

**Universidade Federal de São Paulo**

**“AVALIAÇÃO CLONAL DAS VIAS MUTACIONAIS DO HIV-1  
PARA RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS”**

**Erika Etsuko Fusuma**

**São Paulo**

**2009**

**Erika Etsuko Fusuma**

**“AVALIAÇÃO CLONAL DAS VIAS MUTACIONAIS DO HIV-1  
PARA RESISTÊNCIA AOS ANTIRRETROVIRAIS”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**São Paulo**

**2009**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz**

Professor Adjunto da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Chefe do Laboratório de Retrovirologia da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP.

**Co-Orientadores:**

**Prof. Dr. Elcio de Souza Leal**

**Profa. Dra. Shirley C. Vasconcelos Komninakis**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Retrovirologia da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP/EPM) e foi possível graças ao auxílio financeiro fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa em São Paulo (FAPESP) e à Unidade de Laboratório (ULAB) do Programa Nacional de DST e Aids do Ministério da Saúde que através da RENAGENO proporcionou o material biológico necessário para este estudo.

**São Paulo**

**2009**

FUSUMA, Erika Etsuko

**Avaliação clonal das vias mutacionais do HIV-1 para resistência aos antirretrovirais**

Erika Etsuko Fusuma – São Paulo, 2009

vii, 73f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.  
Escola Paulista de Medicina.

Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Doenças  
Infecciosas e Parasitárias

Título em Inglês: **Clonal evaluation of HIV-1 mutational pathways for antiretroviral resistance**

1. HIV-1    2. TAM    3. Resistência antirretroviral    4. Avaliação clonal

Dedico esta tese aos meus pais, e irmãos por me acompanhar e apoiar em todos os momentos da minha vida,

À minha nova família do templo,

E carinhosamente ao meu marido, que me ensina a ser feliz de todas as maneiras.

---

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Diaz, pela orientação e incentivo, que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao co-orientador Elcio, pelo auxílio científico, paciência, preocupação e dedicação ao nosso trabalho.

À Shirley, co-orientadora que confiou no meu trabalho, e me ensinou a crescer.

À amiga Dani, eterna companheira, por me ajudar de todas as formas sempre, seja na bancada, nas imprescindíveis dicas e conselhos, ou apenas conversando.

Às amigas Mariana e Maria Clara, que fizeram meus dias mais felizes. E à Michelle Zanoni que me divertiu tanto com seu jeito especial.

Aos colegas do Laboratório de Retrovirologia e Imunologia: Cecília, Mario, Ju Galinskas, Beth, Michelle Pink, Ari, Jean, Celina, Rafa, Carol, Wagner, Carla, Camila, Michel, Juliana Guinoza, Juliana Peixoto, Mara, Alexandre, pela companhia.

Ao Charlys, “faz-tudo” pela disposição em ajudar em todos os momentos.

Aos colegas da época da iniciação científica que me ensinaram as técnicas de bancada e me incentivaram a chegar até aqui: Luciana, Patrícia, Dercy, Sandra, Giana, Gedson, Vivian, Fabio, Marcos, Wilson...

À minha família, que nos unimos mais nestes últimos anos.

À minha família do templo por me aceitar e apoiar.

E especialmente ao meu marido, com quem compartilho prazerosamente a minha vida.

---

## SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b> .....	i
<b>Agradecimentos</b> .....	ii
<b>Sumário</b> .....	iii
<b>Lista de Figuras e Tabelas</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	v
<b>Abstract</b> .....	vii
<b>Introdução</b> .....	01
1.1. Histórico.....	02
1.2. História natural da infecção pelo HIV-1.....	04
1.3. A partícula viral.....	05
1.4. Organização genômica do HIV-1.....	06
1.5. Ciclo replicativo do HIV-1.....	10
1.6. Variabilidade genética.....	12
1.7. Medicamentos antirretrovirais.....	13
1.8. Resistência viral aos medicamentos.....	17
1.9. <i>Fitness</i> viral.....	19
1.10. Testes de determinação de resistência do HIV-1 aos ARV.....	20
1.11. Tipos de resistência aos ARV.....	22
1.12. Mecanismo de resistência aos ARV.....	23
1.13. Falha terapêutica.....	27
1.14. Barreira genética para resistência aos ARV.....	29
1.15. “Vias mutacionais” para seleção de resistência.....	30
<b>Objetivo</b> .....	34
<b>Casuística e métodos</b> .....	36
3.1. Amostras.....	37
3.2. Extração.....	38
3.3. Transcrição reversa.....	38
3.4. Amplificação de ácidos nucléicos por diluição limitante.....	38
3.5. Fracionamento eletroforético do DNA amplificado.....	42
3.6. Purificação.....	42
3.7. Sequenciamento.....	42
3.8. Análise das sequências.....	43
<b>Resultados</b> .....	44
4.1. Obtenção e sequenciamento dos clones.....	45
4.2. Resultados dos clones dos pacientes analisados.....	49
<b>Discussão</b> .....	54
<b>Conclusão</b> .....	62
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	64

---

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Organização genômica do HIV-1.....	09
<b>Figura 2.</b> Ciclo replicativo do HIV-1.....	11
<b>Figura 3.</b> Etapas-alvo para o bloqueio da replicação viral.....	14
<b>Figura 4.</b> Localização das mutações de resistência no genoma do HIV-1.....	28
<b>Figura 5.</b> Mutações na protease associadas a resistência ao NFV.....	31
<b>Figura 6.</b> Mutações na transcriptase reversa associadas a resistência ao AZT.....	32
<b>Figura 7.</b> Reconstrução Filogenética do gene <i>pol</i> .....	48
<b>Tabela 1.</b> Freqüência das mutações na protease estratificadas pela distribuição do subtipo.....	45
<b>Tabela 2.</b> Número de sequências que apresentaram 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou nenhuma TAM.....	46
<b>Tabela 3.</b> Mutações apresentadas pela análise populacional.....	46
<b>Tabela 4.</b> Distribuição clonal da protease dos seis pacientes analisados.....	50
<b>Tabela 5.</b> Distribuição clonal dos cinco pacientes analisados para a presença das TAM.....	53



---

## RESUMO

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), infecta principalmente o linfócito T CD4+, uma importante célula do sistema imunológico, levando a uma imunossupressão progressiva.

Os medicamentos antirretrovirais (ARV) são capazes de reduzir a replicação viral e, com isso, retardar a progressão da doença e a mortalidade, aumentando, desta forma, a sobrevivência dos pacientes.

Para muitos pacientes infectados com o HIV-1, a administração de combinações de medicamentos ARV, terapia antirretroviral altamente efetiva (HAART), tem êxito em suprimir a replicação viral e reverter a evolução da doença. Em alguns pacientes, entretanto, o efeito supressor da HAART é incompleto, o que geralmente leva à seleção de variantes virais com resistência aos agentes ARV.

De acordo com a pressão seletiva exercida por um medicamento, o vírus pode desenvolver algumas mutações específicas, seguindo o que chamamos de “vias” ou “caminhos mutacionais” distintos.

Variantes virais contendo mutações para mais de uma “via mutacional” concomitantemente são raramente observadas *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que a co-ocorrência destas mutações num mesmo genoma não seja favorável ao HIV-1 (correlação negativa).

A análise genotípica padrão comumente utilizada consiste na análise populacional das variantes virais, onde a sequência observada representa um consenso das diversas populações virais presentes naquele indivíduo. Para distinguirmos as populações observadas pela análise populacional fizemos uso da análise clonal pela técnica de diluição limitante, onde é possível observar as mutações presentes num único genoma.

Neste estudo, detectamos, em dois pacientes, clones contendo as mutações D30N e L90M na mesma molécula do genoma viral; essas mutações também estavam acompanhadas de outras mutações compensatórias, como a N88D e a L63P. Outra observação foi a confirmação da alta correlação da mutação N88D com a mutação D30N.

Investigamos também a possibilidade da presença concomitante das mutações de resistência aos análogos timidínicos (TAM). Dentre os quatro pacientes, detectados

pela a análise populacional, que apresentavam as seis mutações das TAM, todos apresentaram estas mesmas mutações na análise clonal. Com o acúmulo das mutações de resistência aos análogos timidínicos (TAM), também observamos aumento no número e complexidade das mutações acessórias. A uniformidade e predominância dos clones em alguns pacientes sugerem que, no momento da análise clonal, amplificamos a população que foi selecionada e expandiu-se, tornando-se majoritária.

Portanto, observamos que a ocorrência concomitante das mutações de vias distintas, ou seja, D30N + L90M na protease, e as seis mutações da TAM na transcriptase reversa, ainda que rara, pode ser observada em uma mesma molécula genômica de isolados da população viral intrapaciente.

Em adição, esses isolados com mutações pertencentes a múltiplas vias, são preferencialmente selecionados após terapia antirretroviral prolongada, onde os pacientes são tratados com diferentes medicamentos antivirais.

Concluimos também que, na análise populacional padrão, a sequência obtida corresponde à combinação de genomas de variantes presentes na população viral de um indivíduo. Essa sequência pode representar a população viral majoritária presente naquele momento, ou uma mistura de diversas sub-populações minoritárias, que se dividem em pequenos grupos na análise clonal.

---

## **ABSTRACT**

For many patients infected with HIV-1, administration of combinative ARV drugs, often referred as highly active antiretroviral therapy (HAART) is succeeded by suppressing of detectable virus replication and, therefore, by reducing HIV-related morbidity and mortality. In some patients, however, the HAART suppressive effect is incomplete, which usually leads to selection of antiretroviral resistant viral variants.

According to drug selective pressure, HIV-1 can develop specific mutations, leading to distinct mutational pathways. Species containing mutations from more than one mutational pathway are extremely rare, suggesting that the coexistence of these mutations in the same genome structure results in unfavorable virological effects (negative correlation). To distinguish populations previously observed in standard population analysis, clonal analysis by limited dilutions technique was used, permitting observation of present mutations in single genome copy.

In the present study, we have observed that, though rare, mutations from distinct pathways can occur concomitantly in same genome molecule from inpatient viral isolates population. In addition, viral isolates with mutations from multiple pathways are preferentially selected after prolonged antiretroviral therapy, when patients are treated with different antiviral drugs.

It has been also concluded that sequences obtained from standard population analysis, corresponded to a combination of genomes from variants present in individual viral population. These consensus sequences can represent the major viral population present in that moment, or a mixture of diverse minor sub-populations, that are shared in small groups in clonal analysis.



## 1.1. Histórico

Em 1983, foi isolado um retrovírus a partir de células de um paciente com linfadenopatia por Barre-Sinoussi, Chermann e Montagnier (BARRE-SINOUSSE *et al.*, 1983). Este retrovírus, da subfamília *lentivirinae* após receber uma série de denominações diferentes, recebeu o nome de Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês, “*Human Immunodeficiency Virus*” – HIV) (COFFIN *et al.*, 1986) e apontado como responsável pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (no inglês, AIDS). As características estruturais e propriedades biológicas classificaram estas partículas virais isoladas de pacientes com AIDS como membros de um subgrupo distinto no grupo dos retrovírus – o subgrupo dos lentivírus – os quais estão associados a infecções persistentes com longos períodos de latência clínica (GELDERBLOM *et al.*, 1989).

Em 1986, descobriu-se que a AIDS poderia estar relacionada a mais de um tipo de HIV, onde o primeiro isolado passou a se chamar Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1), e o segundo, HIV tipo 2 (HIV-2). A disseminação da epidemia da AIDS tem como principal responsável o HIV-1, enquanto que o HIV-2 está restrito a algumas áreas geográficas ou casos isolados em regiões específicas (CLAVEL *et al.*, 1986; PIENIAZEK *et al.*, 1991).

A pandemia do HIV-1 é resultante da transmissão deste retrovírus entre espécies, mais provavelmente oriundo do chimpanzé, sendo, portanto uma infecção zoonótica. Durante a expansão entre os humanos desenvolveu-se um grau extraordinário de diversidade genética do HIV-1 que se dividiu em 3 grupos M, N e O. Os vírus do grupo M perfazem a vasta maioria das infecções pelo HIV-1 que se subdividem em 9 subtipos e diversas formas recombinantes circulantes (CRFs) (ROBERTSON *et al.*, 2000) heterogeneamente distribuídos pelo mundo.

Os subtipos do HIV-1 diferem um do outro cerca de 10-12% dos seus nucleotídeos e 5-6% dos aminoácidos da protease e transcriptase reversa (GONZALES *et al.*, 2001).

O primeiro caso de AIDS no Brasil ocorreu em meados de 1980. Desde então, exhibe uma heterogênea distribuição dos subtipos do HIV-1.

Segundo as estimativas da UNAIDS/WHO no final de 2007, em todo o mundo há cerca de 33,2 milhões de adultos, e 290 mil crianças infectadas pelo mundo. No Brasil estima-se que existam mais de 620 mil pessoas vivendo com o vírus (em 2005), e mais

de 11 mil pessoas morreram com doenças relacionadas à AIDS em 2003.

## 1.2. História Natural da Infecção pelo HIV-1

O HIV-1 infecta preferencialmente os linfócitos T CD4 positivos. Na fase aguda, cerca de 4 a 8 semanas após a infecção, observa-se uma queda na contagem dos linfócitos T CD4+, aumento de linfócitos T CD8+ (resposta CTL) e um pico de produção viral (carga viral plasmática). Após este período, ocorre a soroconversão, ou seja, anticorpos específicos são produzidos pelo hospedeiro direcionados principalmente contra o envelope viral, que podem ser detectados por meio de testes imunoenzimáticos (ELISA).

Aproximadamente após o segundo mês de infecção, devido ao estabelecimento da resposta imune ativa, ocorre uma queda significativa nos níveis de carga viral, mantendo-se em níveis estáveis durante um período de tempo que pode variar desde alguns meses até vários anos. Este é o período assintomático (ou de latência clínica), durante o qual a contagem de células T CD4+ também se mantém estável com tendência à queda. Durante todo o período assintomático, o organismo do indivíduo portador do vírus mantém um equilíbrio dinâmico entre a resposta imune ao patógeno e a proliferação do mesmo nas células T. O período assintomático encerra-se com a diminuição da resposta CTL, até cair abruptamente iniciando assim o período sintomático, onde se observa a instalação das chamadas doenças oportunistas, caracterizando um quadro clínico da AIDS propriamente dita.

### 1.3. A partícula viral

O HIV é um vírus envelopado. O envelope é a porção mais externa da partícula infectante (vírion), que é formada por uma bicamada fosfolipídica de origem celular obtida da membrana citoplasmática da célula infectada no momento do brotamento da partícula. Nesta camada lipoprotéica estão inseridas as glicoproteínas de origem viral gp120 (externa) e gp41 (transmembrana) (CHATTERJEE *et al.*, 1992). As moléculas da proteína p17 formam a matriz, que é responsável por manter a estrutura viral (CHATTERJEE *et al.*, 1992). Imerso nesta matriz encontra-se uma estrutura cônica denominada capsídeo viral (também conhecido como “core”), composto por monômeros da proteína p24 (LIU *et al.*, 1995). No interior deste capsídeo viral encontra-se o material genético do HIV que é constituído por duas fitas simples de RNA de polaridade positiva. Ao longo das fitas de RNA encontram-se associados monômeros das proteínas p7 e p9, formando o nucleocapsídeo. As enzimas virais, transcriptase reversa, protease e integrase, encontram-se associadas ao complexo do nucleocapsídeo.



## 1.4. Organização Genômica do HIV-1

Todos os membros da família *lentiviridae* têm como principal característica a complexidade de sua organização genômica, contendo múltiplos genes acessórios (ou regulatórios) intercalados aos genes estruturais e enzimáticos. O genoma do HIV-1 tem aproximadamente 9,8 kb. O HIV-1, como todos os retrovírus, possui os genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), além de diversos genes envolvidos com o controle de sua replicação (genes regulatórios: *tat*, *rev* e *nef*) e de suas funções celulares (genes acessórios: *vpr*, *vpu* e *vif*). Em ambas as extremidades do genoma encontram-se os terminais curtos de repetição (no inglês, STR), onde se inicia a transcrição reversa (conversão do RNA viral para DNA proviral). Durante a transcrição reversa são gerados os terminais longos de repetição (no inglês, LTR) que desempenham importante função na integração entre o genoma viral e o celular, além de conter sequências promotoras e “*enhancers*” dos genes virais. Portanto, os LTR somente são encontrados no provírus (vírus integrado ao genoma celular).

### **Genes Estruturais e Enzimáticos: *gag/pol/env***

A primeira região gênica estrutural é a *gag* que codifica para duas poliproteínas precursoras: uma de 160 kDa (*gag/pol*) e outra de 55 kDa (*gag*), sintetizadas a partir de um único mRNA (RNA mensageiro), que não sofre processamento de corte e junção. No momento da incorporação destas proteínas aos novos vírions, a poliproteína Pr55<sup>gag</sup> é clivada pela protease viral em três subunidades distintas que incluem a proteína de matriz (p17 MA), a proteína do capsídeo (p24 CA) e a proteína do nucleocapsídeo (p7/9 NC).

A segunda região é a *pol*, a qual codifica todas as enzimas virais, necessárias para a replicação do HIV. A protease (p10), a transcriptase reversa (p66/p51) e a integrase (p31) são inicialmente sintetizadas sob a forma de um precursor Pr160<sup>gag/pol</sup>, que no momento da montagem de novos vírions sofre uma autocatálise da protease viral, liberando-a do restante do precursor. A protease então irá clivar todas as demais proteínas contidas no precursor, iniciando o processo de maturação viral. A clivagem proteolítica de *gag* e *gag/pol* é absolutamente essencial para infectividade das partículas. Mutações no gene responsável pela codificação da protease, por exemplo, podem tornar a protease inativa ou com atividade reduzida, resultando na produção de partículas virais imaturas, não-infecciosas ou em diminuição do índice replicativo viral

(*fitness*) (KOHL *et al.*, 1988; GOTTLINGER *et al.*, 1989; ALDOVINI e YOUNG, 1990). Devido a esse papel fundamental no ciclo replicativo do HIV, a protease (PR) é alvo de diversos medicamentos utilizados na terapia antirretroviral (TARV), chamadas de inibidores da protease (IP). A transcriptase reversa (TR) é formada por um heterodímero das proteínas p66 e p51, e possui duas atividades catalíticas, que incluem a atividade de DNA polimerase RNA dependente, e a atividade ribonuclease H (Rnase H). Na TARV também são utilizados diversos inibidores da transcriptase reversa (ITR). E a integrase (p31) é essencial para a integração do genoma do HIV ao genoma da célula hospedeira.

