

# Caraterização epidemiológica molecular de HIV em população portuguesa

Relatório provisório de estágio

Licenciatura em Bioquímica

Rodrigo Cordeiro Esperança

Orientador: Nuno Miguel Sampaio Osório

Coorientadora: Estela Maria Bastos Martins De Almeida



Universidade De Trás-Os-Montes E Alto Douro

Vila Real, 2022

# Caraterização epidemiológica molecular de HIV em população portuguesa

Relatório provisório de estágio

Licenciatura em Bioquímica

**Rodrigo Cordeiro Esperança**

Orientador: Nuno Miguel Sampaio Osório

Coorientadora: Estela Maria Bastos Martins De Almeida



Universidade De Trás-Os-Montes E Alto Douro

Vila Real, 2022

**O Orientador de estágio,**

---

Prof. Doutor Nuno Miguel Sampaio Osório  
Escola de Medicina  
Universidade do Minho

**A Coorientadora de estágio,**

---

Prof. Doutora Estela Maria Bastos Martins De Almeida  
Departamento de Genética e Biotecnologia  
Centro de Investigação e de Tecnologias Agroambientais e  
Biológicas

**A Diretora de Curso,**

---

Prof. Doutora M<sup>a</sup> Manuel Oliveira  
Departamento de Química  
Centro de Química

## Agradecimentos

Após a realização deste estágio gostaria de endereçar os meus agradecimentos a quem influenciou positivamente o meu percurso tanto nesta etapa, como ao longo destes anos de licenciatura.

A Vila Real, e à Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, por me acolherem tão bem. Aos professores que fizeram parte deste meu percurso por toda a sabedoria que me transmitiram.

Ao Professor Doutor Nuno Osório, e à Professora Doutora Estela Bastos, meus orientadores, agradeço por toda a disponibilidade, ajuda, dedicação, orientação e conhecimentos partilhados, que foram imprescindíveis para a realização deste estágio.

Um agradecimento especial à Vera Triunfante por toda ajuda e por todo apoio, sempre disponível e pronta para o tudo que eu precisei.

À minha família, pela confiança, pelo apoio incondicional, pela motivação, por estarem sempre do meu lado, por serem o meu maior exemplo, e por tornarem tudo isto possível. A eles devo tudo, e um obrigada nunca chegará.

À Cátia, que sem dúvida nenhuma foi imprescindível nesta etapa da minha vida. A ela agradeço pela motivação, por puxar por mim nos momentos mais difíceis, por toda a paciência, compreensão. Por estar presente em todas as horas, e por acreditar em mim incondicionalmente, um sincero obrigada. À Dani, ao Nuno, à Cátia Azevedo, ao David, à Mia, à Francisca, à Inês, à Flávia, e à Lau por, nunca me terem falhado.

## Resumo

O vírus da imunodeficiência Humana (HIV) é caracterizado por uma extensa variabilidade genética a nível populacional. Com origem em diferentes eventos de transmissão cruzada entre espécies de primatas não humanos a humanos, o HIV foi dividido em quatro grupos, denominados por M, N, O e P, sendo o grupo M o único com uma dispersão mundial. Por terem uma evolução divergente, os vírus deste grupo foram divididos em nove subtipos (A a D, F a H, J e K) e subsubtipos (por exemplo, A1, A2).

O vírus em estudo possui uma capacidade de mutação elevada, tornando-se num desafio crucial para o desenvolvimento de estratégias de controlo eficazes, sendo que continua a representar uma pandemia mortal em humanos. Devido à predominância do vírus HIV-1 subtipo B, na Europa Ocidental, estima-se que foi o primeiro subtipo a surgir nesta região. No entanto, o padrão de variabilidade de subtipos do HIV-1 em Portugal é mais complexo do que o observado na Europa Ocidental, apresentando maiores semelhanças com a diversidade encontrada em algumas regiões africanas. Por vezes ocorre o aparecimento *de novo* de mutações. É importante estudar e conhecer bem os mecanismos destas, pois se as percebermos bem, torna-se mais fácil combatê-las.

Neste estudo foram analisados 131 indivíduos infetados pelo HIV-1 da região do Minho, Portugal, onde para além dos subtipo B e G também foram encontradas sequências do subtipo A1, F1, C e CRF02\_AG. Dos 17 clusters de transmissão obtidos, o cluster do subtipo A1 (cluster 8) é o maior, o que sugere que este subtipo pode estar a aumentar em Portugal. Este estudo corrobora o contraste a nível da diversidade do HIV-1 existente entre Portugal e o resto da Europa ocidental. Adicionalmente, como resultado da análise de mutações, foi encontrada a mutação V179E que está possivelmente a ser transmitida em Portugal. A transmissão de mutações de resistência é uma ameaça relevante ao sucesso da terapia antirretroviral e ao controlo da epidemia de HIV pelo que esta descoberta deve ser seguida em estudos futuros.

Palavras-chaves: HIV-1, subtipos, clusters, mutações

# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1).....</b>	<b>1</b>
I. História do HIV .....	1
II. Classificação .....	1
III. Ciclo de replicação.....	2
IV. Subtipos .....	4
V. Vias de transmissão.....	7
VI. Epidemiologia.....	8
VII. Tratamento, mutações e as suas resistências aos fármacos.....	9
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Métodos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Estudo de população:.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Análise filogenética.....</b>	<b>14</b>
<b>3.3 Ética .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Apresentação dos resultados .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Discussão dos resultados .....</b>	<b>22</b>
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>25</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>26</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>30</b>

## Índice de figuras

Figura 1: Esquema resumido do ciclo da replicação viral (Souza e Almeida 2003). .....	3
Figura 2: Árvore filogenética dos vírus SIV e HIV .....	4
Figura 3: Tipo de enraizamento de árvores filogenéticas (Edwards 2019). .....	5
Figura 4: Localização geográfica dos diversos subtipos de HIV-1 (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021). .....	6
Figura 5: Porção sequenciada do genoma do Hiv-1 (Yasemin van Heuvel et al. 2022) .....	13
Figura 6: Subtipagem das 131 sequências provenientes do Hospital de Braga.....	16
Figura 7: Evolução dos subtipos desde 2013 até 2017. ....	17
Figura 8: Árvore filogenética das 689 sequências com os clusters representados e a sua respetiva localização.....	18
Figura 9: Mutações NRTI provenientes dos 131 indivíduos identificados com HIV-1 no Hospital de Braga, utilizando um banco de dados (Rhee 2003) .....	20
Figura 10: Mutações NNRTI provenientes dos 131 indivíduos identificados com HIV-1 no Hospital de Braga, utilizando um banco de dados (Rhee 2003) .....	20
Figura 11: Evolução das mutações NRTI desde 2013 até 2017. ....	21
Figura 12: Evolução das mutações NNRTI desde 2013 até 2017. ....	21

