q174E, D177E, I178M, T200A, Q207E, V245Q, T286A, E291D, V292I e P294T.	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T 3TC, FTC e DDI	Sensível ao ETR, EFV e NVP

**Tabela 25 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 18 (PR18-RT38) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IPR			Sensibilidade aos ARV IPR	
	Major	Minor	Outras	Sensível ao ATV/r, DRV/r, FPV/r, LPV/r, IDV/r, SQV/r e TPV/r.	
PR:CRF02_AG (97,3%)	---	K20I	I13V, M36I, R41K, H69K e L89M	Potencial baixo nível de resistência ao NFV	
RT:CRF02_AG (95,7%)	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
	--	--	V35T, E36D, S162A, K173T, Q174K, D177E, T200A, I202V, Q207E, T377I, V245E, A272AP, T286A, E291D, K390R, V292I, I293V, P294T, L295M, S322T, G335D, R356K, M357R, G359S, I375A, T403M.	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T 3TC, FTC e DDI	Sensível ao ETR, RPV, EFV e NVP

**Tabela 26 - Prevalência de mutações relacionadas ao paciente nº 19 (RT39) referentes aos genes PR e RT.**

Subtipo de VIH e Similaridade c/ HXB2%	Mutações IRT			Sensibilidade aos ARV IRT	
	NRTI	NNRTI	Outras	NRTI	NNRTI
RT:D (93,0%)	--	K103N	K43R, K49R, V60I, D123E, I135, T139V, S162A, K173T, Q174K, D177E, T200A, Q207E, R211K, F214L, V245Q, E248D, S251T, A272P, K281R, T286A, I293V, E297Q, Q334H, Y339W, A376S, K390R, T403M.	Sensível ao TDF, ABC, AZT, D4T, 3TC, FTC e DDI.	Sensível ao ETR, RPV, EFV e NVP.