A terceira região gênica estrutural, *env*, codifica as enzimas presentes na porção mais externa da partícula viral, o envelope. A poliproteína gp160 é clivada originando outras duas glicoproteínas funcionais (gp120 e gp41) do vírus. A gp120 é a proteína responsável pela interação viral com a molécula de CD4 e dos co-receptores (CCR5 e CXCR4) presentes na membrana da célula alvo. A interação com o CD4 leva a mudanças conformacionais da gp120, expondo sua alça V3 que estabelece interações com os co-receptores, expondo o domínio de fusão da gp41. As proteínas do envelope do HIV mediam a entrada das partículas na célula hospedeira e, portanto são os primeiros alvos dos anticorpos neutralizantes.

### **Genes Regulatórios: *rev/tat/nef***

Estes genes são responsáveis pela potencialização da expressão gênica do HIV.

O gene *rev* codifica a proteína Rev (19 kDa), que atua na fase pós-transcricional e facilita o transporte das moléculas de mRNA das proteínas estruturais e acessórias.

A proteína Tat (14-16 kDa), codificada pelo gene *tat*, atua como transativador da expressão viral, aumentando os níveis de transcrição dos genes do HIV. É o fator de transcrição viral essencial para a replicação (VAISHNAV e WONG-STAAL, 1991).

O gene *nef*, codifica a proteína citoplasmática Nef (25-30 kDa), uma de suas funções é aumentar a endocitose das moléculas de CD4 e MHC-I, diminuindo, portanto sua expressão e inibindo a re-infecção das células infectadas pelo vírus. Acredita-se, entretanto, que Nef seja multifuncional, exercendo efeitos de aumento da infectividade dos vírions e ativação dos linfócitos T.

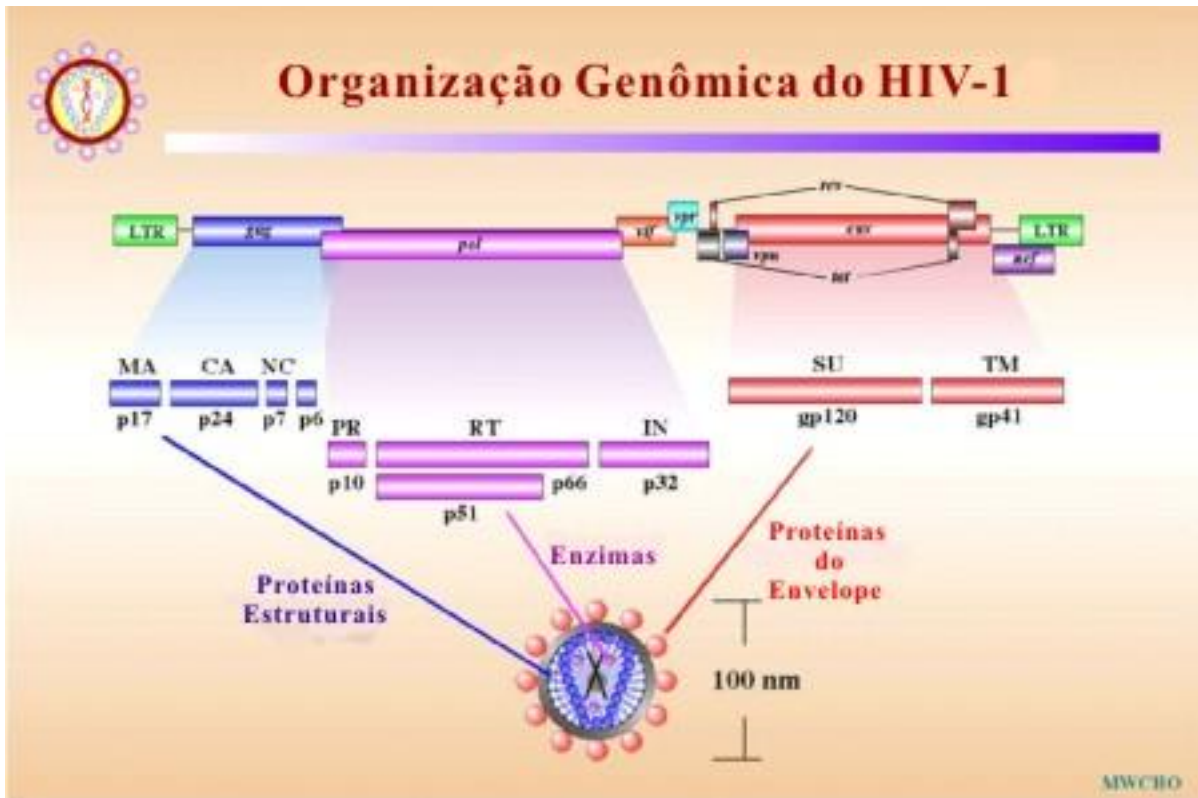
### **Genes Acessórios: *vif/vpr/vpu***

Os genes *vif*, *vpr* e *vpu* foram denominados acessórios devido à observação experimental de que os genomas virais, dos quais foram removidos estes genes, são capazes de gerar partículas virais infectantes em culturas de células. Hoje, acredita-se que estes resultados refletem um artefato do modelo experimental utilizado, no qual uma cultura celular *in vitro* não é capaz de reproduzir as condições existentes no organismo humano. Estas proteínas são expressas sempre nas fases mais tardias do ciclo replicativo do vírus e desempenham funções muito específicas no processo replicativo, interagindo com elementos celulares complexos.

O gene *vif* recebe este nome como abreviatura para fator de infectividade viral (*viruses infective factor*). A proteína Vif (23 kDa) acumula-se no citosol e na membrana citoplasmática. Seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido, mas sabe-se que Vif é capaz de aumentar em 1.000 vezes o nível de infectividade viral (SAKAI *et al.*, 1991).

O gene *vpr* codifica uma proteína de 15 kDa que atua diretamente no controle do ciclo celular, provocando a parada da célula infectada na fase G2 do ciclo celular (G2 é o intervalo do ciclo celular entre o final da síntese do DNA e o início da mitose) (COHEN *et al.*, 1990).

O gene *vpu* codifica uma proteína de 16 kDa que estimula a liberação de vírions (KLIMKAIT *et al.*, 1990).



**Figura 1:** Organização Genômica do HIV-1.

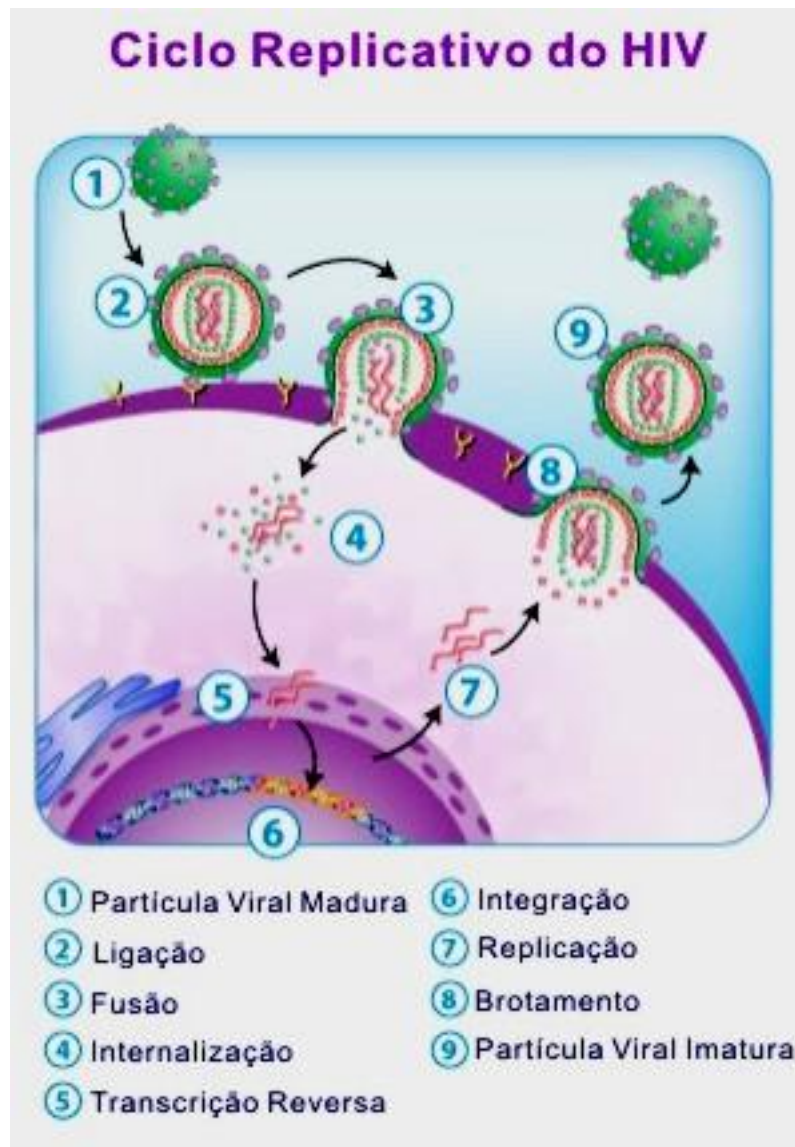
Fonte: <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV-1b.jpg> (traduzido)

## 1.5. Ciclo Replicativo do HIV-1

O processo de replicação do HIV inicia-se com a entrada do vírus no citoplasma da célula hospedeira, que depende de um conjunto de interações entre as glicoproteínas presentes na superfície da partícula (gp120 e gp41), com o antígeno de diferenciação celular (CD4) e os receptores celulares de quimiocinas (CCR5, CxCR4, CCR2) (STAMATATOS e CHENG-MAYER, 1993; DENG *et al.*, 1996; CLAPHAM, 1997; RIZZUTO *et al.*, 1998). O resultado destas interações é a completa fusão entre a membrana plasmática celular e o envelope viral, culminando com a internalização do nucleocapsídeo no citoplasma celular. Desde a ligação das glicoproteínas virais aos seus receptores celulares, passando pela fusão das membranas até a internalização do nucleocapsídeo, uma série de alterações estruturais e conformacionais irão ocorrer com as proteínas componentes do vírus. Estas alterações conformacionais agem como um sinal para o início da transcrição reversa e promovem a desmontagem do nucleocapsídeo para a liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira. Todo processo de transcrição será concluído ainda no interior do capsídeo, na medida em que este está se desmontando. Ao final da transcrição, o cDNA viral recém-sintetizado estará associado à enzima integrase, que se responsabilizará pelo transporte ao núcleo celular e pela integração deste cDNA ao genoma celular. O DNA viral integrado passa a ser denominado de provírus e todas as proteínas virais e os novos genomas, para compor os novos vírions, serão sintetizados tendo o provírus como molde, num processo que irá envolver tanto proteínas de origem viral como celular.

A montagem das partículas virais inicia-se com a inserção das glicoproteínas virais na membrana citoplasmática da célula infectada. As proteínas sintetizadas a partir do gene *gag* (proteínas do nucleocapsídeo p7/p9), ainda sob a forma de precursores protéicos, associam-se aos RNAs virais e à face citoplasmática da gp160. Na medida em que estas proteínas se acumulam, associando-se tanto às proteínas do capsídeo e matriz quanto às glicoproteínas, as partículas virais vão-se fechando em torno das 2 fitas de RNA e as enzimas virais a elas complexadas (protease, transcriptase reversa e integrase). Com o fechamento completo do capsídeo, a partícula viral acaba totalmente envolvida por um segmento de membrana plasmática repleta de glicoproteínas virais e, definitivamente, desligada da superfície celular. Durante todo este processo, conhecido como brotamento, observa-se intensa atividade

da enzima protease, a qual é responsável pela clivagem dos precursores protéicos em seus componentes individuais, processo conhecido como maturação viral, até que a partícula viral atinja sua forma definitiva e torne-se infectiva.



**Figura 2:** Ciclo Replicativo do HIV. Fonte: [www.thejcdp.com/issue032/huber/graphics/pg04.jpg](http://www.thejcdp.com/issue032/huber/graphics/pg04.jpg) (traduzido)

## 1.6. Variabilidade Genética

No curso da infecção, o elevado índice de replicação do HIV, em que uma pessoa cronicamente infectada e sem tratamento produz e elimina 10 bilhões de vírus diariamente (PERELSON *et al.*, 1996), e o índice de erros naturais da transcriptase reversa cerca de  $3,4 \times 10^{-5}$  nucleotídeos por ciclo (MANSKY e TEMIN, 1995), colaboram para o surgimento das chamadas *quasispécies* virais, ou seja, variantes do vírus bastante relacionadas, porém geneticamente distintas entre si (DOMINGO *et al.*, 1997). Não são apenas as mutações causadas pela transcriptase reversa as responsáveis pela variabilidade genética do HIV. Embora ocorram numa frequência muito menor do que as mutações pontuais, eventos de inserção de sequências, deleções e recombinações (COFFIN, 1992) também ocorrem, potencializando o efeito de variabilidade genética. O conjunto de variações genéticas pode ter efeito tanto deletério quanto vantajoso para o vírus, dependendo da forma como a proteína resultante for alterada (HIRSCH *et al.*, 1998).

Quando se levam em consideração esta natureza altamente mutagênica e recombinogênica da transcriptase reversa (PRESTON *et al.*, 1988; ROBERTS *et al.*, 1988; NEGRONI e BUC, 2001; JUNG *et al.*, 2002) somados ao ciclo replicativo dinâmico do vírus (aproximadamente  $10^{10}$  vírions e  $10^8$  células infectadas/dia) (HO *et al.*, 1995; WEI *et al.*, 1995; PERELSON *et al.*, 1996) e devido ao tamanho do genoma do vírus, que é de 10 kb percebe-se que todas as mutações possíveis são geradas diariamente ao longo do genoma do HIV-1. Esta diversidade genética é a grande chave para o sucesso do vírus, que muda tanto que se torna capaz de se evadir da vigilância do sistema imune ou de propiciar resistência aos ARV.

## 1.7. Medicamentos Antirretrovirais

Os medicamentos antirretrovirais (ARV) foram capazes de proporcionar a redução da replicação viral e com isso retardar a progressão da doença e mortalidade. O intuito do tratamento é primeiramente suprimir a carga viral, ou seja, a quantidade de HIV circulante no plasma para abaixo dos níveis inferiores aos limites de detecção dos testes mais sensíveis e, secundariamente, restabelecer a função imunológica, demonstrada pelo aumento do número de células T CD4+ (CHEN *et al.*, 2007). No Brasil a Terapia Antirretroviral (TARV) está disponível desde 1996.

Aproximadamente 25 medicamentos ARV estão aprovados para tratamento da infecção pelo HIV-1: 9 inibidores da transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN), 4 inibidores da transcriptase reversa não nucleosídicos (ITRNN), 9 inibidores da protease (IP), 1 inibidor de fusão (IF), 1 inibidor do CCR5, e 1 inibidor da integrase.

Para muitos pacientes infectados com o HIV-1, a administração de combinações de medicamentos ARV, frequentemente referidas como Terapia Antirretroviral Altamente Efetiva (do inglês, “*Highly Active Antiretroviral Therapy*” - HAART), tem êxito em suprimir a replicação viral e reverter a evolução da doença (PALELLA *et al.*, 1998). Em alguns pacientes, entretanto, o efeito supressor da HAART é incompleto, o que geralmente leva à seleção de cepas virais resistentes aos agentes ARV, que aparecem rapidamente durante o tratamento, reduzindo a eficiência em longo prazo da terapia ARV. A resistência do HIV é mediada pelas mutações nos genes virais alvo dos medicamentos (COFFIN, 1995).

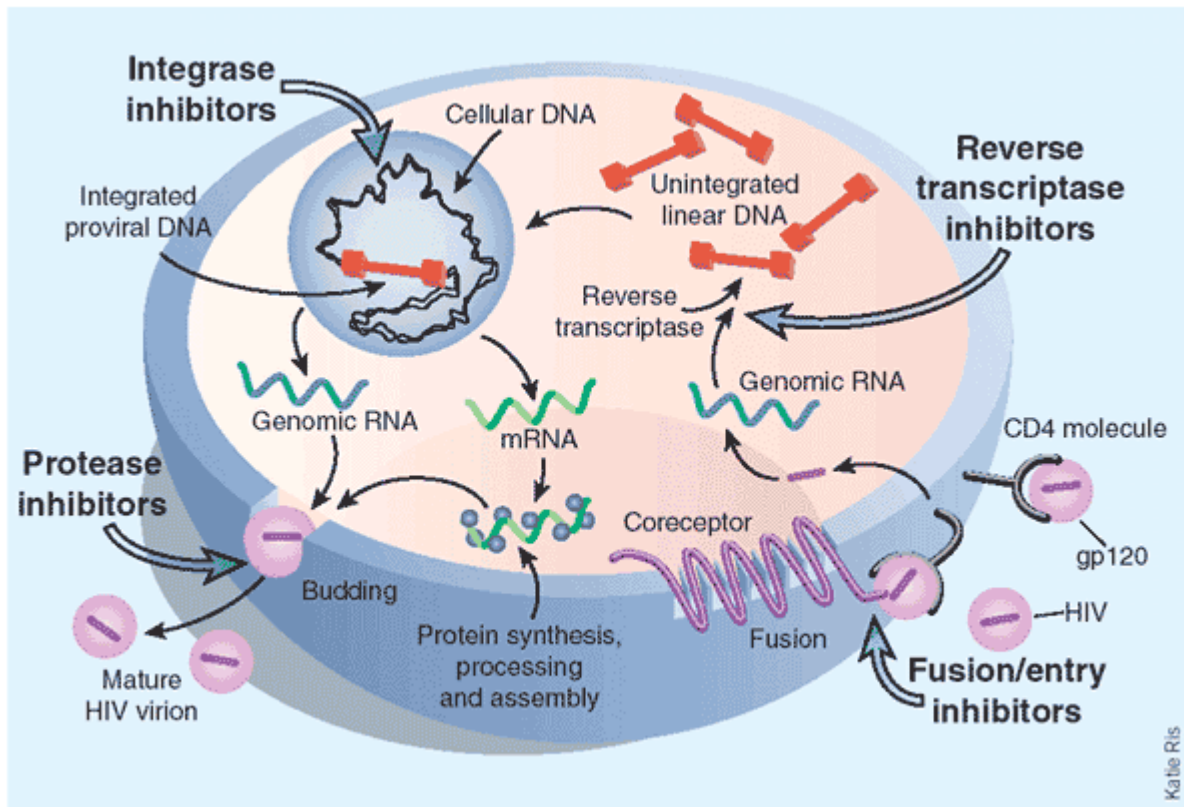
A partir dos conhecimentos acumulados sobre o ciclo replicativo do HIV e seus elementos, foi possível definir cinco etapas como alvos críticos para o bloqueio da replicação viral. São eles:

- ⇒ Adsorção e entrada na célula
- ⇒ Transcrição Reversa
- ⇒ Integração no genoma
- ⇒ Etapas pós-integração
- ⇒ Maturação viral

Para cada um destes possíveis alvos, uma grande infinidade de medicamentos foi desenvolvida. Entretanto, somente um número restrito de compostos acaba chegando a ponto de ser utilizado como medicamento após os estudos clínicos



realizados com cada um deles.