## Índice de tabelas

Tabela 1: Percentagem das vias de exposição ao HIV-1. Adaptado (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021).....	8
Tabela 2: Dados obtidos das sequências provenientes do Hospital de Braga. ....	15
Tabela 3: Clusters de transmissão. ....	19
Tabela 4: informação completa de todos o os clusters de transmissão .....	30

## Lista de Abreviaturas

### Abreviaturas

---

<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês, <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
<b>CRF</b>	Formas Circulantes Recombinantes (do inglês, <i>Circulating Recombinant Form</i> )
<b>URF</b>	Formas Recombinantes Únicas (do inglês, <i>Unique Recombinant Form</i> )
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico (do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>ORF</b>	Fase de leitura aberta (do inglês, <i>Open Reading Frame</i> )
<b>SIDA</b>	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
<b>Env</b>	Envelope viral
<b>DST</b>	Doença Sexualmente Transmissível
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês, <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> )
<b>TARV</b>	Terapia Antirretroviral
<b>ART</b>	Terapia antirretroviral combinada
<b>AZT</b>	Zidovudina ou azidotimidina
<b>HAART</b>	Terapia Antirretroviral Altamente Ativa (do inglês, <i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i> )
<b>DRM</b>	Mutação Resistência a Medicamentos (do inglês, <i>Drug Resistance Mutation</i> )
<b>TDR</b>	Resistência a Medicamentos Transmitida (do inglês, <i>Transmitted Drug Resistance</i> )
<b>NRTI</b>	Inibidor da Transcritase Reversa de Nucleotídeo (do inglês, <i>Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitor</i> )
<b>NNRTI</b>	Inibidor da Transcritase Reversa Não Nucleosídeos (do inglês, <i>Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor</i> )
<b>IP</b>	Inibidor da protease



<b>INI ou INSTI</b>	Inibidor da integrase
<b>RT</b>	Transcritase Reversa (do inglês, <i>Reverse Transcriptase</i> )
<b>SPR</b>	Ressonância de Plasmão de Superfície (do inglês, <i>Surface Plasmon Resonance</i> )
<b>MSM</b>	Homem que teve relações sexuais com outro homem (do inglês, <i>Men Who have Sex with Men</i> )
<b>IDU</b>	Uso de injeção de drogas (do inglês, <i>Injection Drug Use</i> )

# 1. Introdução

## 1.1 Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1)

### I. História do HIV

Evidências consideráveis apoiam que o HIV-1 na população humana é uma infecção relativamente recente, que foi reconhecida pela primeira vez em 1981 (Lewthwaite e Wilkins 2009). As hipóteses científicas mais aceites apontam para que o vírus tenha entrado na população humana após eventos de transmissão cruzada de retrovírus de primatas não-humanos existentes na África central ou ocidental, e foi possível reconhecer dois subtipos de HIV: HIV-1, com origem provável em vírus que infetam o chimpanzé-comum (*Pan troglodytes*), e HIV-2, originário de vírus adaptados a macacos da espécie *Cercocebus atys* (Hutchinson 2001).

Atualmente, o HIV-1 foi dividido em quatro grupos, denominados por M, N, O e P. A diversificação inicial do grupo M pode ter ocorrido no território da República Democrata do Congo (RD Congo), onde foi registada elevada diversidade genética nos vírus HIV-1 do grupo M, e o primeiro caso de infecção por HIV-1 foi documentado, em 1959 (Zhu et al. 1998). Fora da África Central, geralmente são predominantes uma ou duas formas genéticas na maioria dos países, o que poderia sugerir um efeito fundador, pelo qual a forma genética mais antiga introduzida com sucesso numa população se estabelece como predominante, ganhando uma vantagem inicial sobre outras formas genéticas com ocorrência mais tardia (Thomson, Pérez-Álvarez, e Nájera 2002).

### II. Classificação

Os retrovírus, pertencentes à família *Retroviridae*, compreendem uma família única de vírus de RNA. Estes apresentam duas características fundamentais no seu ciclo de vida: a transcrição reversa e a integração (Painter e Collins 2019).

A transcrição reversa possibilita ao vírus a transcrição do seu genoma de RNA para DNA. Já a integração é o processo de inserção do DNA viral no genoma do hospedeiro servindo depois como molde para a transcrição de genes virais e para a produção de proteínas virais (Schulz 1998).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) pertence ao gênero lentivírus, esta designação deriva de um início tipicamente lento da doença associada.

Os lentivírus são retrovírus complexos que codificam o precursor gag, a pró-pol e outras proteínas no seu genoma viral que têm de ser traduzidas e depois clivadas para se tornarem funcionais e contribuir para a formação de novos virões e infecção de novas células do hospedeiro (Painter e Collins 2019).

O HIV-1 existe no mundo todo e, salvo raríssimas exceções, quando não tratado de forma correta, evoluiu para a síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A elevada mortalidade desta doença deve-se ao colapso progressivo do sistema imunitário, ao qual está associado o aparecimento de infecções oportunistas, tumores ou outras comorbilidades (Essex 2008).

### III. Ciclo de replicação

A ligação do virião à célula hospedeira inicia-se num processo complexo de interação entre moléculas do envelope viral (Env) e da matriz extracelular da célula do hospedeiro (Kaushik e Levy 2009). Após o vírus entrar em contacto com a célula, a entrada viral depende tipicamente da ligação da proteína viral gp120 ao recetor CD4 na célula do hospedeiro envolvendo também coreceptores como o CCR5 ou CXCR4 e outras moléculas. Assim que o envelope do virião se funde com a membrana plasmática da célula, o capsídeo viral com o seu conteúdo entra na célula. Em seguida, o RNA viral é libertado para o citoplasma onde é transcrito reversamente, antes de ser transportado para o núcleo (Figura 1) onde é integrado no genoma da célula do hospedeiro. Nesta fase, foram identificados pelo menos três fatores do hospedeiro que restringem a replicação do HIV-1. O primeiro a ser identificado, o APOBEC3, desamina citidinas no DNA viral de cadeia negativa geradas durante a transcrição reversa, o que resulta numa hipermutação G para A da cadeia codificante, tornando o provírus incapaz de se replicar. O segundo fator de restrição, a família TRIM5a / TRIMcyp de proteínas antivirais, pode ligar-se diretamente ao capsídeo do HIV-1, provocando a remoção prematura do capsídeo e o bloqueio da transcrição reversa e importação nuclear do DNA viral. Por fim, o terceiro fator de restrição do hospedeiro, o SAMHD1, é um desoxinucleotídeo trifosfohidrolase, que inibe a transcrição reversa do HIV-1, reduzindo os níveis de desoxinucleotídeos (Spector 2014).

As proteínas acessórias do HIV-1 amenizam os efeitos desses fatores de restrição do hospedeiro, limitando, dessa forma, os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro (Malim e Bieniasz 2012).

A replicação das sequências de HIV-1 integradas no genoma da célula hospedeira está completamente dependente da maquinaria de replicação do hospedeiro. Isto é, se o HIV-1 infectar os linfócitos CD4<sup>+</sup> em repouso, o provírus integrado pode tornar-se transcricionalmente silencioso. Contrariamente, quando o vírus é replicado em larga escala isso pode resultar na lise da célula hospedeira. Se o número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> for inferior a um patamar plausível, o corpo perde a imunidade mediada pelas células, ficando gradualmente mais suscetível a infecções oportunistas (Brosch 2018).

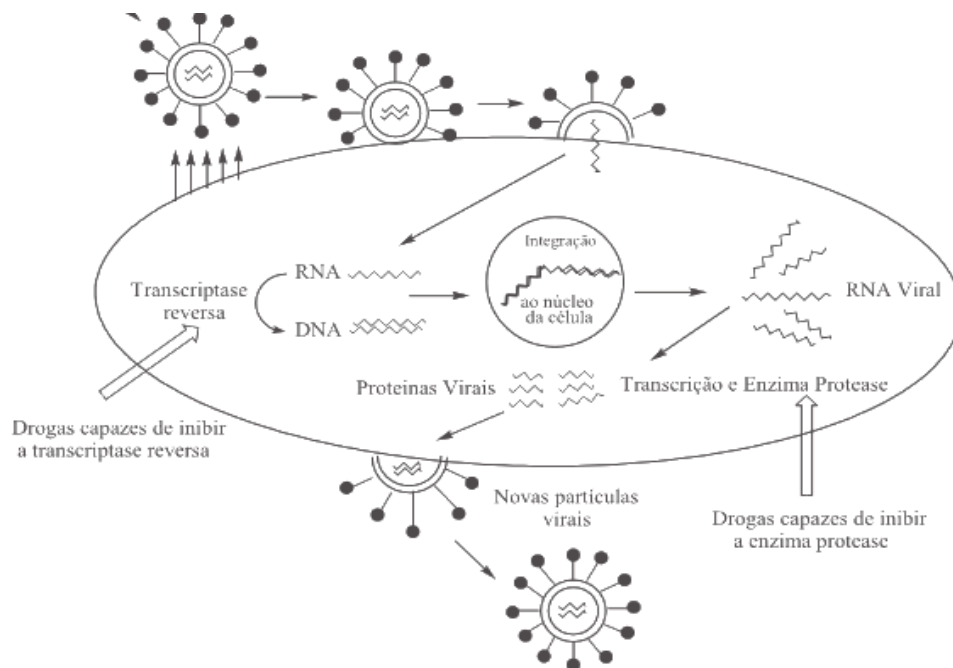


Figura 1: Esquema resumido do ciclo da replicação viral (Souza e Almeida 2003).

#### IV. Subtipos

Estudar a diversidade genética do HIV-1 é importante para a compreensão da epidemiologia molecular, no comportamento biológico, nas vias de transmissão tendo implicações clínicas nas estratégias de controlo como o desenvolvimento de uma possível vacina.

Na atualidade, o HIV-1 divide-se em quatro grupos genéticos com base na reconstrução filogenética, usando para tal sequências de nucleotídeos. A maioria dos vírus em circulação no mundo pertence ao grupo “M” ou grupo principal, enquanto um pequeno número constitui o grupo “O” ou *outlier*, outro o grupo “N” ou novo grupo, e outro o grupo P. No grupo M são reconhecidos nove subtipos, identificados pelas letras A – D, F – H, J e K, os quais tiveram origem na África central. Dentro dos subtipos A e F, são distinguidos os subsubtipos A1 e A2, e F1 e F2, respetivamente.

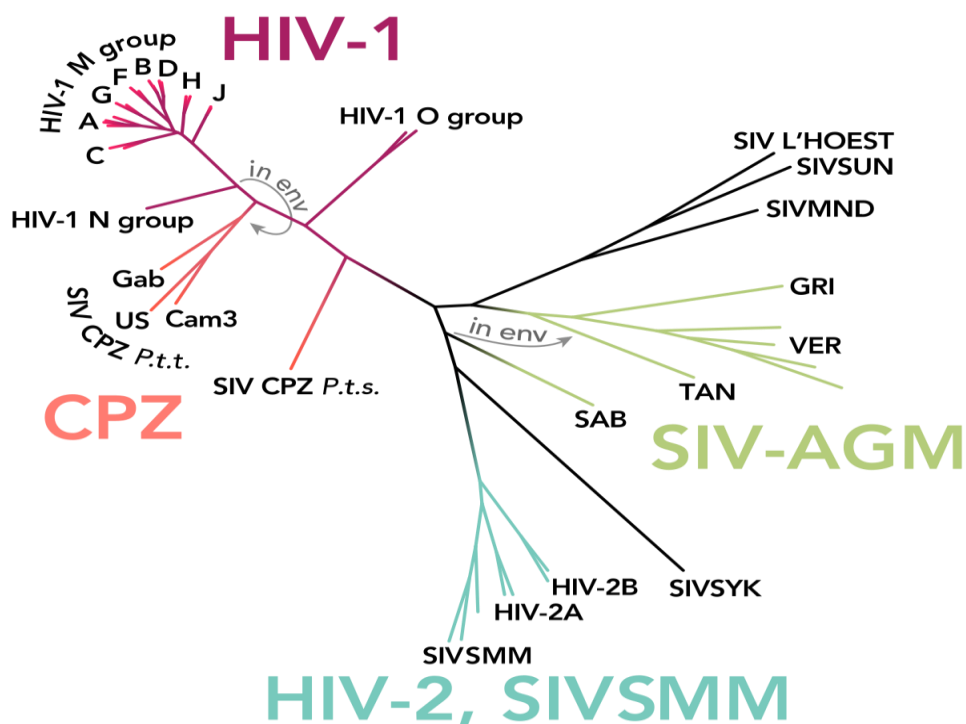


Figura 2: Árvore filogenética dos vírus SIV e HIV

Para o estudo da filogenia e para a identificação de clusters de transmissão é importante a utilização de um “outgroup” e do correto enraizamento da árvore filogenética (figura 2) (Patiño-Galindo et al. 2016).