**Figura 3:** Etapas-alvo para bloqueio da replicação viral.

Fonte: [http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/graphics/hiv\\_biology.gif](http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/AIDS/graphics/hiv_biology.gif)

Utilizando os alvos no ciclo replicativo viral como elemento classificatório, podemos dividir os medicamentos antirretrovirais nas seguintes categorias:

#### A – Medicamentos que atuam na adsorção e entrada

Os antirretrovirais listados dentro desta categoria têm por objetivo impedir que a partícula viral se ligue aos seus receptores celulares, bloqueando sua entrada na célula hospedeira. Como exemplos desta categoria, podemos citar:

- ⇒ sCD4 (CD4 solúvel): liga-se às proteínas do envelope do vírion, impedindo ou competindo pela ligação com a molécula CD4 da célula-alvo.
- ⇒ Ac neutralização: anticorpos específicos para as proteínas virais. Agem de forma semelhante aos sCD4, ligando-se às proteínas virais, impedindo sua ligação aos receptores celulares. Outros exemplos com mesmo objetivo são análogos de CCR5, CXCR4.

- ⇒ T-20: é um peptídeo sintético que se liga a uma alça hidrofóbica, altamente conservada da gp41 conhecida como HR1, a qual normalmente media as mudanças conformacionais que geram a fusão do vírus com a célula.
- ⇒ Inibidores do CCR5: moléculas capazes de interagir com os receptores das quimiocinas conhecidos como CCR5 e que são fundamentais para a entrada do vírus nas células.

## B – Medicamentos que agem na etapa de Transcrição Reversa

Os inibidores da Transcrição Reversa são os principais medicamentos antirretrovirais disponíveis contra o HIV. Agem nas etapas anteriores à integração e podem ser subclassificadas como:

- ⇒ Análogos nucleosídeos: são moléculas semelhantes aos nucleosídeos em estrutura, porém modificadas de tal maneira (troca do OH na posição 3' por outro grupamento químico) que são incluídos na cadeia de DNA que está sendo sintetizada, impedindo a polimerização da cadeia. Ex.: Zidovudina (AZT), Lamivudina (3TC), Didanosina (ddI), Estavudina (d4T), Zalcitabina (ddC), Abacavir.
- ⇒ Inibidores não-análogos nucleosídeos: são moléculas que entram no sítio ativo da enzima transcriptase reversa mudando sua conformação e impedindo a elongação da cadeia de DNA. São derivados de piridona e benzodiazepinas. Ex.: Nevirapina (NVP), Delavirdina (DLV), Efavirenz.
- ⇒ Antinucleotídeos: hidroxiurea, MPA.
- ⇒ Análogos nucleotídeos: são moléculas que agem de forma semelhante aos análogos nucleosídicos, porém já estão fosforilados, ou seja, já contêm o grupo fosfato, como os nucleotídeos. Ex.: Tenofovir.

## C – Medicamentos que agem na etapa de integração

Os inibidores de integração encontram-se em uso clínico, e seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio da função da enzima integrase, impedindo que a mesma se ligue ao cDNA, ou bloqueando sua função de corte e junção com o genoma celular. Ex.: Raltegravir.

#### D – Medicamentos que agem na etapa pós-integração

Os medicamentos que atuam na fase pós-integração têm como alvo o bloqueio da expressão dos genes virais. Inibidores da proteína Tat e oligonucleotídeos anti-senso, são alguns dos exemplos que podem ser mencionados. Esta categoria de inibidores também se encontra em fase de desenvolvimento, não existindo nenhum composto comercial.

#### E – Medicamentos que atuam na maturação viral

Esta classe de medicamentos tem como alvo a protease viral, ou seja, atuam bloqueando o processo de montagem da partícula viral, impedindo a “clivagem” dos precursores protéicos. Estão entre os antirretrovirais mais usados clinicamente, com diversos compostos comerciais disponíveis.

## 1.8. Resistência Viral aos Medicamentos

A resistência aos antirretrovirais (ARV) é um mecanismo de seleção natural darwiniano, portanto significa que com a pressão seletiva do meio ambiente em que o vírus replica, na presença de ARV, cepas virais mais adaptadas a este meio ambiente vão ser selecionadas e prevalecer. Esta seleção acontece muito facilmente no caso do HIV, em função do ciclo de vida dinâmico do vírus.

Apesar de todas as mutações possíveis serem geradas ao longo do genoma do HIV-1, estas mutações que emergem diariamente e têm relação com resistência aos ARV normalmente não se fixam. Fixar-se significaria que a cepa viral com a mutação de resistência deveria infectar um linfócito T CD4+ suscetível. Isto, provavelmente, não ocorrerá, já que esta cepa estará competindo com outros 10 bilhões de vírus do tipo selvagem que estão sendo liberados na corrente sanguínea desta pessoa infectada.

Entretanto, quando se utiliza qualquer ARV em monoterapia, há a eliminação de todos os vírus sensíveis e a consequente seleção do vírus com mutações de resistência.

Assim, esta cepa viral é capaz de infectar o “próximo” linfócito suscetível e haverá a expansão do vírus com a mutação de resistência, pois de cada célula infectada saem de 5 mil a 10 mil vírus com a mutação de resistência selecionada. Isso é o que fundamenta a terapêutica ARV combinada, em que, havendo a seleção de um vírus com mutação de resistência, tal cepa ainda continua suscetível aos outros ARV presentes no esquema de tratamento. Portanto, a monoterapia leva ao risco de seleção de mutações de resistência (exceto para os medicamentos com alta barreira genética, como alguns inibidores de protease com ritonavir).

Chow e colaboradores mostraram que o valor adaptativo (“*fitness*”) de um vírus mutante, selecionado pelo uso constante de ARV é, geralmente, menor que a do vírus selvagem (CHOW *et al.*, 1993), caso contrário os mutantes formariam populações dominantes em pacientes não tratados. Porém, na vigência da terapia antirretroviral (TARV), os vírus mutantes, que conseguem escapar do efeito do medicamento, acabam levando vantagem sobre o tipo selvagem, tornando-se a espécie dominante. Desta forma, a população viral será selecionada pela “pressão seletiva” exercida pelo medicamento. Obviamente, toda e qualquer mutação pode estar presente de antemão, mesmo antes do início da terapia, numa mistura de variantes genéticas da população infectante. Portanto, a “pressão seletiva” permitirá a proliferação das cepas que melhor

se adaptarem, funcionalmente, à presença do medicamento (RICHMAN, 1998).

Além dos mecanismos virais para resistência aos medicamentos, existem outros fatores, não relacionados ao vírus, que podem levar a uma baixa eficiência terapêutica. Características celulares próprias do indivíduo portador do vírus podem torná-lo naturalmente resistente a determinados medicamentos. Outro fator a ser mencionado é a biodisponibilidade do medicamento no organismo, que pode ser determinante no mecanismo de seleção de variantes resistentes.

**Eficácia de um esquema antirretroviral.** Uma maneira de se definir eficácia virológica de um esquema ARV seria através da análise da potência do esquema associada a sua durabilidade (Eficácia = potência + durabilidade). A potência de um medicamento ou de um esquema ARV tem relação com a capacidade de supressão viral, que pode ser mensurada pela queda da carga viral, e a durabilidade do tratamento tem relação com a barreira genética.

## 1.9. *Fitness* Viral

O *fitness* do HIV-1 corresponderia à capacidade de adaptação de um vírus em determinado meio ambiente. Esta “adaptabilidade” do vírus leva em consideração a infectividade de novas células, transmissibilidade e a capacidade replicativa (que pode indiretamente ser medida pela carga viral) do vírus.

Frente a forte pressão seletiva, para sobreviver o vírus deve se adaptar rapidamente ao meio. Sendo o HIV-1 um parasita obrigatório, seu *fitness* é definido pelas propriedades que afetam a replicação e sobrevivência num meio particular do hospedeiro (DOMINGO e HOLLAND, 1997). Estes parâmetros são frequentemente difíceis de estudar, mas um meio efetivo de examinar os componentes replicativos do *fitness* é a competição de cepas virais num meio *ex vivo* controlado (HOLLAND *et al.*, 1991). *Quasispecies* ou populações virais tendem a ganhar *fitness* a cada passagem sucessiva na cultura celular (CLARKE *et al.*, 1993) e este *fitness* adquirido é dependente do aumento do tamanho populacional e complexidade genética (CLARKE *et al.*, 1994). Contrariamente, qualquer pressão seletiva que efetivamente reduza o tamanho da população viral pode também ativar a “catraca de Muller”, na qual “*bottlenecks*” sucessivos (por exemplo, transmissão entre hospedeiros) levaria a fixação de mutações deletérias na população e uma possível perda do *fitness* (CLARKE *et al.*, 1993; YUSTE *et al.*, 1999).

Embora as mutações de resistência confirmam vantagem replicativa a variantes na presença de medicamentos ARV, as mutações de resistência também produzem uma diminuição da capacidade total replicativa dos vírus. Para contrapor a perda na capacidade replicativa, mutações adicionais (mutações compensatórias) podem recuperar o *fitness* perdido pelo vírus. Portanto, em condições naturais (ausência de medicamento) o vírus do tipo selvagem tem mais *fitness* que o mutante (HARRIGAN *et al.*, 1998; MAMMANO *et al.*, 1998; ZENNOU *et al.*, 1998; MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999; HU *et al.*, 2006). Entretanto, como *fitness* viral é um conceito relativo ao meio ambiente em que se encontra o vírus, aquele com melhor *fitness* na presença de ARV é o que tem mutações de resistência, posto que o vírus sensível não sobrevive na presença de medicamentos ARV.

### **1.10. Testes de determinação de resistência do HIV-1 aos ARV**

O teste de resistência do HIV aos medicamentos tornou-se uma ferramenta essencial para o tratamento ARV dos pacientes portadores do HIV. Os testes são importantes para a manutenção de uma terapêutica eficaz e de longo prazo no tratamento ou resgate dos portadores, pois permitem detectar variantes resistentes ao medicamento para selecionar o regime de tratamento subsequente mais adequado (DEGRUTTOLA *et al.*, 2000), e também monitorar o tratamento (BAXTER *et al.*, 2000).

Dentre os métodos mais comumente empregados de detecção de variantes resistentes aos medicamentos em populações de HIV-1, destacam-se dois, a genotipagem do HIV e a fenotipagem do HIV. Embora essencialmente diferentes, estes dois testes fornecem quase o mesmo tipo de informação básica e, em alguns casos, acabam por complementar-se.

O objetivo dos testes de fenotipagem é determinar a capacidade de uma determinada população viral replicar-se em culturas de células contendo diferentes concentrações de ARV. Consiste na aferição do efeito médio da suscetibilidade ao medicamento após inserção de produtos da RT-PCR num clone infeccioso do HIV-1 (análise fenotípica). A ideia nesse método é simular o comportamento dos vírus presentes no organismo de um dado paciente, em culturas de células contendo concentrações crescentes dos medicamentos ARV, estimando-se, assim, a capacidade de cada medicamento em inibir o desenvolvimento do HIV. A realização destes testes é bastante complexa e envolve a utilização de tecnologias avançadas de clonagem e construções genéticas.

Os testes de genotipagem buscam determinar a resistência aos medicamentos, por meio da determinação das alterações na sequência de nucleotídeos ocorridas no genoma viral, capazes de modificar substancialmente a estrutura das proteínas que sofrem ação direta desses medicamentos, bloqueando ou diminuindo a eficiência com que os medicamentos inibidores ligam-se às mesmas. Basicamente, consiste em gerar produtos de RT-PCR oriundos de múltiplos genomas virais extraídos do plasma, e sequenciamento do DNA (análise genotípica). A interpretação dos resultados de genotipagem requer análise das mutações levando em consideração aos medicamentos utilizados, bem como o potencial para resistência cruzada com outros medicamentos.

A ausência de resistência viral detectável após falha terapêutica pode resultar da combinação de qualquer um dos seguintes fatores:

- ⇒ presença de populações virais minoritárias resistentes ao medicamento;
- ⇒ não aderência;
- ⇒ erro laboratorial;
- ⇒ ausência de conhecimento atual de associações de certas mutações com resistência aos medicamentos;
- ⇒ ocorrência de mutações relevantes fora das regiões analisadas pelos ensaios rotineiros de resistência;
- ⇒ interações entre medicamentos levando a níveis sub-terapêuticos;
- ⇒ e, possivelmente, problemas compartimentais, indicando que o medicamento pode não atingir níveis ótimos em determinados reservatórios celulares ou teciduais.



### **1.11. Tipos de resistência aos ARV**

A resistência aos ARV pode ser viral ou celular. A resistência viral está subdividida em genotípica e fenotípica. A resistência celular pode interferir na penetração ou na ativação do medicamento.

#### **Resistência primária e secundária aos ARV**

A resistência primária é aquela já presente mesmo antes do uso da medicação pelo indivíduo infectado. Isto pode ocorrer pela transmissão de cepas resistentes ou mesmo pela geração e fixação de mutantes resistentes em um indivíduo infectado decorrente do alto índice replicativo do HIV-1; estando mais relacionada à transmissão do que à geração espontânea.

Resistência secundária é aquela que emerge em decorrência da pressão de seleção exercida pela medicação ARV.

## 1.12. Mecanismo de resistência aos ARV

### **Os Inibidores de transcriptase reversa análogos aos nucleosídeos (ITRN) ou nucleotídeos (ITRNt)**

Os ITRN são medicamentos estruturalmente muito semelhantes aos nucleosídeos verdadeiros: adenosina (A), guanosina (G), citosina (C) e timidina (T). Os nucleosídeos formam a base do conteúdo genético que vai codificar os aminoácidos que são, por sua vez, a base da formação das estruturas protéicas. Durante o processo da transcrição reversa, os ITRN vão de forma competitiva substituir os nucleosídeos verdadeiros. A zidovudina (AZT) e a estavudina (d4T) são análogos a timidina, a lamivudina (3TC) e a zalcitabina (ddC) são análogas à citosina, a didanosina (ddl) é análogo à adenosina e o abacavir é análogo a guanosina. Desta forma, durante a polimerização do vírus, a transcriptase reversa pode, ao invés de captar o nucleotídeo verdadeiro, colocar um falso nucleotídeo no final da cadeia (AZT no lugar da timidina, por exemplo) e desta forma, o ciclo replicativo do HIV é interrompido. Os ITRN necessitam ser trifosforilados, ou seja, necessitam incorporar três moléculas de fósforos, para estarem ativos. Os ITRN(t) que têm como representantes o Adefovir (não utilizado em terapia anti-HIV) e Tenofovir já se apresentam pré-fosforilados, necessitando de uma etapa a menos de fosforilação que os ITRN. O Tenofovir, como o ddl, é um análogo da adenosina.

Os ITRN(t) são fundamentais para compor esquema inicial de tratamento antirretroviral, entretanto, esquemas contendo 3 ITRN(t) têm pouca durabilidade pela baixa barreira genética.

Há dois tipos de mecanismos bioquímicos de resistência aos ITRN.

O mecanismo de resistência mais comum a esta classe de medicamentos é pelas mutações que propiciam um aumento na habilidade da TR do HIV-1 em discriminar entre o ITRN e o substrato natural, levando a uma incorporação preferencial deste último. Exemplos que utilizam este mecanismo são as mutações associadas aos análogos não timidínicos como K65R e L74V, e as mutações de resistência multi-nucleotídicas como a Q151M e a M184V. Em outras palavras, neste mecanismo, no momento em que temos a mutação M184V, a transcriptase reversa passa a incorporar a citosina em detrimento ao 3TC. A valina na posição 184 da TR altera o posicionamento tridimensional da enzima, resultando em mau posicionamento do 3TC e marcada redução na sua incorporação (DEVAL *et al.*, 2004).

O outro mecanismo relaciona-se ao aumento da excisão do ITRN, que é o que ocorre, por exemplo, com a inserção no T69 associada com resistência multi-nucleotídica, e no caso das mutações aos análogos timidínicos (TAM) e o AZT (ARION *et al.*, 1998; MEYER *et al.*, 1999; BOYER *et al.*, 2001). Onde as mutações aumentam a habilidade da enzima em eliminar o ITRN que se encontra ligado ao final da cadeia, impedindo o alongamento dela. Na presença das TAM, o AZT é incorporado naturalmente, mas o último fósforo de sua cadeia trifosfato sofre o processo de pirofosforólise, levando à retirada do mesmo. Ocorrido isso, o AZT se desprende da ligação (excisão) dando lugar a timidina, e o ciclo replicativo do vírus continua. Essa capacidade aumentada de excisão da enzima mutante não é específica para o AZT, o que ajuda a explicar a enorme resistência cruzada entre esse fármaco e outros ITRN. As TAM, por sua vez, aumentam a excisão de AZT; é interessante notar que as mutações 65R, 74V, 184V diminuem a excisão de AZT provocada pelas TAM, revertendo dessa forma a resistência adquirida.