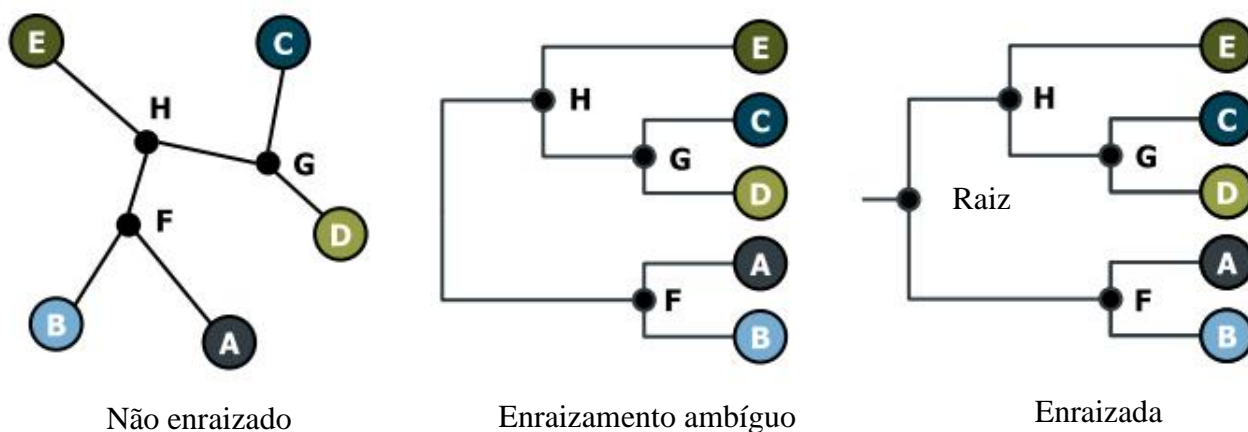


Figura 3: Tipo de enraizamento de árvores filogenéticas (Edwards 2019).

As recombinações provêm da troca de partes dos genomas devido a interações de proximidade entre diferentes vírus que podem ser de diferentes subtipos. Os indivíduos infectados por intersubtipos recombinados resultam em formas circulantes recombinadas (CRFs) (Thomson, Pérez-Álvarez, e Nájera 2002). O primeiro CRF foi caracterizado através da análise da sequência completa de vírus da Tailândia e da África Central. Esta forma genética foi inicialmente designada como subtipo E, mas a análise posterior sugeriu que uma grande parte do seu genoma deriva do subtipo A, indicando uma recombinação entre este e o E (Kalish et al. 2002).

No grupo M existem 14 formas circulantes recombinantes (CRFs), nomeadamente, CRF01-AE, CRF02-AG, CRF03-AB, CRF04-cpx, CRF05-DF, CRF06-cpx, CRF07-BC, CRF08-BC, CRF09-cpx, CRF10-CD, CRF11-cpx, CRF12-BF, CRF13-cpx e CRF14-BG (Papa et al. 2002), sendo a sua importância no HIV-1 cada vez mais reconhecida.

A nível mundial, as formas genéticas mais prevalentes são os subtipos C, A (A1), B e CRF02\_AG (figura 3) (Hemelaar et al. 2019).

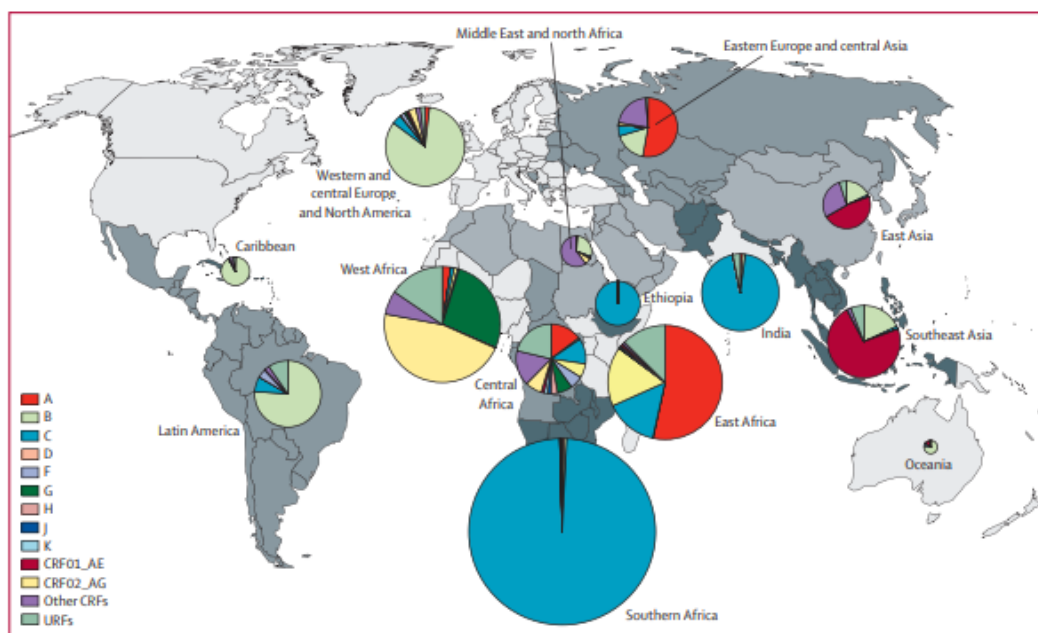


Figura 4: Localização geográfica dos diversos subtipos de HIV-1 (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021)

O subtipo C prevalece maioritariamente nos países da parte sul de África, Índia e Etiópia, sendo que também circula como forma secundária no Brasil, na Rússia e outros países. Os vírus recombinantes com porções do subtipo C são comuns na Tanzânia e na China. Já os do subtipo A são predominantes nas áreas da África Central e Oriental (Quênia, Uganda, Tanzânia e Ruanda) e no leste europeu, sendo que em toda a África Ocidental e em partes da África central, o subtipo mais comum é um recombinante, CRF02\_AG. O subtipo B é a principal forma genética na Europa Ocidental e Central, na América e Austrália, e também é comum em vários países do sudeste da Ásia, norte da África e Médio Oriente.