## Os inibidores de protease (IP)

Um dos exemplos relacionados ao grande avanço na área farmacológica e médica das últimas décadas foi o desenvolvimento dos inibidores da protease do HIV-1. A protease é uma enzima essencial para a replicação do HIV-1 e, portanto tem sido alvo do tratamento anti-HIV (KOHL *et al.*, 1988; PENG *et al.*, 1989; DEBOUCK, 1992). A protease se apresenta na forma de dímero e é responsável pela clivagem de grandes poliproteínas virais antes do encapsulamento do vírus. Os inibidores de protease foram desenhados para ocupar competitivamente o sítio ativo da protease. Isto significa que, aleatoriamente, o sítio ativo da protease pode ser ocupado tanto pelo seu substrato natural, as poliproteínas virais a serem clivadas, quanto pelas moléculas produzidas artificialmente, os inibidores de protease. É o excesso de inibidores de protease dentro da célula, em comparação à quantidade do substrato natural do HIV, que faz com que haja inibição da replicação do vírus.

As mutações de resistência selecionadas pelos inibidores de protease levam a uma alteração na conformação tridimensional dela. A consequência disto é (i) a diminuição do tempo de ligação dos IP a ela e (ii) a diminuição do tempo que a protease levaria para clivar seu substrato natural, o que corresponde a uma diminuição do *fitness* viral. Com a diminuição do tempo de ligação entre a protease e seus inibidores, haverá uma vantagem a favor do substrato natural, as poliproteínas virais, na competição pelo sítio ativo da protease (MAMMANO *et al.*, 1998; ZENNOU *et al.*, 1998; MAHALINGAM *et al.*, 1999; MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999). A diminuição do tempo de ligação entre os inibidores de protease e a protease está relacionada ao tipo e à quantidade de mutações presentes nela. Algumas mutações de resistência aos IP podem causar uma redução na atividade e função da protease (MAMMANO *et al.*, 1998; ZENNOU *et al.*, 1998; MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999).

Muitas mutações são selecionadas pelos IP mais do que por qualquer outra classe de ARV. Quando muitas mutações estão presentes em alguns isolados virais ou quando mutações ocorrem em padrões incomuns, os efeitos das mutações de resistência aos IP em determinados IP podem ser difíceis de quantificar.

As mutações do genoma do HIV selecionadas pelos IP são definidas como mutações principais (também chamadas de primárias) ou acessórias (secundárias).

Normalmente as mutações principais são as mutações selecionadas mais precocemente na presença de medicamentos, ou aquelas que substancialmente diminuem a suscetibilidade ao medicamento ARV que está sendo utilizado. Estas

mutações tendem a ser os primeiros resíduos de contato de ligação com o medicamento.

As mutações acessórias da protease geralmente emergem depois das mutações primárias e por si só não diminuem a suscetibilidade ao ARV em questão, com função maior na recuperação do *fitness* viral, que fica enormemente comprometido pelo surgimento das mutações principais. Além disso, raramente um vírus será viável com uma única mutação principal, necessitando de um grupo de mutações para que possa equilibrar o seu *fitness* e replicar.

### 1.13. Falha Terapêutica

A TARV que não suprime adequadamente a replicação do HIV-1 geralmente resulta na seleção de variantes que possuem mutações de resistência aos medicamentos (CARPENTER *et al.*, 1997; SHAFER, *et al.*, 1998), levando à falha terapêutica.

Definição de falha ao tratamento antirretroviral de acordo com o *DHHS Guidelines*, de abril de 2005 (<http://AIDSinfo.nih.gov>).

- ⇒ Falha virológica: carga viral superior a 400 cópias/ml após a 24<sup>a</sup> semana ou superior a 50cp/ml na 48<sup>a</sup> semana ou carga viral detectável após supressão virológica inicial (rebote).
- ⇒ Falha imunológica: queda do CD4 ou não aumento do CD4 de pelo menos 25-50 células no primeiro ano de tratamento.
- ⇒ Falha clínica: ocorrência ou recorrência de doenças relacionadas à AIDS após 3 meses em um tratamento antirretroviral, excluindo síndrome de recuperação imune.

#### **Determinantes da falha terapêutica**

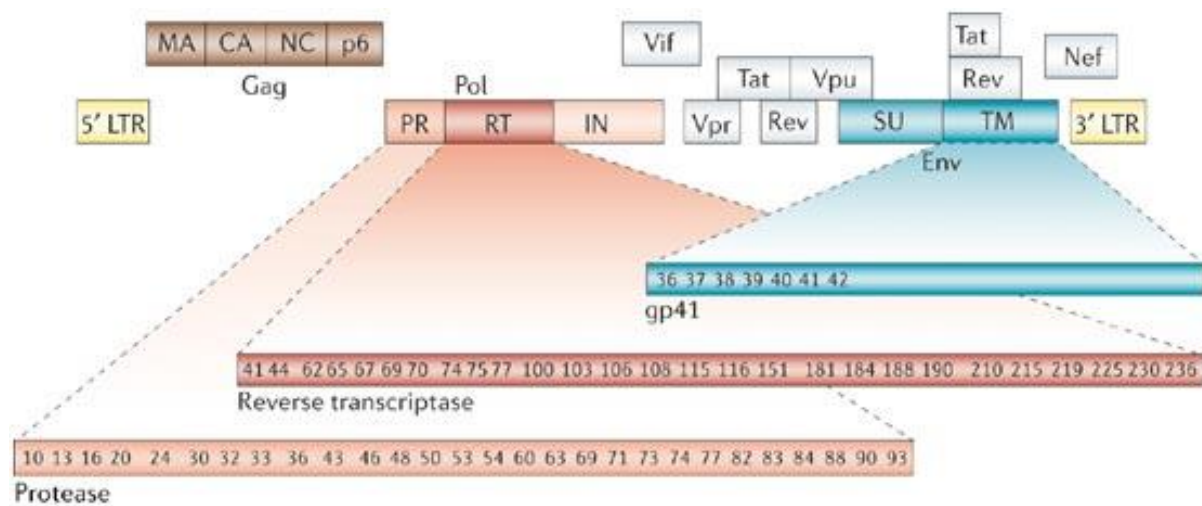
Inúmeros fatores podem contribuir para falha terapêutica aos ARV. Uma das causas mais frequentes é a baixa adesão ao tratamento, principalmente devido à complexidade da posologia e a gama de efeitos colaterais dos esquemas terapêuticos. Neste contexto, a perda de uma única dosagem de alguns medicamentos pode resultar na queda da concentração plasmática do medicamento para abaixo do nível requerido para inibir a replicação viral, favorecendo assim a emergência de cepas resistentes. Dentre as causas farmacológicas poderíamos citar a absorção deficiente do medicamento, eliminação acelerada da medicação, penetração deficiente em alguns santuários de replicação viral e interações com outros medicamentos.

O principal mecanismo gerador de mutações reside na enzima transcriptase reversa, uma vez que esta não é capaz de atuar como “revisora”, ou seja, ela não é capaz de corrigir nucleotídeos incorporados erroneamente durante a formação da cadeia de DNA.

As mudanças nos vírus ocorrem por causa das mutações genéticas que emergem no HIV. Porém, determinadas alterações estruturais podem, além de manter a funcionalidade da proteína, torná-la incompatível com a ligação ao inibidor respectivo, gerando os chamados vírus resistentes.

Alterações na estrutura da proteína, que preservem sua capacidade de interagir com seu substrato, favorecendo a replicação viral, mesmo na presença de medicamentos, têm a tendência, mediante a expansão clonal, de predominar na população viral deste indivíduo, sendo clínica e laboratorialmente identificadas como cepas de vírus resistentes.

Os medicamentos atualmente aprovados atuam nas enzimas virais protease e transcriptase reversa (ambas codificadas pelo gene *pol*), e a proteína viral transmembrana gp41 (codificada pelo gene *env*). No destaque dos três alvos temos as posições dos aminoácidos das mutações nos respectivos produtos da enzima que estão associados com resistência ao medicamento (segundo a lista do IAS de 2005).



Copyright © 2006 Nature Publishing Group  
Nature Reviews | Microbiology

**Figura 4:** Localização das mutações de resistência no genoma do HIV-1.

Fonte: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n10/images/nrmicro1477-f1.jpg>

#### **1.14. Barreira Genética para Resistência aos antirretrovirais**

Define-se barreira genética como sendo a “distância” genética para o desenvolvimento de resistência completa a um antirretroviral. A barreira genética pode relacionar-se (i) ao número de mutações necessárias para diminuir a atividade antirretroviral (relação fundamental com IP), (ii) à facilidade para seleção de mutações (rapidez com que uma mutação é selecionada, tem mais relação aos ITR) e (iii) ao perfil de mutações necessárias para a resistência a um esquema antirretroviral.

Um medicamento que necessita de várias mutações para resistência apresenta uma grande barreira genética. Se algumas mutações já existirem, haverá no caso uma diminuição dessa barreira para resistência ao ARV em questão. Especula-se que os esquemas incrementados com o ritonavir aumentem a barreira genética para infecção pelo HIV.



### 1.15. “Vias Mutacionais” para seleção de resistência

As vias mutacionais têm relação com o mecanismo de resistência aos antirretrovirais, onde de acordo com a pressão seletiva exercida por um medicamento, o vírus pode desenvolver algumas mutações específicas, que tendem a emergir numa ordem específica (BOUCHER *et al.*, 1992), seguindo o que chamamos de “vias ou caminhos mutacionais” distintos. Sendo que algumas mutações, de determinada via, podem implicar em resistência a outros medicamentos da mesma classe (resistência cruzada) e outras não.

Variantes virais contendo mutações para mais de uma via mutacional concomitantemente são raramente observadas *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que a co-ocorrência destas mutações num mesmo genoma não seja favorável ao HIV-1.

#### Mutações D30N e L90M na protease

O inibidor da protease nelfinavir (NFV) preferencialmente seleciona a mutação D30N e alternativamente a mutação L90M, sugerindo a ocorrência de vias mutacionais distintas. A resistência do HIV-1 ao inibidor de protease nelfinavir mais frequentemente começa com a seleção da mutação D30N (38%), entretanto em 12% dos pacientes começou pela mutação alternativa L90M (PERRIN e MAMMANO, 2003).

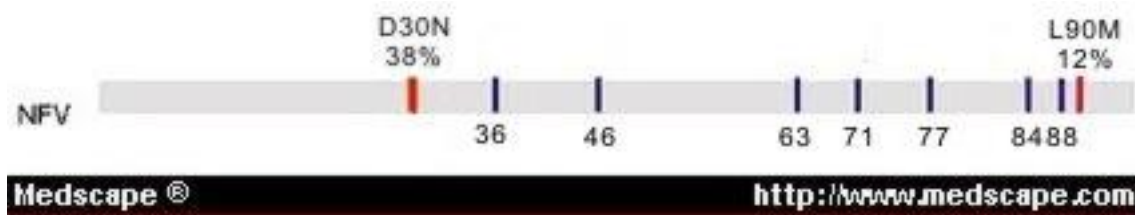
A resistência ao NFV acontece com a seleção da mutação D30N na PR do HIV-1. A substituição da asparagina pelo ácido aspártico na posição 30 é muito específica para a protease resistente ao NFV (PATICK *et al.*, 1998). A outra via de resistência ao NFV envolve a mutação L90M. A PR do HIV-1 com a L90M é resistente ao NFV e SQV e é parcialmente resistente a outros IP. A infectividade das partículas virais contendo esta PR mutante é preservada, com uma redução mínima na suscetibilidade (PATICK *et al.*, 1998; PERRIN e MAMMANO, 2003).

Quando emerge a mutação no códon 30, o resgate é possível com um inibidor de protease subsequente, posto que esta mutação é praticamente exclusiva e seu aparecimento oferece pouca possibilidade de resistência cruzada.

Por outro lado, quando a L90M é selecionada, o resgate é bem mais difícil, já que este é um códon de resistência comum a todos os inibidores de protease. A mutação L90M é a mutação primária responsável pela resistência tanto ao nelfinavir quanto ao saquinavir, e em menor grau, a outros inibidores da PR (ROBERTS, 1995).

Clones com ambas as mutações (D30N/L90M) são raramente encontrados *in*

vivo e geralmente comportam mutações adicionais (M46I, L63P, A71V, e N88D), que parecem ser compensatórias. O duplo mutante D30N/L90M parece ser quase inviável (SUGIURA *et al.*, 2002). A função da mutação N88D é facilitar a co-ocorrência destas duas mutações como foi recentemente descrito por Mitsuya e colaboradores, que analisaram o desenvolvimento da resistência nos pacientes tratados com NFV contendo a mutação D30N. A combinação das mutações D30N, N88D e L90M representam uma estrutura estável para o acúmulo de mutações adicionais (MITSUYA *et al.*, 2006).



**Figura 5:** Mutações na protease associadas a resistência ao NFV.

Fonte: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/editorial/clinupdates/2000/672/cm13.fig5.jpg> (modificada)

### Mutações na Transcriptase Reversa associadas aos Análogos Timidínicos

As mutações associadas aos análogos timidínicos (do inglês, “*Thymidine Analog Mutations*” – TAM) resultam do acúmulo sequencial das mutações selecionadas na TR pelo AZT e/ou d4T. As TAM também conferem reduzida suscetibilidade a todos os ITRN aprovados (resistência cruzada) (WHITCOMB *et al.*, 2003). Quanto maior o número de TAM, mais ampla a perda de susceptibilidade aos ITRN. O grau de resistência cruzada observado depende do número de mutações e de mutações específicas envolvidas (LARDER e KEMP, 1989; KELLAM *et al.*, 1992).

As TAM agrupam-se em dois padrões (vias mutacionais) distintos, porém sobrepostos, a seleção dos códons M41L, L210W e T215Y (TAM-1) e a via dos códons D67N, K70R, T215F e K219Q (TAM-2) (YAHY *et al.*, 1999; Gonzales *et al.*, 2003; MARCELIN *et al.*, 2004; COZZI-LEPRI *et al.*, 2005). A mutação D67N também ocorre comumente com as mutações da TAM-1 (COZZI-LEPRI *et al.*, 2005; RHEE *et al.*, 2007). A TAM-1 geralmente causa maior nível de resistência fenotípica e clínica aos análogos timidínicos e resistência cruzada ao abacavir (ABC), didanosina (ddI), e tenofovir (TDF) do que as mutações TAM-2 (LANIER *et al.*, 2004; MILLER *et al.*, 2004; COZZI-LEPRI *et al.*, 2005).

Há uma associação negativa entre a presença de TAM e da K65R, ambas levando à resistência a múltiplos medicamentos, sendo que esta última não tem efeito sobre o AZT.

Algumas mutações proporcionam reversão da resistência. O exemplo mais clássico é o da mutação M184V que “*in vitro*” reverte a perda de susceptibilidade proporcionada pelas TAM, tanto ao AZT, quanto ao tenofovir. Assim, mesmo na presença das mutações nos códons 41 e 210 com uma terceira TAM, haveria uma atividade do tenofovir se a mutação no códon 184 fosse mantida. Como a mutação do códon 184 é selecionada pelo 3TC, para que ela seja mantida deve ser manter o 3TC no esquema antirretroviral.

No caso das TAM, após o momento inicial em que uma das vias prevalece, vai haver um acúmulo progressivo de mutações, e alguns pacientes muito experimentados podem ter 5 ou até 6 TAM.



**Figura 6:** Mutações na transcriptase reversa associadas a resistência ao AZT.

Fonte: <http://img.medscape.com/fullsize/migrated/editorial/clinupdates/2000/672/cm13.fig3.jpg>

(modificada)

### **Co-ocorrência de mutações pertencentes a vias distintas**

Variantes virais contendo mutações para mais de uma “via mutacional” concomitantemente são raramente observadas *in vivo* e *in vitro*, sugerindo que a co-ocorrência destas mutações num mesmo genoma não seja favorável ao HIV-1 (correlação negativa).

Embora estas mutações tenham sido observadas quando realizamos a análise genotípica padrão (sequenciamento populacional), que consiste no sequenciamento do conjunto de mutações das diversas sub-populações virais circulantes naquele indivíduo (“*quasispécies*”), decidimos utilizar a técnica de sequenciamento de genoma único para verificar se as mutações específicas para mais de uma via mutacional que estejam presentes na amostra encontram-se num mesmo genoma.

Visando assegurar que cada fragmento amplificado das amostras destinadas ao sequenciamento proveio de uma única molécula alvo, e amplificar também o material genético de populações minoritárias, decidimos utilizar a técnica de diluição limite de DNA (“*end-point* PCR”). Nesta metodologia, o cDNA, gerado a partir do RNA viral extraído do plasma, é diluído de maneira que a amplificação se faça a partir de uma única cópia, gerando clones de DNA (SIMMONDS *et al.*, 1990).

Um paciente infectado apresenta diversas populações virais compostas por inúmeras *quasispécies*. Durante a evolução, num processo dinâmico podemos ter uma população dominante que cresce mais rápido e as populações minoritárias. Dentre as numerosas *quasispécies* presentes no plasma, uma minoria populacional inicial pode se desenvolver independentemente e emergir como uma população dominante (ROQUEBERT *et al.*, 2006). Em pacientes sob TARV, a *quasispécie* dominante são as cepas virais resistentes, que geralmente estão acompanhadas pelas populações minoritárias, que seguiram vias evolucionárias distintas e predominam porque desenvolveram alta resistência ou porque uma mudança na pressão do medicamento proporcionou a esta população uma vantagem de crescimento sobre a população minoritária (CHARPENTIER *et al.*, 2004).

Visto que na análise populacional (análise genotípica padrão) foi possível observar a presença das mutações de vias mutacionais distintas em alguns pacientes, nosso objetivo neste trabalho propõe a análise clonal desses pacientes para determinar a eventualidade da ocorrência dessas mutações concomitantemente em uma mesma molécula genômica viral. No caso das mutações da protease analisamos principalmente os códons 30 e 90, e os códons secundários (acessórios) que geralmente estão associados às mutações destes códons. Na região da transcriptase reversa, observamos que na análise populacional foi possível observar as seis TAM, por isso nosso objetivo foi analisar clonalmente como estas mutações estão distribuídas no genoma viral.



Avaliar se vírus contendo mutações pertencentes a mais de uma via mutacional, conforme determinado pela análise populacional, apresentam esse conjunto de mutações na mesma molecular do genoma viral ou, alternativamente, se a ocorrência das mutações de cada via localiza-se em genomas distintos da sub-população viral intrapaciente.