Existem ainda vários subtipos, menos predominantes, tais como o subtipo D, distribuído principalmente na África oriental (Uganda, Tanzânia e Quênia), o F (F1) predominante na Roménia, o G, existente na África Ocidental e Central, com maior predominância na Nigéria, mas também em Portugal e noroeste da Espanha, e ainda o CRF12\_BF e recombinantes relacionados, amplamente presentes na Argentina. Os

outros vírus não recombinantes (A2, F2, H, J e K) circulam como formas menores na África Central. Os CRFs restantes têm menor relevância epidêmica em escala global (Thomson, Pérez-Álvarez, e Nájera 2002).

Os métodos utilizados para identificar a forma genética dos grupos O e M do HIV-1 são os ensaios serológicos. A classificação do subtipo é realizada partindo de dados de sequenciação, utilizando softwares e programas projetados para este tipo de análise, como o REGA 3.0 (Pineda-Peña et al. 2013) ou o SNAPPY (Struck et al. 2014) que procuram semelhanças ou relações filogenéticas com sequências de referência ao longo do alinhamento.

A análise filogenética baseia-se em semelhanças genéticas e polimorfismos encontrados em sequências para construir uma representação gráfica de parentesco genético. Com este tipo de estudo, a origem provável de uma epidemia causada por um subtipo específico pode ser rastreada, ou a escala e tendência de um surto podem ser monitorizadas (Li et al. 2021).

#### v. Vias de transmissão

Após começarem a surgir os primeiros casos, começaram a ser identificadas quais as vias de transmissão utilizadas pelo HIV-1 para infectar os hospedeiros humanos. O HIV-1 pode ser transmitido através da atividade sexual, exposição ao sangue e transmissão vertical. Existem seis fluidos corporais pelos quais a transmissão do HIV-1 pode ocorrer, sendo eles o sangue, pré-sémen, sémen, secreções vaginais, secreções anais e o leite materno. Em geral, a exposição de superfícies mucosas a fluidos contendo vírus apresenta risco de transmissão.

O contacto sexual desprotegido é o principal modo de transmissão em todo o mundo sendo as mulheres comumente infectadas pelo sexo com homens e os homens pelo sexo com outros homens (Spector 2014). Além disso, há vários fatores que podem aumentar a transmissibilidade, como a carga viral, outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs). A probabilidade de transmissão aumenta também com o aumento da probabilidade de microtrauma durante o contato sexual e de exposição direta de sangue a fluidos infectados.



Além do contacto sexual, outro modo comum de transmissão é através da exposição a sangue infetado pelo HIV, por exemplo pelo uso de drogas injetáveis. A transmissão de mãe para filho e a partilha de agulhas com sangue contaminado pelo HIV tem a transmissibilidade de qualquer via de transmissão, com exceção das transfusões de sangue com sangue contaminado, que apresentam um valor estimado de 90% (Tabela 1) (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021).

*Tabela 1: Percentagem das vias de exposição ao HIV-1. Adaptado (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021)*

Via de exposição	Risco por 100 exposições a uma fonte infetada
Transfusão de sangue	90,0%
Partilha de seringas (IDU)	6,7%
Picada de agulha ercutânea	3,0%
Relações anais recetivas	5,0%
Coito peniano-vaginal recetivo	1,0%
Relação anal insertiva	0,65%
Coito peniano-vaginal insertivo	0,50%
Relação oral recetiva	0,10%
Relação oral insertiva	0,05%
Transmissão de mãe para filho	30,0%
Amamentação (18 meses)	15,0%

## VI. Epidemiologia

O HIV-1 está presente em todo o mundo. Estima-se que, atualmente, 37,9 milhões de pessoas vivem com HIV. Em 2019, 1,7 milhão de pessoas foram infetadas e 770.000 morreram de doenças relacionadas com a AIDS. 23,3 milhões de indivíduos tiveram acesso à terapia antirretroviral (TARV).

A predominância do HIV-1 varia globalmente, afetando desproporcionalmente a África Subsaariana. A oriente e sul de África localizam-se 60% do total de infeções globais, seguidos da Ásia e do Pacífico (15%), depois a África Ocidental e Central (13%), a Europa Ocidental/Central e América do Norte (5%), a Europa Oriental e a Ásia Central

(4%), a América Latina (2%), as Caraíbas (0,9%), e, por fim, o Médio Oriente e o Norte da África (0,6%), compreendendo os outros 40%. Tanto o envolvimento em atos que podem promover a transmissão, como o nível de infeção pré-existente dentro do subgrupo onde esses atos são partilhados levaram a níveis significativamente elevados de infeção o que, em conjunto com lacunas civilizacionais nomeadamente ao nível da saúde e educação, justificam em grande medida as diferenças geográficas no número de casos de infeções por HIV-1 (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021).

## VII. Tratamento, mutações e as suas resistências aos fármacos

O padrão atual de atendimento para pessoas que vivem com HIV é a terapia antirretroviral combinada, ou ART. Ao longo de 15 anos, passou-se da identificação do HIV-1 como causador da AIDS (início dos anos 80) à identificação do primeiro medicamento ativo (AZT, no final dos anos 80), até, finalmente, à descoberta de potentes esquemas medicamentosos capazes de suprimir a replicação viral e interromper o desenvolvimento da doença (final da década de 90). Nos últimos 20 anos, a potência dos medicamentos continuou a aumentar, e os desenvolvimentos mais recentes permitem que a administração dos medicamentos se torne cada vez mais conveniente, sendo que nos dias de hoje, é administrado um comprimido uma vez por dia, para a maioria das pessoas.

Os regimes modernos permitem que as pessoas vivam uma vida normal com uma expectativa de vida muito próxima à de pessoas não infetadas, ao contrário do que ocorria anteriormente. No entanto, o HIV-1 é mantido como uma infeção latente mesmo diante de inibidores que bloqueiam toda a replicação viral, o que resulta na necessidade de fazer terapia antirretroviral durante toda a vida, uma vez que a interrupção tipicamente resulta no reaparecimento de altos níveis do vírus em replicação, em menos de um mês. Existem quatro classes principais de antirretrovirais usados para tratar o HIV, cada um desenhado para interferir com estágios diferentes do ciclo de vida do vírus. Estes podem ser inibidores de Entrada, inibidores da Transcritase Reversa, inibidores da Protease e inibidores da Integrase viral (Woodburn, Emery, e Swanstrom 2021).

Ao inibir efetivamente a replicação do vírus, a terapia antirretroviral altamente ativa (HAART) diminui a mortalidade da infecção por HIV-1, tornando o Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (ADIS) uma doença crônica e controlável. No entanto, o surgimento de mutações de resistência a medicamentos (DRMs) no HIV-1 é um fato documentado; estas mutações aparecem em resposta à pressão seletiva do tratamento antirretroviral podendo levar à falha total do tratamento (Blassel et al. 2021).

Com o desenvolvimento de mutações de resistência aos medicamentos do HIV-1, os medicamentos antirretrovirais originais são incapazes de inibir o vírus resistente e a carga viral pode aumentar drasticamente. Posteriormente, com o sistema imunológico enfraquecido e as contagens de linfócitos T CD4+ diminuídas, os pacientes ficam mais suscetíveis a serem infectados, o que se traduz numa falha da terapia clínica. Mais desvantajoso ainda é o facto de os pacientes que falharam com os medicamentos antirretrovirais de primeira linha também poderem falhar na resposta aos medicamentos de segunda linha, ficando sem opções de tratamento e podendo originar graves problemas de saúde pública.

Foi amplamente demonstrado que as mutações de resistência ao HIV-1 são causadas principalmente por efeitos seletivos de pressão exercida pela utilização incorreta dos medicamentos sendo que fatores como a variabilidade genética do vírus ou particularidade na interação entre medicamentos e fatores farmacocinéticos do hospedeiro também podem ser relevantes para o aparecimento de resistências. O impacto causado por esses fatores pode também ser variável entre diferentes áreas e populações de pacientes, e influenciar ainda mais a predominância e as características das mutações de resistência aos medicamentos.

Como mencionado anteriormente, os medicamentos antirretrovirais, principalmente quando usados em concentrações subinibitórias, selecionam mutações associadas à resistência, fenómeno que é promovido pela alta variabilidade do vírus dentro do hospedeiro infectado. Além disso, vírus de HIV-1 portadores de mutações de resistência aos medicamentos usados no tratamento podem também ser transmitidos a indivíduos que não receberam tratamento e propagarem-se assim pela população ao longo do tempo. Essas variantes do HIV resistentes a medicamentos transmitidas (TDR) limitam as opções de tratamento e têm implicações clínicas e de saúde pública em todo o mundo, apesar de a sua escala variar globalmente.

Existem 4 classes principais de terapias antirretrovirais para HIV-1, que têm como alvo diferentes proteínas do vírus, os inibidores da transcriptase reversa, que podem ser divididas em nucleosídicos (NRTIs) ou não nucleosídeos (NNRTIs), os inibidores da protease (IPs), os inibidores da integrase (INIs ou INSTIs) e os inibidores de entrada, também conhecidos como inibidores de fusão (Gholami et al. 2020). As proteínas da transcriptase reversa, protease e integrase são codificadas pelo gene pol, enquanto os inibidores de entrada atuam em proteínas codificadas pelo gene env. Os NRTIs e os NNRTIs, introduzidos nos anos 80, são atualmente os medicamentos mais usados. Os IPs e os INIs surgiram mais recentemente, em meados dos anos 90, sendo também usados como opção em regimes de tratamento. A determinação da presença de mutações de resistência no vírus HIV-1 aquando do diagnóstico é atualmente feita por rotina nos países desenvolvidos sendo essencial para a melhor escolha do regime de tratamento, permitindo a melhor gestão dos pacientes e controlo da transmissão de vírus com resistências. Para a maximização deste reforços que são fundamentais para a manutenção da eficácia da HAART na população é necessário continuar a aplicar e desenvolver métodos de recolha e análise informática de sequências e dados clínicos relacionados com o HIV-1 (Luo et al. 2019) (Santos-Pereira et al. 2021).

## 2. Objetivos

Neste trabalho pretende-se caraterizar a epidemia local de HIV-1 na cidade portuguesa de Braga. Para tal, pretende-se determinar os subtipos de HIV-1 em combinação com análises epidemiológicas e filogenéticas com a finalidade de descobrir grupos de transmissão local, o que fornecerá pistas importantes sobre a evolução dessa epidemia na região. Será avaliada a correlação com dados clínicos tal como a análise da duração da infeção no hospedeiro e análise da resistência aos medicamentos, identificando mutações conhecidas de resistência aos medicamentos em sequências obtidas a partir da genotipagem de rotina do HIV-1 e a partir de bases de dados públicas. Espera-se obter indícios sobre o nível de resistência aos medicamentos e também sobre uma possível associação entre o tempo de infeção, o tipo de tratamento antirretroviral e a resistência aos medicamentos.

Este estudo realizado num país único na Europa Ocidental no que diz respeito à diversidade do HIV-1 provavelmente contribuirá para a compreensão sobre as origens e a evolução da epidemia de HIV. Também incluirá a vigilância das rotas de transmissão em curso e as mutações de resistência aos fármacos, contribuindo com informação útil a ser aplicada nas medidas de controlo local.

### 3. Métodos

#### 3.1 Sequenciamento

O RNA viral foi extraído do plasma usando kits de isolamento de ácido nucleico total MagNA Pure (Roche Applied Science). O sequenciamento de DNA, a partir dos amplicons de PCR da transcriptase reversa, foi realizado com o sistema de genotipagem Trugene™ HIV-1 (Siemens Healthcare Diagnostics) e o sistema de genotipagem ViroSeq™ (Abbott Molecular). A porção sequenciada corresponde à região pol, da posição 2253 a 3554 (com alguma variabilidade relacionada aos primers utilizados).

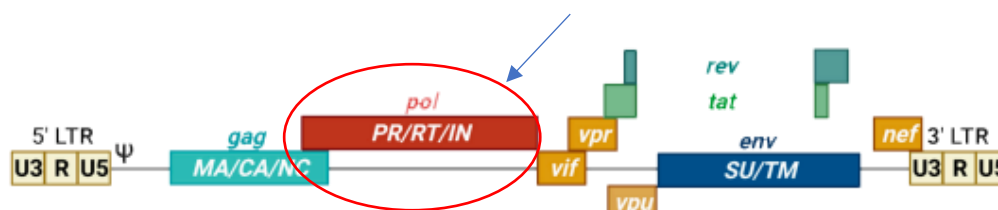


Figura 5: Porção sequenciada do genoma do Hiv-1 (Yasemin van Heuvel et al. 2022)

#### 3.2 Estudo de população:

131 indivíduos do hospital de Braga foram selecionados para este estudo, de acordo com os seguintes critérios:

- (i) Disponibilidade de uma amostra de plasma ou sequência viral derivada de plasma amostrada de 2014 a 2021.
- (ii) Ausência de antirretroviral anterior ao tratamento no momento da amostragem.