### 3.1. Amostras

O Laboratório de Retrovirologia – EPM/UNIFESP é um dos laboratórios executores da Rede Nacional de Genotipagem – RENAGENO, implantada pelo Programa Nacional de DST e Aids para detectar a ocorrência de resistência genotípica (mutações do HIV) em pacientes em uso de terapia antirretroviral (TARV) possibilitando uma reorientação do tratamento e seleção de uma terapia de resgate. A RENAGENO gera sequências das enzimas protease e transcriptase reversa, que são codificadas pelo gene *pol*, a partir de produtos amplificados pela PCR, que consiste na amplificação do perfil da “*quasispécie*” viral (“*bulk-PCR*”) presente na amostra daquele indivíduo. Portanto a sequência nucleotídica destas amostras possui muitos códigos de ambiguidade, representando que há mais de uma população viral que contém um nucleotídeo ou outro naquela posição.

Amostras de RNA viral extraído do plasma cujas sequências apresentaram na análise populacional as mutações pertencentes a ambas às vias mutacionais foram utilizadas para a análise clonal através de métodos moleculares.



## Metodologia

### 3.2. Extração

O RNA viral previamente extraído do plasma dos pacientes segundo o protocolo da RENAGENO, para gerar a análise genotípica foi utilizado neste estudo para a análise clonal.

Resumo das etapas de extração do material genético viral:

- ⇒ Centrifugar 1 mL de plasma a 25000 g durante 90 minutos a 2-8°C.
- ⇒ Remover cuidadosamente o sobrenadante e adicionar o Tampão de Lise Viral, homogeneizar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- ⇒ Acrescentar isopropanol absoluto, homogeneizar vigorosamente e centrifugar a 15000 g por 15 minutos.
- ⇒ Remover o sobrenadante e adicionar etanol 70%, homogeneizar vigorosamente e centrifugar por 5 minutos a 15000 g.
- ⇒ Remover cuidadosamente todo o sobrenadante. Secar os tubos à temperatura ambiente.
- ⇒ Eluir o RNA com diluente e congelar entre -65 e -80°C até a utilização.

### 3.3. Transcrição Reversa

A transcrição reversa é o processo pelo qual a enzima transcriptase reversa sintetiza moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA.

O RNA viral extraído foi submetido à reação de transcrição reversa, utilizando o SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase da Invitrogen, de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante, com o intuito de gerar o cDNA que foi utilizado como molde, para a amplificação.

### 3.4. Amplificação de ácidos nucleicos por diluição serial limitante

O cDNA do vírion foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase em duas etapas (“*nested*” PCR). A PCR em duas etapas consiste em duas PCRs sequenciais onde a 1ª etapa da PCR utiliza como molde o cDNA gerado pela reação de transcrição reversa e a 2ª etapa da PCR utiliza como molde os produtos da 1ª reação, para isto transfere-se uma alíquota dos produtos da 1ª reação para um outro tubo contendo a mistura da 2ª reação. Portanto, tradicionalmente são necessários dois

pares de iniciadores, um par para cada reação. Os iniciadores da 2ª etapa da PCR devem estar localizados “internamente” aos iniciadores da 1ª etapa. A principal vantagem é o aumento da especificidade e sensibilidade.

Simmonds e colaboradores descreveram a PCR em duas etapas com diluição limite do DNA molde (SIMMONDS *et al.*, 1990), que consiste numa PCR modificada com sensibilidade suficiente para detectar uma única molécula do DNA alvo (“*nested-PCR*”) combinada à técnica de diluição limite (“*end-point*” PCR). A combinação deste método de PCR duplo com a técnica de diluição limitante permite a análise da heterogeneidade das sequências entre as populações de HIV. A técnica de PCR em duas etapas associada à diluição limitante foi empregada neste estudo para que cada produto de amplificação destinado ao sequenciamento represente uma variante viral, permitindo também a amplificação do material genético de populações minoritárias. Desta forma, podemos verificar se as mutações específicas para mais de uma via mutacional que estejam presentes na amostra encontram-se num mesmo genoma.

Por definição PCR é a reação em cadeia pela Polimerase, onde os produtos de um ciclo servem como molde para os ciclos subsequentes, levando a um aumento exponencial e não-linear na quantidade de produtos.

Sob condições teóricas, os produtos da PCR dobram a cada ciclo, segundo a equação:

$$N = N_0 \times 2^n$$

onde,

N é o número de moléculas amplificadas,

$N_0$  é o número de moléculas iniciais,

n é o número de ciclos de amplificação

Se  $N_0 = 1$  e  $n = 35$ :

$$N = 1 \times 2^{35} \Rightarrow N = 34.359.738.368 \cong 3,4 \times 10^{10} \text{ cópias do cDNA alvo.}$$

Experimentalmente, a eficiência da PCR está em torno de 78% a 97%. Portanto partindo de uma única molécula alvo, ao final da 1ª etapa da PCR teremos entre  $2,7 \times 10^{10}$  e  $3,3 \times 10^{10}$  cópias.

A distribuição de Poisson é uma distribuição de probabilidade discreta. Ela expressa, por exemplo, a probabilidade de certo número de eventos ocorrerem num dado período tempo, caso estes ocorram com uma taxa média conhecida e caso cada evento seja independente do tempo decorrido desde o último evento.

A probabilidade de que existam exatamente  $k$  ocorrências ( $k$  sendo um inteiro não negativo,  $k = 0, 1, 2, \dots$ ) é

$$f(k; \lambda) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^k}{k!}, \text{ onde}$$

$e$  é base do logaritmo natural ( $e = 2.71828\dots$ ),

$k!$  é o fatorial de  $k$ ,

$\lambda$  é um número real, igual ao número esperado de ocorrências que ocorrem num dado intervalo de tempo. Por exemplo, se o evento ocorre a uma média de 4 minutos, e estamos interessados no número de eventos que ocorrem num intervalo de 10 minutos, usaríamos como modelo a distribuição de Poisson com  $\lambda = 10/4 = 2.5$ .

Se  $\lambda$  é o número de DNA molde esperado em cada tubo,  $k$  a probabilidade de ocorrência, temos a classe nula de Poisson:

$$[F] = e^{-\lambda}$$

logo,

$$\lambda = -\ln[F]$$

Portanto, a média do número de moléculas por reação ( $\lambda$ ) é igual ao  $-\ln [F]$ , onde  $F$  é a fração de reações negativas do total de reações.

Como o esperado é que tenhamos cerca de 1 molécula por tubo, num total de 20 reações:

$$(k/20) = e^{-1} \Rightarrow (k/20) = 0,3679 \Rightarrow k = 7,358$$

Então, se 7 reações forem positivas de um total de 20 reações; segundo a classe nula de Poisson temos cerca de 1 molécula por reação positiva; este modelo teórico considera que a eficiência do processo de amplificação corresponde a 100%. Considerando-se que a eficiência da PCR seja de 80%  $[(7,358 \times 80)/100]$ , podemos ter no máximo 6 reações positivas, o que corresponde a 30% das reações.

Neste estudo, amplificamos parte da região *pol* do HIV-1, por protocolos comumente utilizados em nosso laboratório. A PCR em duas etapas foi realizada num volume final de 50  $\mu$ L, e 5  $\mu$ L do produto da primeira reação foi utilizado como molde para a segunda etapa da reação de PCR.

1ª etapa da PCR (iniciadores Pol1/IN-BO1R) → 2ª etapa da PCR (iniciadores K1/K2)

Reagentes	Para 20 reações	Concentração Final
Tampão 10X	100 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	70 $\mu$ L	3,5 mM
dNTP (25mM)	16 $\mu$ L	0,4 mM
Iniciador senso (200 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M (10 pmol/reação)
Iniciador reverso (200 pmol/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	0,2 $\mu$ M (10 pmol/reação)
Enzima Taq-Polimerase (5U/ $\mu$ L)	5 $\mu$ L	0,025 U/ $\mu$ L (1,25 U/reação)
Água MilliQ	812 $\mu$ L	

Incubações:

1ª PCR			2ª PCR	
94°C	7 minutos	Denaturação inicial – 1 etapa	94°C	5 minutos
94°C	45 segundos	Denaturação } Anelamento } Extensão } 35 ciclos	94°C	30 segundos
55°C	45 segundos		55°C	30 segundos
72°C	2 minutos		72°C	1min 30 seg
72°C	7 minutos	Extensão final – 1 etapa	72°C	5 minutos
4°C	$\infty$	Até retirar do termociclador	4°C	$\infty$

Iniciadores:

Iniciador	Utilização	Sequência	Posição no HXB2	T <sub>m</sub>
Pol 1	Senso da 1ª etapa da PCR	5' GGG AGT GGG GGG ACC CGG CCA TAA 3'	1842- 1865	61°C
IN-BO1R	Reverso da 1ª etapa da PCR	5' CCA CTC AGG AAT CCA GGT GG 3'	3791-3772	51°C
K1	Senso da 2ª etapa da PCR e Sequenciamento	5' CAG AGC CAA CAG CCC CAC CA 3'	2147-2166	53°C
K2	Reverso da 2ª etapa da PCR e Sequenciamento	5' TTT CCC CAC TAA CTT CTG TAT GTC ATT GAC 3'	3338-3309	54°C
DP11	Senso do Sequenciamento	5' CCA TTC CTG GCT TTA ATT TTA CTG GTA 3'	2595-2572	50°C
F1	Reverso do Sequenciamento	5' GTT GAC TCA GAT TGG TTG CAC 3'	2522-2539	47°C

A amplificação de clones foi realizada utilizando-se PCR em duas etapas com diluição limite do DNA molde. Após a determinação da diluição serial mínima, preparamos 22 reações da 1ª etapa da PCR aliquotamos duas reações para processar os respectivos controles (positivo e negativo), depois colocamos 5 µL da maior diluição que apresentou PCR positiva no restante da mistura da 1ª etapa da PCR e misturamos vigorosamente; esta mistura que diluiu a pequena porção da amostra foi distribuída em 20 tubos. Estes 20 tubos mais os controles foram incubados conforme descrito acima e 5 µL do produto de amplificação da 1ª etapa da PCR foi transferido para respectivos tubos contendo a mistura da 2ª etapa. Após a ciclagem da 2ª reação, 5 µL deste produto fora submetido à eletroforese em gel de agarose e sob luz ultravioleta (320 nm) observou-se as bandas que foram fotografadas utilizando-se câmera digital.

### **3.5. Fracionamento eletroforético do DNA amplificado**

Os produtos da reação de PCR foram submetidos à corrente contínua em gel de agarose 1,0% (peso/volume) em TBE 0,5X, contendo *Gel-Red*<sup>TM</sup>, e utilizamos um marcador de peso molecular de 100 pares de bases para comparar o tamanho do fragmento. As condições da corrida foram 100 volts por cerca de 30 minutos. As bandas foram observadas e fotografadas sob luz ultravioleta (320nm) utilizando-se câmera digital. O produto da PCR com os iniciadores K1 e K2 tem cerca de 1200 pares de base.

### **3.6. Purificação**

O material amplificado correspondente a clones isolados foi purificado pelo kit de purificação “*ChargeSwitch*<sup>®</sup> *PCR Clean-Up Kit*” - Invitrogen, que utiliza sondas magnéticas para purificar os produtos da PCR, de acordo com o protocolo do fabricante.

### **3.7. Sequenciamento**

A reação de sequenciamento foi realizada utilizando-se o “*DYEnamic*<sup>TM</sup> *ET Terminator Cycle Sequencing Kits*” – GE e analisada em sequenciador automatizado, ABI PRISM<sup>TM</sup> 3100 – Applied Biosystems. Como o produto da PCR gerado possui 1200 pares de bases, foram necessários iniciadores adicionais para a reação de sequenciamento. Portanto, utilizamos os iniciadores K1, K2, DP11 e F1 com o intuito

de cobrir toda a região de interesse com sequências geradas por iniciadores senso e anti-senso reduzindo assim artefatos do sequenciamento.

### **3.8. Análise das sequências**

As sequências geradas a partir de cada clone foram editadas, utilizando o programa “*Sequencher*” versão 4.8, comparadas entre si e com a sequência gerada pelo sequenciamento da RENAGENO, a fim de verificar as mutações presentes em cada clone gerado e sua proporção.

Para garantir que cada produto de amplificação sequenciado representasse uma variante viral, as sequências que apresentaram ambiguidade foram desconsideradas, pois a presença de ambiguidade é indicativa de que naquela reação de PCR pelo menos duas moléculas de cDNA inicial foram amplificadas.

As sequências de cada clone foram editadas, alinhadas pelo programa “*Clustal X*” versão 3.0 (THOMPSON *et al.*, 1997), e submetidas à análise filogenética pelo método “*Neighbor-Joining*” usando o programa HyPhy (<http://www.hyphy.org/>).



#### 4.1. Obtenção e sequenciamento dos clones

A seleção das amostras a serem estudadas foi realizada a partir da análise das 2898 sequências do banco de dados da RENAGENO. Neste levantamento buscamos as sequências que apresentavam as mutações de resistência pertencentes às duas vias mutacionais a serem estudadas, mutações D30N e L90M para a região da protease, e as mutações M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y/F e K219Q/E para a região da transcriptase reversa.

E como mostra a tabela 1, encontramos apenas 50 sequências (1,7%) que apresentaram as mutações D30N e L90M na análise populacional da protease.

**Tabela 1:** Frequência das mutações de resistência na protease estratificadas pela distribuição no subtipo.

Subtipo	Nº de Sequências	D30N	L90M	D30N + L90M
<b>B</b>	2267 (78,2%)	212	597	41
<b>F1</b>	234 (8,1%)	21	50	1
<b>C</b>	120 (4,1%)	5	23	2
<b>BF1</b>	262 (9,0%)	17	59	6
<b>Outros</b>	15 (0,5%)	0	6	0
<b>Total</b>	2898	255 (8,8%)	735 (25,4%)	<b>50 (1,7%)</b>

Na região da transcriptase reversa fizemos um levantamento do número de TAM que cada sequência apresentava e assim obtivemos os dados da Tabela 2, onde podemos observar que apenas 57 sequências (2,0%) apresentaram as seis TAM.



**Tabela 2:** Número de sequências que apresentaram 1, 2, 3, 4, 5, 6 ou nenhuma TAM.

Número de TAM	Número de Sequências
0	949 (32,7%)
1	246 (8,5%)
2	373 (12,9%)
3	605 (20,9%)
4	530 (18,3%)
5	138 (4,7%)
6	<b>57 (2,0%)</b>

Fizemos também a contagem do número de sequências que apresentavam as TAM e as mutações de resistência (D30N e/ou L90M) na protease, como mostra a tabela 3. Onde podemos observar uma leve tendência da concentração dos maiores números de TAM nos pacientes que apresentam a mutação L90M associada ou não à mutação D30N.

**Tabela 3:** Mutações apresentadas pela análise populacional.

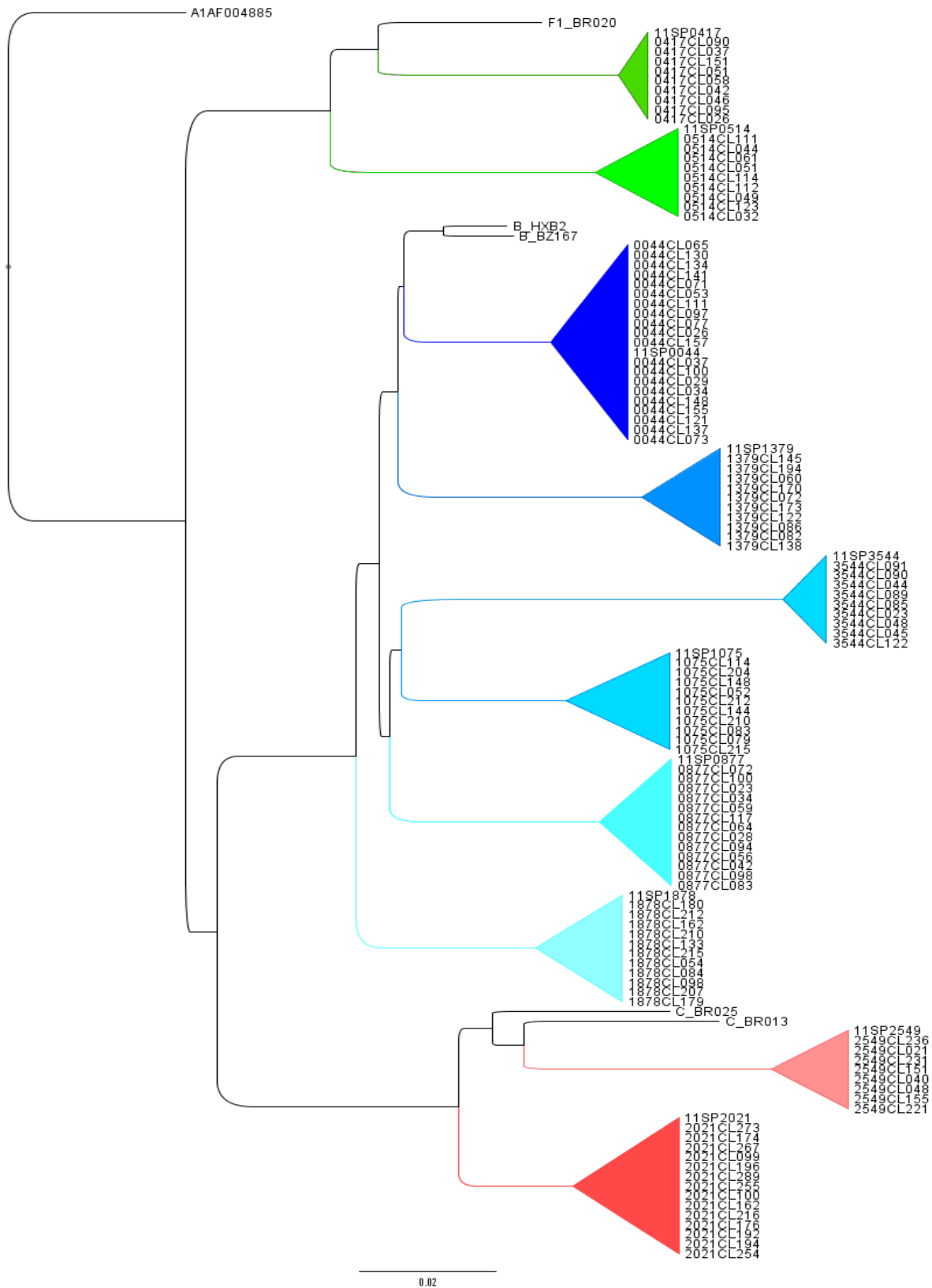
Nº de TAM	30D + 90L (vírus selvagem)	D30N	L90M	D30N + L90M*	Total
0	<b>770 (41,5%)</b>	<b>60 (23,3%)</b>	115 (15,7%)	4 (8%)	949 [32,7%]
1	170 (9,1%)	30 (11,6%)	40 (5,5%)	6 (12%)	246 [8,5%]
2	230 (12,4%)	37 (14,3%)	100 (13,6%)	6 (12%)	373 [12,9%]
3	349 (18,8%)	<b>58 (22,5%)</b>	<b>184 (25,1%)</b>	<b>14 (28%)</b>	605 [20,9%]
4	250 (13,5%)	49 (19%)	<b>217 (29,6%)</b>	<b>14 (28%)</b>	530 [18,3%]
5	65 (3,5%)	16 (6,2%)	53 (7,2%)	4 (8%)	138 [4,7%]
6	23 (1,2%)	8 (3,1%)	24 (3,3%)	2 (4%)	57 [2,0%]
<b>Total</b>	1857 [64,1%]	258 [8,9%]	733 [25,3%]	50 [1,7%]	2898

\*) Neste caso a presença das mutações 30N+90M foi determinada pela análise populacional do vírus.