As seguintes informações foram coletadas anonimamente nos prontuários de cada indivíduo: via de transmissão presumida, sexo, idade, nacionalidade, país presumido de infecção e data do diagnóstico.

Às 131 sequências obtidas no Hospital de Braga foram adicionadas 538 sequências do Blast local e 19 sequências do Blast no Brasil originando, após serem filtradas e serem retiradas todas as sequências duplicadas, um total de 689 sequências.

Verificou-se se as 689 sequências apresentavam alguma resistência aos tratamentos retrovirais relativamente a NRTIs, NNRTIs e IPs (Shafer 2006).

Prosseguiu-se com o alinhamento das sequências utilizando a ferramenta MAFFT (Nakamura et al. 2018), após o alinhamento, realizou-se a subtipagem usando três ferramentas diferentes sendo elas o, REGA (Pineda-Peña et al. 2013), o Commet (Struck et al. 2014) e o snappy (Araújo et al 2019), escolhendo-se o subtipo que era mais concordante entre as três ferramentas.

### 3.2 Análise filogenética

A análise filogenética das 689 sequências foi conduzida usando PhyML para produzir uma árvore de máxima verossimilhança sendo utilizadas as seguintes condições: modelo de substituição adequado: GTR + G4 + I, determinado por PhyML SMS (*Smart Model Selection*) usando AIC (*Akaike Information Criterion*). A busca de árvores heurísticas foi realizada usando o método de ressonância de plasmão de superfície (SPR). O suporte de ramo foi calculado com o teste de SH-like de razão de verossimilhança aproximada (aLRT) (Guindon et al. 2010).

A identificação dos *clusters* de transmissão foi baseada na árvore de máxima verossimilhança, utilizando-se a ferramenta *Cluster pick* (Ragonnet-Cronin et al. 2013) onde foram introduzidas as seguintes condições: suporte de bootstrap >95%, uma distância genética média de <0,03 substituições por *site*. Depois todos os *clusters* foram revistos, adicionando mais duas condições: pelo menos três indivíduos sendo que um deles pertencia ao Hospital de Braga e distância genética máxima de <0,05 substituições por *site*, originando um total de 17 *clusters*.

### 3.3 Ética

Este relatório utilizou dados de um projeto de investigação que foi aprovado pelo comité de ética do Hospital de Braga. Os dados clínicos foram codificados para garantir a confidencialidade dos pacientes.

## 4. Apresentação dos resultados

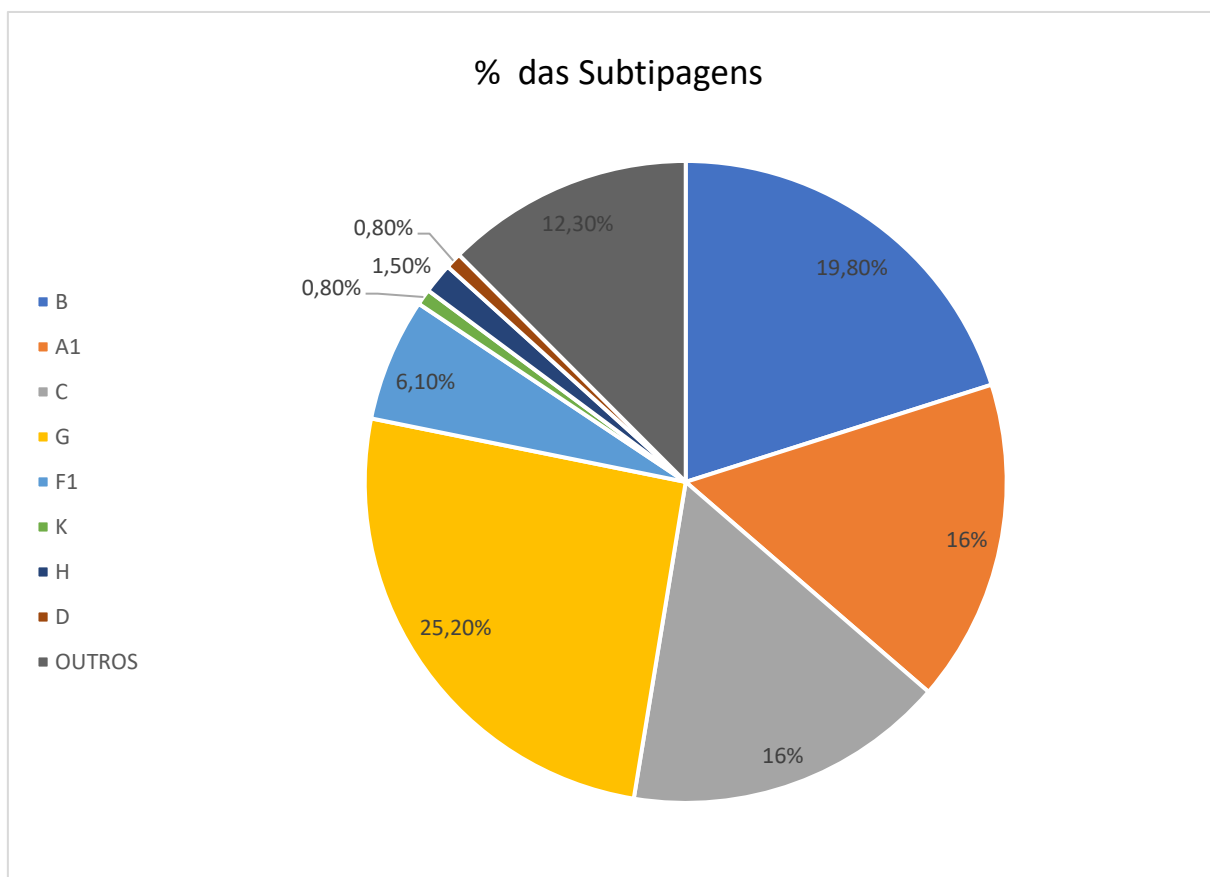
Entre os 131 indivíduos que cumpriam os critérios de inclusão, 92,3% eram do sexo masculino (tabela 2), e a idade média ao diagnóstico na população estudada foi de 43 anos (tabela 2). A via de infeção mais frequentemente relatada foi o contacto heterossexual com uma percentagem de 42,3% (n= 22/52), seguido por MSM com uma percentagem de 34,6% (n= 18/52) e uso de drogas injetáveis com uma percentagem de 19,2% (n= 10/52) (Tabela 2). Tal como esperado, a população do estudo foi altamente homogénea, com 86,0% dos indivíduos sendo portugueses, 96,0% de etnia branca e 91,0% presumivelmente infetados em Portugal.