Dentre as sequências que apresentavam o perfil de mutações do nosso estudo, selecionamos 10 pacientes para analisarmos clonalmente.

Procuramos gerar os clones utilizando o RNA extraído pela metodologia da RENAGENO que gerou a análise genotípica populacional para garantir que as variantes virais observadas na genotipagem padrão fossem representadas clonalmente.

As sequências de cada clone foram editadas, alinhadas, e submetidas à análise filogenética juntamente com sequências referência, como mostra a Figura 3, onde podemos observar que clones provenientes de um mesmo paciente formam grupos restritos, demonstrando que provavelmente todos os clones detectados na população intrapaciente provem de um mesmo ancestral. Além disso, cada paciente reagrupou-se com a sequência referência mais próxima, e assim podemos confirmar que todos os clones dos pacientes 417 e 514 pertencem ao subtipo F1, que os pacientes 2021 e 2549 pertencem ao subtipo C, e que os pacientes 44, 877, 1075, 1379, 1878 e 3544 são subtipo B.



**Figura 7:** Reconstrução Filogenética do gene *pol*. As sequências virais obtidas pelo método padrão (“bulk”, identificada pela inicial 11SP) e seus respectivos clones (número do paciente seguido por “CL”). A árvore foi construída usando o programa Hyphy, pelo método *Neighbour Joining* assumindo o modelo evolutivo GTR.

## 4.2. Resultado dos clones dos pacientes analisados

### Co-ocorrência das mutações D30N e L90M na protease

Para verificar se as mutações D30N e L90M na protease encontram-se num mesmo genoma selecionamos alguns pacientes dentre as 50 sequências que apresentaram ambas as mutações na análise populacional.

Inicialmente, geramos clones de quatro pacientes (44, 1379, 1878 e 2021), que pela análise populacional apresentaram ambiguidade em ambos os códons (D30D/N e L90L/M) sugerindo a presença de populações virais mistas, que continham o aminoácido D ou N no códon 30 e L ou M no códon 90 da protease; escolhemos estes pacientes, pois acreditamos que desta forma estaríamos provocando o encontro do duplo mutante D30N/L90M. Porém ao realizarmos a análise clonal destes pacientes todos os clones se dividiram em populações que continham a mutação D30N e clones que continham a mutação L90M.

Embora estes pacientes fizessem uso do AZT há pelo menos um ano, o paciente 44 não apresentou nenhuma TAM, e os pacientes 1379 e 2021 selecionaram apenas mutações da TAM-2, e o paciente 1878 apresentou apenas a mutação M41L em alguns clones.

Como não foi possível observar ambas as mutações num mesmo genoma nestes quatro pacientes, outros dois pacientes (417 e 1075) foram selecionados, sendo que, pela análise populacional, o paciente 417 apresentava as mutações D30N e L90M sem ambiguidades, e o paciente 1075 apresentava a mutação D30N, porém no códon 90 a ambiguidade sugeria a presença da leucina (L) ou da metionina (M) nesta posição. E finalmente, conseguimos obter em ambos os pacientes (417 e 1075) clones que possuíam ambas as mutações (D30N/L90M).

Portanto, neste estudo, detectamos em dois pacientes (417 e 1075) clones com ambas as mutações (D30N e L90M) num único genoma, porém como descrito anteriormente, estas vieram acompanhadas de mutações compensatórias como N88D e L63P (SUGIURA *et al.*, 2002; ROQUEBERT *et al.*, 2006).

Analisando clonalmente obtivemos os dados apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4:** Distribuição clonal da protease dos seis pacientes analisados.

Paciente (Subtipo)	Mutações principais na protease	Número de clones	Outras Mutações	Número de clones
<b>44 (B)</b>	Nenhuma	2 (10%)	I93L	1
			L63P, I93L	1
	D30N	7 (35%)	L63P, I93L	1
			A71V, I93L	6
			I93L	1
L90M	11 (55%)	L63P, I93L	10	
<b>1379 (B)</b>	D30N	6 (60%)	A71V, N88D, I93L	6
	L90M	4 (40%)	A71V, I93L	4
<b>1878 (B)</b>	D30N	3 (27%)	L63P, N88D, I93L	3
	L90M	8 (73%)	L63P, I93L	8
<b>1075 (B)</b>	D30N	3 (30%)	L63P, A71T, N88D, I93L	3
	D30N + L90M	7 (70%)	L63P, A71T, N88D, I93L	7
<b>417 (F1)</b>	D30N + L90M	9 (100%)	N88D	9
<b>2021 (C)</b>	D30N	9 (64%)	L63P, N88D, I93L	9
	L90M	5 (36%)	L63P, A71V, I93L	5

## Mutações Compensatórias

A substituição L63P é um polimorfismo da protease comum em isolados de pacientes não tratados (KOZAL *et al.*, 1996) previamente conhecido por compensar a redução da infectividade resultante das diversas mutações de resistência (MOLLA *et al.*, 1996). Alguns autores observaram que a mutação L63P recupera completamente a capacidade replicativa viral aos níveis do vírus selvagem quando associada à L90M (MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999; MAMMANO *et al.*, 2000; SUGIURA *et al.*, 2002). No entanto, a adição da mutação L63P ao vírus com a mutação D30N não restabelece a capacidade replicativa viral comparado com o vírus selvagem. Porém, no nosso estudo observamos que este polimorfismo (L63P) pode estar presente tanto em clones com a mutação D30N como em clones com a mutação L90M.

A substituição N88D é essencialmente encontrada em pacientes tratados com NFV (PERRIN e MAMMANO, 2003). Deforche e colaboradores demonstraram através da rede Bayesiana que a mutação D30N tem influência direta protagonista sobre a mutação N88D (DEFORCHE *et al.*, 2007), justificando a alta correlação da mutação N88D com a mutação D30N. Esta combinação das mutações D30N e N88D é a mais comum encontrada em pacientes tratados com NFV, esta associação torna o vírus mais infeccioso do que o vírus que comporta cada uma das mutações isoladamente e tem alta resistência ao NFV (PERRIN e MAMMANO, 2003). A mutação N88D aumenta a estabilidade e, portanto, é selecionada para compensar a perda da capacidade replicativa resultante da mutação D30N (MAHALINGAM *et al.*, 1999). De fato, no nosso estudo quando presente na análise populacional, ao realizar a análise clonal a mutação N88D esteve sempre presente somente nos clones que apresentaram a mutação D30N. Nos dois pacientes (417 e 1075) que apresentaram o duplo mutante D30N/L90M, a mutação N88D também esteve presente em todos os clones. Portanto, a perda da capacidade replicativa causada pela mutação D30N pode ser recuperada pela mutação N88D e esta associação ainda permite que o vírus comporte a mutação L90M (SUGIURA *et al.*, 2002; ROQUEBERT *et al.*, 2006).

A substituição A71V é selecionada por diversos IP (PATICK *et al.*, 1998) e compensa a redução da capacidade replicativa viral, causada pelas mutações D30N e/ou L90M. Porém, está mais associada à mutação D30N, por compensar eficientemente o defeito causado pela mutação D30N, e confere alto nível de resistência ao NFV (6 vezes mais resistente do que o vírus selvagem) (PERRIN e

MAMMANO, 2003). Portanto, o duplo mutante (D30N/A71V) é mais infeccioso e tem alto grau de vantagem seletiva. Também já foi descrito que a mutação L90M associada à mutação A71V reduz a suscetibilidade a diversos IP (MAMMANO *et al.*, 2000). Na nossa análise clonal, observamos que a mutação A71V ocorre somente quando as mutações D30N (paciente 44), ou L90M (paciente 2021) também estão presentes.

### **Mutações na Transcriptase Reversa associadas aos Análogos Timidínicos**

Com a mesma metodologia, decidimos também investigar a presença concomitante das mutações de resistência aos análogos timidínicos (TAM), que consistem em 6 mutações que geralmente se subdividem em TAM-1 (M41L, L210W e T215Y) e TAM-2 (D67N, K70R e K219Q/E) (YAHY *et al.*, 1999; HANNA *et al.*, 2000; MARCELIN *et al.*, 2004). Dentre as 57 sequências que apresentaram na análise populacional as 6 TAM na transcriptase reversa selecionamos 4 pacientes (514, 877, 2549 e 3544).

Todos os clones dos 3 pacientes (514, 2549 e 3544) apresentavam as 6 TAM na mesma molécula genômica do vírus. Na análise populacional todos os 3 pacientes possuíam a mutação L90M na protease, que se manteve presente em todos os clones. Diferentemente dos demais, o paciente 877 apresentou uma população mista com clones possuindo de 4 a 6 TAM, e a mutação L90M presente somente em alguns clones.

A Tabela 5 apresenta os resultados encontrados pela análise clonal dos 4 pacientes estudados, incluímos também dados do paciente 1075 que apresentava 5 TAM, e que também apresentou as mutações D30N e L90M num mesmo clone.

**Tabela 5:** Distribuição clonal dos cinco pacientes analisados para a presença das TAM.

Paciente Subtipo	Mutações de resistência ao NFV	Nº de clones	TAM						Outras Mutações	Nº de clones
			M41	D67	K70	L210	T215	K219		
514 F1	L90M	9 (100%)	L	N	R	W	Y	E	K43E, K122E, E203K	3 (33,3%)
			L	N	R	W	Y	E	K43E, K122E, E203V	6 (66,7%)
2549 C	L90M	8 (100%)	L	N	R	W	F	Q	K122E, E203K, H208Y	4 (50%)
			L	N	R	W	Y	Q	K122E, E203K	2 (25%)
3544 B	L90M	9 (100%)	L	N	R	W	Y	Q	K122E, E203K	2 (25%)
			L	N	R	W	Y	Q	K122P, E203K, H208Y, D218E	9 (100%)
1075 B	D30N	3 (30%)	L	#	#	#	Y	#		1 (10%)
			L	#	#	W	Y	#		3 (30%)
	D30N/L90M	7 (70%)	L	N	#	W	Y	#	K122E	2 (20%)
			L	N	#	#	Y	Q		1 (10%)
			L	N	R	#	Y	Q		2 (20%)
			L	N	R	#	F	Q		1 (10%)
877 B	L90M	3 (23,1%)	L	G	#	W	Y	#		3 (23,1%)
			L	G	#	W	Y	#		1 (7,7%)
	L90M	2 (15,4%)	#	G	R	#	Y	E		3 (23,1%)
			L	G	R	W	Y	#	K122E	1 (7,7%)
	L90M	1 (7,7%)	L	G	R	#	Y	E		1 (7,7%)
			L	S	R	#	Y	E		3 (23,1%)
			L	S	R	W	Y	E		1 (7,7%)
			L	S	R	W	Y	E		1 (7,7%)

#) mutação ausente

O paciente 877 já apresentava ambiguidades na análise populacional, demonstrando a presença de populações mistas, a análise clonal refletiu esta observação nos clones que apresentaram proporções e combinações diversas das TAM sugerindo que este paciente está em transição, onde ainda não se estabeleceu a *quasispécie* dominante.

Neste estudo, encontramos as seis TAM em todos os clones de 3 pacientes (514, 2549 e 3544) e um quarto paciente (877) apresentou uma população mista onde somente um dos clones amplificados apresentou as 6 TAM.





Um dos aspectos mais relevantes da infecção pelo HIV é o seu potencial de diversificação no paciente (HOLMES *et al.*, 1992; BROWN, 1997). A dinâmica evolutiva do HIV caracteriza-se por fatores como: (1) altas taxas de erro da RT (1,3 a 2,5 x 10<sup>-4</sup> (BEBENEK *et al.*, 1989), (2) tempo de geração de 1,47 dia (PERELSON *et al.*, 1996; FU, 2001), (3) replicação constante durante o período de infecção (COFFIN, 1995) e (4) altas taxas de recombinação (ROBERTSON *et al.*, 1995).

Estes fatores relativos à biologia evolutiva do HIV, quando combinados, culminam em um dos processos mais rápidos de acúmulo de diversidade entre os vírus de RNA (ROUZINE e COFFIN, 1999).

Todo esse potencial de geração de diversidade possibilita ao HIV-1 uma extraordinária flexibilidade permitindo que se adapte rapidamente a uma variedade de pressões seletivas, evitando o reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro, incluindo o escape das respostas imune humoral (RICHMAN *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2003) e T-citotóxica (CTL) (BORROW *et al.*, 1997; CAO *et al.*, 2003), as implicações disso constituem um dos maiores obstáculos para a implementação de estratégias vacinais (GASCHEN *et al.*, 2002). Além de ser um fator muito importante na geração de variantes resistentes a todos os medicamentos antirretrovirais atualmente disponíveis (RIBEIRO e BONHOEFFER, 2000; JOHNSON *et al.*, 2008).

Em adição, populações constantemente expostas aos antirretrovirais podem favorecer o surgimento de linhagens de HIV-1 resistentes aos ARV, as quais podem se propagar (iniciar novas infecções) mesmo em indivíduos ainda não expostos ao tratamento antiviral (HUE *et al.*, 2009).

A evolução do HIV-1 sob pressão seletiva quimioterápica *in vivo* envolve uma complexa interação entre um aumento da importância da resistência aos medicamentos e mudanças na capacidade replicativa viral.

Embora a maioria das mutações tenha efeitos deletérios na replicação viral e seja eliminada pela seleção negativa (DOMINGO e HOLLAND, 1997), o HIV-1 exibe uma marcante plasticidade genômica com pouquíssimas posições nucleotídicas conservadas no genoma (COFFIN, 1995). Conseqüentemente, as populações HIV-1 podem existir como uma colônia de mutantes complexos chamada *quasispecie* (DOMINGO *et al.*, 1997).

De acordo com a pressão seletiva de determinados medicamentos, algumas mutações específicas tendem a emergir seguindo vias mutacionais distintas. As mutações que seguem vias mutacionais distintas raramente ocorrem simultaneamente

em uma mesma molécula genômica. Nesse contexto, investigamos, através de técnicas que amplificam individualmente moléculas únicas de DNA, se as mutações pertencentes a vias mutacionais distintas tanto na protease quanto na transcriptase reversa estão presentes num mesmo genoma viral.

Com relação à interação das mutações que conferem resistência antirretroviral, temos que na protease a mutação D30N, uma mutação que confere resistência primária ao NFV, é altamente específica a este inibidor (MARKOWITZ *et al.*, 1998; PATICK *et al.*, 1998). Como a mutação D30N não confere resistência a outros IP além do NFV, pacientes em falha virológica ao NFV geralmente mantêm suscetibilidade a outros medicamentos desta classe. Por outro lado, vírus que apresentam a mutação L90M, quando presente em combinação com mutações adicionais (M46I, I54V, A71V, V82A, e/ou I84V), demonstraram redução na suscetibilidade a diversos IP incluindo NFV, IDV, e SQV (ROBERTS, 1995; VASUDEVACHARI *et al.*, 1996; MARKOWITZ *et al.*, 1998; VAILLANCOURT *et al.*, 1999; HIRSCH *et al.*, 2000; GROSSMAN *et al.*, 2004).

Isoladamente as mutações D30N e L90M não comprometem a atividade da protease em grau significativo, por isso cada mutação é selecionada frequentemente, mas a combinação não. O par de mutações D30N/L90M é incompatível, pois causa quase a eliminação completa da infectividade e capacidade de replicação, por isso são raramente encontrados *in vivo* (SUGIURA *et al.*, 2002; PERRIN e MAMMANO, 2003). Algumas mutações compensatórias, como N88D, A71V e o polimorfismo L63P, recuperam amplamente a capacidade replicativa do duplo mutante (SUGIURA *et al.*, 2002; PERRIN e MAMMANO, 2003).

A mutação D30N confere alta resistência ao NFV, 3,6 vezes maior do que o vírus selvagem na presença do NFV, aumentando para 6 vezes quando associada à mutação A71V (SUGIURA *et al.*, 2002; PERRIN e MAMMANO, 2003); porém reduz a atividade da protease e o crescimento viral (redução da adaptabilidade replicativa) comparado ao vírus do tipo selvagem (MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999; SUGIURA *et al.*, 2002). Enquanto que a mutação L90M permite a preservação da infectividade; o nível de suscetibilidade conferido pela mutação L90M tem sido relatado como sendo menos significativo do que a conferida pela D30N (MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999; MAMMANO *et al.*, 2000; SUGIURA *et al.*, 2002). Portanto, a seleção inicial da mutação D30N resulta no encaminhamento para uma via evolucionária com uma menor barreira genética para resistência ao NFV.

Em nossos resultados, constatamos em alguns pacientes que a terapia com NFV pode selecionar cepas com a mutação D30N, com a L90M ou com ambas as mutações juntas num mesmo genoma. De fato, Perrin e Mammano descreveram que ambos os vírus com as mutações únicas D30N ou L90M conferiram vantagem seletiva ao vírus na presença do NFV (PERRIN e MAMMANO, 2003).

Neste estudo, detectamos em dois pacientes (417 e 1075) clones com ambas as mutações (D30N e L90M) num único genoma, porém como descrito anteriormente, estas vieram acompanhadas de mutações compensatórias como N88D e L63P.

Sugiura e colaboradores observaram que em pacientes com falha virológica ao NFV, a aquisição da mutação D30N foi fortemente suprimida quando a L90M preexistia, que durante o curso da doença clones com as mutações D30N e L90M evoluem independentemente um do outro, e finalmente o duplo mutante D30N/L90M emerge num momento tardio da terapia com NFV. O duplo mutante parece originar da linhagem D30N, mas não da linhagem L90M, ou está fortemente associada a primeira. Clones com a mutação D30N podem adquirir uma mutação adicional L90M muito mais facilmente do que clones com a L90M podem adquirir a mutação D30N (SUGIURA *et al.*, 2002).

Na ausência de mutações compensatórias, a combinação das mutações D30N e L90M dramaticamente reduz a capacidade replicativa viral. Uma mudança aguda da cadeia lateral não polar devido a L90M e a perda da carga negativa devido a D30N pode de alguma forma afetar a interação enzima-substrato.

O duplo mutante D30N+L90M possui baixíssima infectividade e capacidade replicativa, confirmando que a associação destas mutações é prejudicial ao vírus. A combinação da D30N + L90M reprime fortemente a habilidade da protease em processar o precursor p55<sup>gag</sup> em proteínas maduras, e mantém a capacidade de gerar a transcriptase reversa um tanto quanto conservada (SUGIURA *et al.*, 2002).

Mutações compensatórias resgatam em grande parte a capacidade replicativa viral, indicando que o defeito associado com a combinação D30N/L90M também é altamente dependente do contexto e clones com ambas as mutações D30N/L90M podem desenvolver somente sob forte pressão seletiva, possivelmente por aquisição de substituições particulares tais como a N88D e L63P, que provavelmente compensam suficientemente permitindo que a enzima tolere a combinação mutacional deletéria D30N/L90M (SUGIURA *et al.*, 2002; PERRIN e MAMMANO, 2003).

Mutações adicionais podem melhorar a capacidade replicativa destes vírus

mutantes resistentes aos medicamentos e podem, portanto, reduzir a barreira genética, reforçando a noção que o contexto genético do vírus pode substancialmente influenciar no impacto das mutações de resistência.

Mutações nos códons 63 e 71 da protease melhoram a processividade da PR para compensar a diminuição do *fitness* associada às mutações de resistência aos IP.

O códon 63 é altamente polimórfico. A substituição L63P é um polimorfismo da protease comum em isolados não tratados (KOZAL *et al.*, 1996), que compensa a perda de infectividade resultante de diversas mutações na protease (MOLLA *et al.*, 1996); e recupera completamente a capacidade replicativa viral aos níveis do vírus selvagem quando associada à mutação L90M. Porém, a adição da substituição L63P ao vírus que contém a mutação D30N não restabelece a capacidade replicativa viral perdida, quando comparado com a do vírus selvagem (MARTINEZ-PICADO *et al.*, 1999).

A mutação A71V/T ocorre em 10% dos pacientes não tratados, e em maior proporção em pacientes tratados. Segundo Perrin e Mammano, a mutação A71V é selecionada por diversos IP; e a adição da mutação A71V ao vírus com a mutação D30N compensa eficientemente o defeito causado pela mutação D30N (PERRIN e MAMMANO, 2003).

Esta associação positiva foi observada no paciente 44, onde 10 clones continham a mutação L90M e L63P, somente 1 clone com a D30N e L63P e 6 clones com a D30N associada a A71V. Porém outros 3 pacientes (1878, 2021 e 1075) apresentaram todos os clones com a L63P, seja com a D30N ou com a L90M.

A N88D é uma substituição essencialmente encontrada em pacientes tratados com NFV, e na ausência de outras mutações confere notável perda da capacidade replicativa. A aquisição de uma carga negativa devido a N88D pode compensar a perda de uma carga negativa no códon 30 devido à mudança de D para N. A associação da D30N com a N88D tornaria o vírus mais infeccioso do que os vírus contendo uma ou outra destas mutações isoladamente; estando de acordo com a ideia que a N88D é selecionada para compensar a perda da capacidade replicativa resultante da D30N (PERRIN e MAMMANO, 2003). O códon 30 está localizado no sub-sítio S2 da protease (PATICK *et al.*, 1998) e o códon 90 não está localizado neste sub-sítio. Tridimensionalmente na protease, o códon 88 está localizado entre os códons 30 e 90, e a mutação N88D seria portanto compensatória. De fato, nossos resultados mostram que a N88D, quando presente, esteve sempre associada aos clones com a D30N.

Utilizando a mesma metodologia de amplificação clonal, fizemos estudos semelhantes na região da transcriptase reversa. Análogos timidínicos como o AZT e o d4T podem selecionar mutações nos códons 41, 67, 70, 210, 215, e 219 da transcriptase reversa do HIV-1, conhecidas como mutações associadas aos análogos timidínicos (TAM). As TAM podem ser divididas em 2 grupos distintos: TAM-1 (M41L, T210W e T215Y, e às vezes D67N) e TAM-2 (D67N, K70R e K219Q, e às vezes T215F) (YAHN *et al.*, 1999; HANNA *et al.*, 2000; MARCELIN *et al.*, 2004). Esta divisão tem importância clínica, pois vírus resistentes ao AZT portando as mutações da TAM-1 têm resistência cruzada à didanosina e ao tenofovir, enquanto que vírus portando as mutações da TAM-2 geralmente permanecem suscetíveis a estes medicamentos (MILLER *et al.*, 2004; MARCELIN *et al.*, 2005).

Porém Dunn e colaboradores encontraram 116 padrões distintos de TAM em 2379 sequências e 40% destas sequências continham mutações de ambas as vias, considerando a D67N a mais transitória entre os grupos (DUNN *et al.*, 2005). No nosso estudo as TAM também estiveram presentes em diferentes padrões, nos pacientes 877 e 1075 as TAM apresentaram-se distribuídas diversificadamente, enquanto que nos outros três pacientes analisados (514, 2549 e 3544) as 6 TAM apresentaram-se uniformemente em todos os clones analisados. Com o acúmulo das TAM também observamos o aumento do número de mutações acessórias, como já fora descrito por Cane e colaboradores (CANE *et al.*, 2007). Uma possível justificativa para esta seleção de cepas comportando inúmeras mutações (K43E, K122E, E203K/V, H208Y, D218E) que ocorrem em combinação com diversas mutações de resistência aos ITRN, além das mutações características que são responsáveis pelo aumento da resistência ao análogo timidínico, seria o uso prolongado de ARV (superior a 4 anos) além da utilização alternada dos análogos timidínicos entre os pacientes (SVICHER *et al.*, 2006). Os pacientes 877 e 1075 apresentaram a mutação K122E e distribuição diversificada das TAM nos clones amplificados, estes pacientes utilizaram somente o AZT como ITRN análogo timidínico. Os outros três pacientes analisados (514, 2549 e 3544) apresentaram além da mutação K122E, as mutações K43E, E203K/V, H208Y e D218E que estão associadas à prolongada exposição ao ARV, alta resistência ao análogo timidínico e alta viremia com baixa contagem de células T CD4+ (SVICHER *et al.*, 2006). De fato estes pacientes fizeram uso de análogos timidínicos por mais de 5 anos variando entre o AZT e o d4T. Uma análise mais apurada e com maior amostragem faz-se necessária para confirmar esta correlação.

A uniformidade e predominância dos clones sugerem que, em alguns pacientes (417, 514, 2549 e 3544), no momento da análise clonal amplificamos a população que foi selecionada e expandiu-se, tornando-se majoritária.

O paciente 2549 apresentou as 6 TAM em todos os clones, porém somente dois clones continham a mutação T215Y, os demais clones tinham nesta posição a mutação T215F. Estudos de mutagênese em combinação com ensaios de crescimento competitivo mostraram que cepas virais com a mutação T215F tiveram uma menor capacidade replicativa do que a variante com a T215Y na presença da M41L e L210W (HU *et al.*, 2006).

Todos os clones amplificados dos pacientes 417 e 514 possuem a mutação T215Y. Na análise nucleotídica, observamos que a trinca que codifica para a tirosina (Y) é TAT em vez da comumente observada TAC, esta diferença pode estar relacionada ao polimorfismo próprio do subtipo, uma vez que ambos estão infectados por vírus subtipo F1.

No paciente 1075 notamos que os clones que apresentaram as mutações D30N e L90M juntos na protease, também foram os que apresentaram maior número de TAM na transcriptase reversa, sugerindo que o paciente que se encontra em falha virológica tende a selecionar os clones que acumulam maior número de mutações.

As mutações predominantemente influenciam na resistência viral, apesar da perda da capacidade replicativa (MAMMANO *et al.*, 2000) e a capacidade replicativa é recuperada, pelo menos parcialmente, pelas mutações compensatórias (NIJHUIS *et al.*, 1999; MAMMANO *et al.*, 2000). As mutações compensatórias também ajudam no aumento da resistência (NIJHUIS *et al.*, 1999) e a perda da capacidade replicativa geralmente aumenta com o aumento do número de mutações e aumento do nível de resistência (BARBOUR *et al.*, 2002).

Neste estudo, observamos que as mutações pertencentes a vias mutacionais distintas (D30N e L90M na protease; e as 6 TAM na transcriptase reversa), ainda que raras, devido à correlação negativa, podem ser observadas numa mesma cepa viral e somente são selecionadas após forte pressão seletiva associada à falha terapêutica.

A metodologia de análise clonal apesar de laboriosa foi escolhida para o nosso trabalho por ser uma ferramenta capaz de representar e estratificar as diversas populações (*quasispécies*) presentes no paciente que somente são observadas de forma global na análise genotípica padrão. Portanto, na análise genotípica padrão a sequência viral observada, é um consenso das diversas populações presentes naquele

indivíduo, que pode ser uma representação da população majoritária presente naquele momento, ou uma mistura de diversas populações minoritárias, que se dividem em pequenos grupos na análise clonal.

Apesar da técnica de clonagem em bactéria ser capaz de gerar muitos clones, de forma mais rápida, escolhemos a clonagem por diluição, para evitarmos a recombinação *in vitro* e que determinadas populações virais fossem selecionadas na PCR que precede a clonagem em bactéria. Além disso, a clonagem por diluição é capaz de representar populações minoritárias que não podem ser observadas na análise populacional nem na clonagem por bactéria.

Conhecendo-se a técnica, já era de nosso conhecimento a dificuldade em gerar os clones, pois a PCR em duas etapas com diluição limitante não é uma técnica facilmente reprodutível. Portanto, sendo esta dificuldade a responsável pela baixa amostragem seja pelo número de pacientes, bem como pelo número de clones gerados, o que impossibilitou uma análise mais apurada.





Neste estudo, apesar da correlação negativa, observamos que as mutações D30N e L90M da protease podem coexistir num mesmo genoma na população viral intrapaciente. Igualmente, observamos que as seis TAM também podem coexistir num mesmo genoma. Porém como as mutações de vias distintas estão negativamente correlacionadas estas são selecionadas num mesmo genoma após forte pressão seletiva resultante da falha virológica.

A análise clonal apesar de laboriosa e onerosa comparativamente à análise genotípica padrão, que representa uma análise populacional é mais informativa, pois possibilita observar a diversidade e distribuição das mutações de resistência, refletindo o padrão evolucionário das *quasispecies* virais presentes naquele indivíduo. Portanto, na análise genotípica padrão a sequência viral observada, é um consenso das diversas populações presentes naquele indivíduo, que pode ser uma representação da população majoritária presente naquele momento, ou representar uma mistura de diversas populações minoritárias, que se dividem em pequenos grupos na análise clonal.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOVINI, A. e YOUNG, R. A. Development of a BCG recombinant vehicle for candidate AIDS vaccines. Int Rev Immunol, v.7, n.1, p.79-83. 1990.

ARION, D., KAUSHIK, N., MCCORMICK, S., BORKOW, G. e PARNIAK, M. A. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. Biochemistry, v.37, n.45, Nov 10, p.15908-17. 1998.

BARBOUR, J. D., WRIN, T., GRANT, R. M., MARTIN, J. N., SEGAL, M. R., PETROPOULOS, C. J., *et al.* Evolution of phenotypic drug susceptibility and viral replication capacity during long-term virologic failure of protease inhibitor therapy in human immunodeficiency virus-infected adults. J Virol, v.76, n.21, Nov, p.11104-12. 2002.

BARRE-SINOUSSE, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, v.220, n.4599, May 20, p.868-71. 1983.

BAXTER, J. D., MAYERS, D. L., WENTWORTH, D. N., NEATON, J. D., HOOVER, M. L., WINTERS, M. A., *et al.* A randomized study of antiretroviral management based on plasma genotypic antiretroviral resistance testing in patients failing therapy. CPCRA 046 Study Team for the Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. AIDS, v.14, n.9, Jun 16, p.F83-93. 2000.

BEBENEK, K., ABBOTTS, J., ROBERTS, J. D., WILSON, S. H. e KUNKEL, T. A. Specificity and mechanism of error-prone replication by human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. J Biol Chem, v.264, n.28, Oct 5, p.16948-56. 1989.

BORROW, P., LEWICKI, H., WEI, X., HORWITZ, M. S., PEFFER, N., MEYERS, H., *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. Nat Med, v.3, n.2, Feb, p.205-11. 1997.

BOUCHER, C. A., O'SULLIVAN, E., MULDER, J. W., RAMAUTARSING, C., KELLAM, P., DARBY, G., *et al.* Ordered appearance of zidovudine resistance mutations during treatment of 18 human immunodeficiency virus-positive subjects. J Infect Dis, v.165, n.1, Jan, p.105-10. 1992.

BOYER, P. L., SARAFIANOS, S. G., ARNOLD, E. e HUGHES, S. H. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. J Virol, v.75, n.10, May, p.4832-42. 2001.

BROWN, A. J. Resistance, recombination, evolution--and chance: an interview with Andrew J. Leigh Brown, PhD. Interview by Mark Mascolini. J Int Assoc Physicians AIDS Care, v.3, n.7, Jul, p.34-7. 1997.

CANE, P. A., GREEN, H., FEARNHILL, E. e DUNN, D. Identification of accessory mutations associated with high-level resistance in HIV-1 reverse transcriptase. AIDS, v.21, n.4, Feb 19, p.447-55. 2007.

CAO, J., MCNEVIN, J., MALHOTRA, U. e MCELRATH, M. J. Evolution of CD8+ T cell immunity and viral escape following acute HIV-1 infection. J Immunol, v.171, n.7, Oct 1, p.3837-46. 2003.

CARPENTER, C. C., FISCHL, M. A., HAMMER, S. M., HIRSCH, M. S., JACOBSEN, D. M., KATZENSTEIN, D. A., *et al.* Antiretroviral therapy for HIV infection in 1997. Updated recommendations of the International AIDS Society-USA panel. JAMA, v.277, n.24, Jun 25, p.1962-9. 1997.

CHARPENTIER, C., DWYER, D. E., MAMMANO, F., LECOSSIER, D., CLAVEL, F. e HANCE, A. J. Role of minority populations of human immunodeficiency virus type 1 in the evolution of viral resistance to protease inhibitors. J Virol, v.78, n.8, Apr, p.4234-47. 2004.

CHATTERJEE, S., BASAK, S. e KHAN, N. C. Morphogenesis of human immunodeficiency virus type 1. Pathobiology, v.60, n.4, p.181-6. 1992.

CHEN, L. F., HOY, J. e LEWIN, S. R. Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. Med J Aust, v.186, n.3, Feb 5, p.146-51. 2007.

CHOW, Y. K., HIRSCH, M. S., MERRILL, D. P., BECHTEL, L. J., ERON, J. J., KAPLAN, J. C., *et al.* Use of evolutionary limitations of HIV-1 multidrug resistance to optimize therapy. Nature, v.361, n.6413, Feb 18, p.650-4. 1993.

CLAPHAM, P. R. HIV and chemokines: ligands sharing cell-surface receptors. Trends Cell Biol, v.7, n.7, Jul, p.264-8. 1997.

CLARKE, D. K., DUARTE, E. A., MOYA, A., ELENA, S. F., DOMINGO, E. e HOLLAND, J. Genetic bottlenecks and population passages cause profound fitness differences in RNA viruses. J Virol, v.67, n.1, Jan, p.222-8. 1993.

CLARKE, D. K., DUARTE, E. A., ELENA, S. F., MOYA, A., DOMINGO, E. e HOLLAND, J. The red queen reigns in the kingdom of RNA viruses. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.11, May 24, p.4821-4. 1994.

CLAVEL, F., GUETARD, D., BRUN-VEZINET, F., CHAMARET, S., REY, M. A., SANTOS-FERREIRA, M. O., *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science, v.233, n.4761, Jul 18, p.343-6. 1986.

COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J. A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., *et al.* What to call the AIDS virus? Nature, v.321, n.6065, May 1-7, p.10. 1986.

COFFIN, J. M. Genetic diversity and evolution of retroviruses. Curr Top Microbiol Immunol, v.176, p.143-64. 1992.

COFFIN. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. Science, v.267, n.5197, Jan 27, p.483-9. 1995.

COHEN, E. A., DEHNI, G., SODROSKI, J. G. e HASELTINE, W. A. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. J Virol, v.64, n.6, Jun, p.3097-9. 1990.

COZZI-LEPRI, A., RUIZ, L., LOVEDAY, C., PHILLIP, A. N., CLOTET, B., REISS, P., *et al.* Thymidine analogue mutation profiles: factors associated with acquiring specific profiles and their impact on the virological response to therapy. Antivir Ther, v.10, n.7, p.791-802. 2005.

DEBOUCK, C. The HIV-1 protease as a therapeutic target for AIDS. AIDS Res Hum Retroviruses, v.8, n.2, Feb, p.153-64. 1992.

DEFORCHE, K., CAMACHO, R., GROSSMAN, Z., SILANDER, T., SOARES, M. A., MOREAU, Y., *et al.* Bayesian network analysis of resistance pathways against HIV-1 protease inhibitors. Infect Genet Evol, v.7, n.3, Jun, p.382-90. 2007.

DEGRUTTOLA, V., DIX, L., D'AQUILA, R., HOLDER, D., PHILLIP, A., AIT-KHALED, M., *et al.* The relation between baseline HIV drug resistance and response to antiretroviral therapy: re-analysis of retrospective and prospective studies using a standardized data analysis plan. Antivir Ther, v.5, n.1, Mar, p.41-8. 2000.

DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. Nature, v.381, n.6584, Jun 20, p.661-6. 1996.

DEVAL, J., WHITE, K. L., MILLER, M. D., PARKIN, N. T., COURCAMBECK, J., HALFON, P., *et al.* Mechanistic basis for reduced viral and enzymatic fitness of HIV-1 reverse transcriptase containing both K65R and M184V mutations. J Biol Chem, v.279, n.1, Jan 2, p.509-16. 2004.

DOMINGO, E. e HOLLAND, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. Annu Rev Microbiol, v.51, p.151-78. 1997.

DOMINGO, E., MENENDEZ-ARIAS, L. e HOLLAND, J. J. RNA virus fitness. Rev Med Virol, v.7, n.2, Jul, p.87-96. 1997.

FU, Y. X. Estimating mutation rate and generation time from longitudinal samples of DNA sequences. Mol Biol Evol, v.18, n.4, Apr, p.620-6. 2001.

GASCHEN, B., TAYLOR, J., YUSIM, K., FOLEY, B., GAO, F., LANG, D., *et al.* Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. Science, v.296, n.5577, Jun 28, p.2354-60. 2002.

GELDERBLOM, H. R., OZEL, M. e PAULI, G. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. Arch Virol, v.106, n.1-2, p.1-13. 1989.

GONZALES, M. J., MACHEKANO, R. N. e SHAFER, R. W. Human immunodeficiency virus type 1 reverse-transcriptase and protease subtypes: classification, amino acid mutation patterns, and prevalence in a northern California clinic-based population. J Infect Dis, v.184, n.8, Oct 15, p.998-1006. 2001.

GONZALES, M. J., JOHNSON, E., DUPNIK, K. M., IMAMICHI, T. e SHAFER, R. W. Colinearity of reverse transcriptase inhibitor resistance mutations detected by population-based sequencing. J Acquir Immune Defic Syndr, v.34, n.4, Dec 1, p.398-402. 2003.

GOTTLINGER, H. G., SODROSKI, J. G. e HASELTINE, W. A. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.15, Aug, p.5781-5. 1989.

GROSSMAN, Z., PAXINOS, E. E., AVERBUCH, D., MAAYAN, S., PARKIN, N. T., ENGELHARD, D., *et al.* Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. Antimicrob Agents Chemother, v.48, n.6, Jun, p.2159-65. 2004.

HANNA, G. J., JOHNSON, V. A., KURITZKES, D. R., RICHMAN, D. D., BROWN, A. J., SAVARA, A. V., *et al.* Patterns of resistance mutations selected by treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection with zidovudine, didanosine, and nevirapine. J Infect Dis, v.181, n.3, Mar, p.904-11. 2000.

HARRIGAN, P. R., BLOOR, S. e LARDER, B. A. Relative replicative fitness of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 isolates in vitro. J Virol, v.72, n.5, May, p.3773-8. 1998.

HIRSCH, M. S., CONWAY, B., D'AQUILA, R. T., JOHNSON, V. A., BRUN-VEZINET, F., CLOTET, B., *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel. JAMA, v.279, n.24, Jun 24, p.1984-91. 1998.

HIRSCH, M. S., BRUN-VEZINET, F., D'AQUILA, R. T., HAMMER, S. M., JOHNSON, V. A., KURITZKES, D. R., *et al.* Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: recommendations of an International AIDS Society-USA Panel. JAMA, v.283, n.18, May 10, p.2417-26. 2000.

HO, D. D., NEUMANN, A. U., PERELSON, A. S., CHEN, W., LEONARD, J. M. e MARKOWITZ, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. Nature, v.373, n.6510, Jan 12, p.123-6. 1995.

HOLLAND, J. J., DE LA TORRE, J. C., CLARKE, D. K. e DUARTE, E. Quantitation of relative fitness and great adaptability of clonal populations of RNA viruses. J Virol, v.65, n.6, Jun, p.2960-7. 1991.



HOLMES, E. C., ZHANG, L. Q., SIMMONDS, P., LUDLAM, C. A. e BROWN, A. J. Convergent and divergent sequence evolution in the surface envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 within a single infected patient. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.11, Jun 1, p.4835-9. 1992.

HU, Z., GIGUEL, F., HATANO, H., REID, P., LU, J. e KURITZKES, D. R. Fitness comparison of thymidine analog resistance pathways in human immunodeficiency virus type 1. J Virol, v.80, n.14, Jul, p.7020-7. 2006.

HUE, S., GIFFORD, R. J., DUNN, D., FERNHILL, E. e PILLAY, D. Demonstration of sustained drug-resistant human immunodeficiency virus type 1 lineages circulating among treatment-naive individuals. J Virol, v.83, n.6, Mar, p.2645-54. 2009.

JOHNSON, V. A., BRUN-VEZINET, F., CLOTET, B., GUNTARD, H. F., KURITZKES, D. R., PILLAY, D., *et al.* Update of the Drug Resistance Mutations in HIV-1. Top HIV Med, v.16, n.5, Dec, p.138-45. 2008.

JUNG, A., MAIER, R., VARTANIAN, J. P., BOCHAROV, G., JUNG, V., FISCHER, U., *et al.* Multiply infected spleen cells in HIV patients. Nature, v.418, n.6894, Jul 11, p.144. 2002.

KELLAM, P., BOUCHER, C. A. e LARDER, B. A. Fifth mutation in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase contributes to the development of high-level resistance to zidovudine. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.5, Mar 1, p.1934-8. 1992.

KLIMKAIT, T., STREBEL, K., HOGGAN, M. D., MARTIN, M. A. e ORENSTEIN, J. M. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. J Virol, v.64, n.2, Feb, p.621-9. 1990.

KOHL, N. E., EMINI, E. A., SCHLEIF, W. A., DAVIS, L. J., HEIMBACH, J. C., DIXON, R. A., *et al.* Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. Proc Natl Acad Sci U S A, v.85, n.13, Jul, p.4686-90. 1988.

KOZAL, M. J., SHAH, N., SHEN, N., YANG, R., FUCINI, R., MERIGAN, T. C., *et al.* Extensive polymorphisms observed in HIV-1 clade B protease gene using high-density oligonucleotide arrays. Nat Med, v.2, n.7, Jul, p.753-9. 1996.

LANIER, E. R., GIVENS, N., STONE, C., GRIFFIN, P., GIBB, D., WALKER, S., *et al.* Effect of concurrent zidovudine use on the resistance pathway selected by abacavir-containing regimens. HIV Med, v.5, n.6, Nov, p.394-9. 2004.

LARDER, B. A. e KEMP, S. D. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). Science, v.246, n.4934, Dec 1, p.1155-8. 1989.

LIU, H., WU, X., NEWMAN, M., SHAW, G. M., HAHN, B. H. e KAPPES, J. C. The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures. J Virol, v.69, n.12, Dec, p.7630-8. 1995.

MAHALINGAM, B., LOUIS, J. M., REED, C. C., ADOMAT, J. M., KROUSE, J., WANG, Y. F., *et al.* Structural and kinetic analysis of drug resistant mutants of HIV-1 protease. Eur J Biochem, v.263, n.1, Jul, p.238-45. 1999.

MAMMANO, F., PETIT, C. e CLAVEL, F. Resistance-associated loss of viral fitness in human immunodeficiency virus type 1: phenotypic analysis of protease and gag coevolution in protease inhibitor-treated patients. J Virol, v.72, n.9, Sep, p.7632-7. 1998.

MAMMANO, F., TROUPLIN, V., ZENNOU, V. e CLAVEL, F. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. J Virol, v.74, n.18, Sep, p.8524-31. 2000.

MANSKY, L. M. e TEMIN, H. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. J Virol, v.69, n.8, Aug, p.5087-94. 1995.

MARCELIN, A. G., FLANDRE, P., PAVIE, J., SCHMIDELY, N., WIRDEN, M., LADA, O., *et al.* Clinically relevant genotype interpretation of resistance to didanosine. Antimicrob Agents Chemother, v.49, n.5, May, p.1739-44. 2005.

MARKOWITZ, M., CONANT, M., HURLEY, A., SCHLUGER, R., DURAN, M., PETERKIN, J., *et al.* A preliminary evaluation of nelfinavir mesylate, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV)-1 protease, to treat HIV infection. J Infect Dis, v.177, n.6, Jun, p.1533-40. 1998.

MARTINEZ-PICADO, J., SAVARA, A. V., SUTTON, L. e D'AQUILA, R. T. Replicative fitness of protease inhibitor-resistant mutants of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, v.73, n.5, May, p.3744-52. 1999.

MEYER, P. R., MATSUURA, S. E., MIAN, A. M., SO, A. G. e SCOTT, W. A. A mechanism of AZT resistance: an increase in nucleotide-dependent primer unblocking by mutant HIV-1 reverse transcriptase. Mol Cell, v.4, n.1, Jul, p.35-43. 1999.

MILLER, M. D., MARGOT, N., LU, B., ZHONG, L., CHEN, S. S., CHENG, A., *et al.* Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. J Infect Dis, v.189, n.5, Mar 1, p.837-46. 2004.

MITSUYA, Y., WINTERS, M. A., FESSEL, W. J., RHEE, S. Y., HURLEY, L., HORBERG, M., *et al.* N88D facilitates the co-occurrence of D30N and L90M and the development of multidrug resistance in HIV type 1 protease following nelfinavir treatment failure. AIDS Res Hum Retroviruses, v.22, n.12, Dec, p.1300-5. 2006.

MOLLA, A., KORNEYEVA, M., GAO, Q., VASAVANONDA, S., SCHIPPER, P. J., MO, H. M., *et al.* Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. Nat Med, v.2, n.7, Jul, p.760-6. 1996.

NEGRONI, M. e BUC, H. Mechanisms of retroviral recombination. Annu Rev Genet, v.35, p.275-302. 2001.

NIJHUIS, M., SCHUURMAN, R., DE JONG, D., ERICKSON, J., GUSTCHINA, E., ALBERT, J., *et al.* Increased fitness of drug resistant HIV-1 protease as a result of acquisition of compensatory mutations during suboptimal therapy. AIDS, v.13, n.17, Dec 3, p.2349-59. 1999.

PALELLA, F. J., JR., DELANEY, K. M., MOORMAN, A. C., LOVELESS, M. O., FUHRER, J., SATTEN, G. A., *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. N Engl J Med, v.338, n.13, Mar 26, p.853-60. 1998.

PATICK, A. K., DURAN, M., CAO, Y., SHUGARTS, D., KELLER, M. R., MAZABEL, E., *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir. Antimicrob Agents Chemother, v.42, n.10, Oct, p.2637-44. 1998.

PENG, C., HO, B. K., CHANG, T. W. e CHANG, N. T. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. J Virol, v.63, n.6, Jun, p.2550-6. 1989.

PERELSON, A. S., NEUMANN, A. U., MARKOWITZ, M., LEONARD, J. M. e HO, D. D. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science, v.271, n.5255, Mar 15, p.1582-6. 1996.

PERRIN, V. e MAMMANO, F. Parameters driving the selection of nelfinavir-resistant human immunodeficiency virus type 1 variants. J Virol, v.77, n.18, Sep, p.10172-5. 2003.

PIENIAZEK, D., PERALTA, J. M., FERREIRA, J. A., KREBS, J. W., OWEN, S. M., SION, F. S., *et al.* Identification of mixed HIV-1/HIV-2 infections in Brazil by polymerase chain reaction. AIDS, v.5, n.11, Nov, p.1293-9. 1991.

PRESTON, B. D., POIESZ, B. J. e LOEB, L. A. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. Science, v.242, n.4882, Nov 25, p.1168-71. 1988.

RHEE, S. Y., LIU, T. F., HOLMES, S. P. e SHAFER, R. W. HIV-1 subtype B protease and reverse transcriptase amino acid covariation. PLoS Comput Biol, v.3, n.5, May, p.e87. 2007.

RIBEIRO, R. M. e BONHOEFFER, S. Production of resistant HIV mutants during antiretroviral therapy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.14, Jul 5, p.7681-6. 2000.

RICHMAN, D. D. How drug resistance arises. Sci Am, v.279, n.1, Jul, p.88. 1998.

RICHMAN, D. D., WRIN, T., LITTLE, S. J. e PETROPOULOS, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.7, Apr 1, p.4144-9. 2003.

RIZZUTO, C. D., WYATT, R., HERNANDEZ-RAMOS, N., SUN, Y., KWONG, P. D., HENDRICKSON, W. A., *et al.* A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. Science, v.280, n.5371, Jun 19, p.1949-53. 1998.

ROBERTS, J. D., BEBENEK, K. e KUNKEL, T. A. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science, v.242, n.4882, Nov 25, p.1171-3. 1988.

ROBERTS, N. A. Drug-resistance patterns of saquinavir and other HIV proteinase inhibitors. AIDS, v.9 Suppl 2, Dec, p.27-S32. 1995.

ROBERTSON, D. L., SHARP, P. M., MCCUTCHAN, F. E. e HAHN, B. H. Recombination in HIV-1. Nature, v.374, n.6518, Mar 9, p.124-6. 1995

ROBERTSON, D. L., ANDERSON, J. P., BRADAC, J. A., CARR, J. K., FOLEY, B., FUNKHOUSER, R. K., *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. Science, v.288, n.5463, Apr 7, p.55-6. 2000.

ROQUEBERT, B., MALET, I., WIRDEN, M., TUBIANA, R., VALANTIN, M. A., SIMON, A., *et al.* Role of HIV-1 minority populations on resistance mutational pattern evolution and susceptibility to protease inhibitors. AIDS, v.20, n.2, Jan 9, p.287-9. 2006.

ROUZINE, I. M. e COFFIN, J. M. Search for the mechanism of genetic variation in the pro gene of human immunodeficiency virus. J Virol, v.73, n.10, Oct, p.8167-78. 1999.

SAKAI, K., MA, X. Y., GORDIENKO, I. e VOLSKY, D. J. Recombinational analysis of a natural noncytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolate: role of the vif gene in HIV-1 infection kinetics and cytopathicity. J Virol, v.65, n.11, Nov, p.5765-73. 1991.

SHAFER, R. W., WINTERS, M. A., PALMER, S. e MERIGAN, T. C. Multiple concurrent reverse transcriptase and protease mutations and multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. Ann Intern Med, v.128, n.11, Jun 1, p.906-11. 1998.

SIMMONDS, P., BALFE, P., LUDLAM, C. A., BISHOP, J. O. e BROWN, A. J. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, v.64, n.12, Dec, p.5840-50. 1990.

STAMATATOS, L. e CHENG-MAYER, C. Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range, and syncytium-forming ability. J Virol, v.67, n.9, Sep, p.5635-9. 1993.

SUGIURA, W., MATSUDA, Z., YOKOMAKU, Y., HERTOGS, K., LARDER, B., OISHI, T., *et al.* Interference between D30N and L90M in selection and development of protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. Antimicrob Agents Chemother, v.46, n.3, Mar, p.708-15. 2002.

SVICHER, V., SING, T., SANTORO, M. M., FORBICI, F., RODRIGUEZ-BARRIOS, F., BERTOLI, A., *et al.* Involvement of novel human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase mutations in the regulation of resistance to nucleoside inhibitors. J Virol, v.80, n.14, Jul, p.7186-98. 2006.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. e HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, v.25, n.24, Dec 15, p.4876-82. 1997.

VAILLANCOURT, M., IRLBECK, D., SMITH, T., COOMBS, R. W. e SWANSTROM, R. The HIV type 1 protease inhibitor saquinavir can select for multiple mutations that confer increasing resistance. AIDS Res Hum Retroviruses, v.15, n.4, Mar 1, p.355-63. 1999.

VAISHNAV, Y. N. e WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. Annu Rev Biochem, v.60, p.577-630. 1991.

VASUDEVACHARI, M. B., ZHANG, Y. M., IMAMICHI, H., IMAMICHI, T., FALLOON, J. e SALZMAN, N. P. Emergence of protease inhibitor resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients and rapid screening procedure for their detection. Antimicrob Agents Chemother, v.40, n.11, Nov, p.2535-41. 1996.

WEI, X., GHOSH, S. K., TAYLOR, M. E., JOHNSON, V. A., EMINI, E. A., DEUTSCH, P., *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature, v.373, n.6510, Jan 12, p.117-22. 1995.

WEI, X., DECKER, J. M., WANG, S., HUI, H., KAPPES, J. C., WU, X., *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. Nature, v.422, n.6929, Mar 20, p.307-12. 2003.

WHITCOMB, J. M., PARKIN, N. T., CHAPPEY, C., HELLMANN, N. S. e PETROPOULOS, C. J. Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. J Infect Dis, v.188, n.7, Oct 1, p.992-1000. 2003.

YAHY, N., TAMALET, C., TOURRES, C., TIVOLI, N., ARIASI, F., VOLOT, F., *et al.* Mutation patterns of the reverse transcriptase and protease genes in human immunodeficiency virus type 1-infected patients undergoing combination therapy: survey of 787 sequences. J Clin Microbiol, v.37, n.12, Dec, p.4099-106. 1999.

YUSTE, E., SANCHEZ-PALOMINO, S., CASADO, C., DOMINGO, E. e LOPEZ-GALINDEZ, C. Drastic fitness loss in human immunodeficiency virus type 1 upon serial bottleneck events. J Virol, v.73, n.4, Apr, p.2745-51. 1999.

ZENNOU, V., MAMMANO, F., PAULOUS, S., MATHEZ, D. e CLAVEL, F. Loss of viral fitness associated with multiple Gag and Gag-Pol processing defects in human immunodeficiency virus type 1 variants selected for resistance to protease inhibitors in vivo. J Virol, v.72, n.4, Apr, p.3300-6. 1998.