*Tabela 2: Dados obtidos das sequências provenientes do Hospital de Braga.*

Variável	No	%
<b>Ano de nascimento:</b>		
50-60	2	3,8
60-70	8	15
70-80	20	39
80-90	13	25
90-00	9	13
<b>Total</b>	51	39
<b>Género:</b>		
Masculino	48	92
Feminino	4	7,7
<b>Total</b>	52	40
<b>Naturalidade:</b>		
Portuguesa	44	86
Outra	7	14
<b>Total</b>	51	39
<b>Local de infeção:</b>		
Portugal	38	91
Outro	4	9,5
<b>Total</b>	42	32
<b>Via de infeção:</b>		
Heterossexual	22	42
MSM	18	35
IDU	10	19
Outros	1	1,9
<b>Total</b>	51	39

Os subtipos mais frequentes encontrados foram G (n=33 [25,2%]), B (n=26 [19,8%]), C (n= 21 [16,0%]) e A1, (N=21 [16,0%]) seguidos pelo F1 (n=8 [6,10 %]). Apenas 3,10% dos indivíduos estudados estavam infetados com outros subtipos “puros” (D, n = 1; k, n = 1 e H, n=2). O CRF encontrado com mais frequência foi o CRF02\_AG (n= 6 [4,6%]) (Figura 4)





*Figura 6: Subtipagem das 131 sequências provenientes do Hospital de Braga.*

As datas de diagnóstico do HIV-1 na população do estudo abrangeram o período de 2013 a 2017. Investigamos a proporção de infeções diagnosticadas a cada ano com diferentes subtipos. Resultados (figura 5) sugerem que as infeções com o subtipo A1 ou F1 aumentaram durante o período estudado contribuindo para a diversidade genética do vírus HIV-1 no coorte estudado. Globalmente, estes dados suportam a hipótese de que a infeção pelos subtipos A1 e F1 se poderá estar a estabelecer na comunidade.

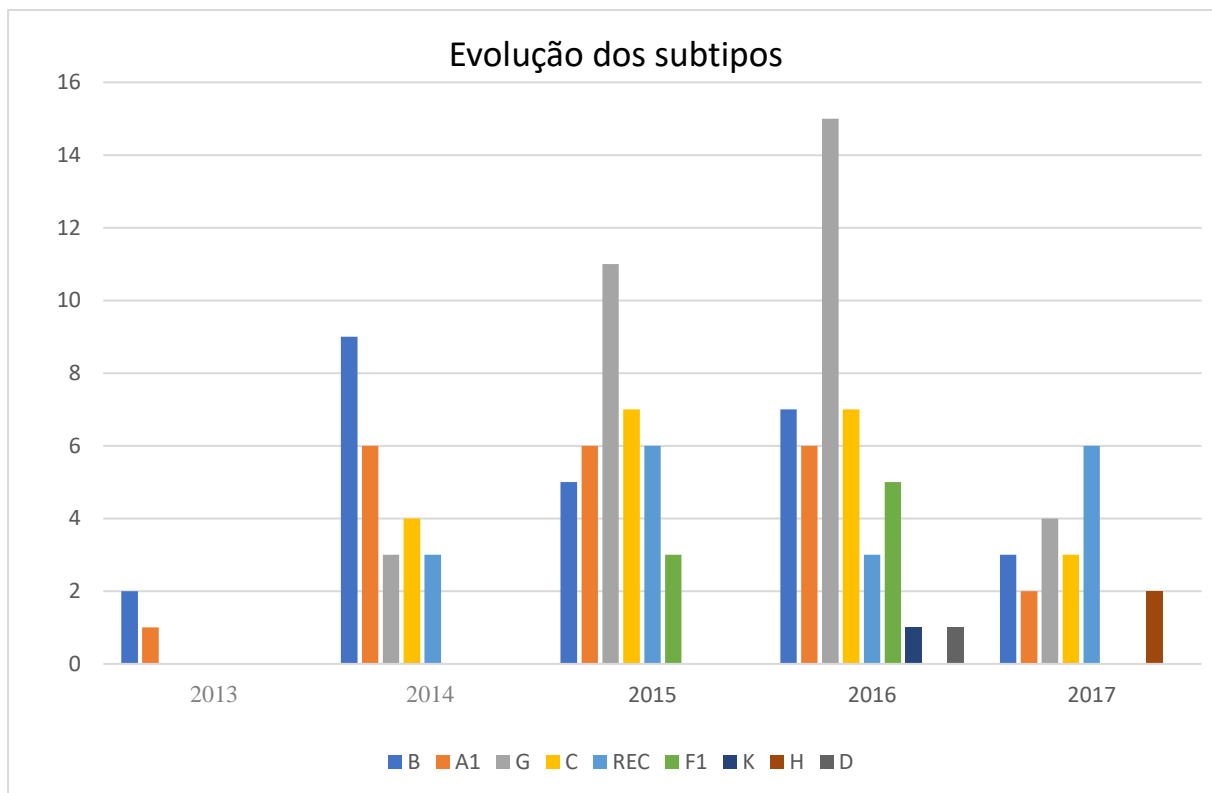


Figura 7: Evolução dos subtipos desde 2013 até 2017.

A análise filogenética das sequências virais permitiu a identificação de 17 *clusters* de transmissão (Figura 6). Esta análise foi realizada usando uma árvore de máxima verossimilhança. Em termos de distribuição do subtipo HIV-1, três grupos incluíram vírus do subtipo B, dois incluíram subtipo F1, quatro incluíram subtipo G, dois incluíram subtipo C, três incluíram subtipo A1, um incluiu REC A1, D, B e dois incluíram CRF02\_AG (Tabela 3).

O número médio de indivíduos por *cluster* foi de 6,6, onde 74,9% dos indivíduos são portugueses, 16,1% são espanhóis, 5,40% são ingleses e 3,60% são da Zâmbia. Entre os *clusters* com número de indivíduos acima da média, o maior foi o *cluster* ao qual foi atribuído o número 8. Era composto quase inteiramente por MSM (23 de 24 indivíduos). O segundo maior *cluster* foi o 3, embora essa informação não esteja totalmente disponível, é esperado que a via de transmissão na origem deste *cluster* tenha sido IDU devido à informação parcial existente.

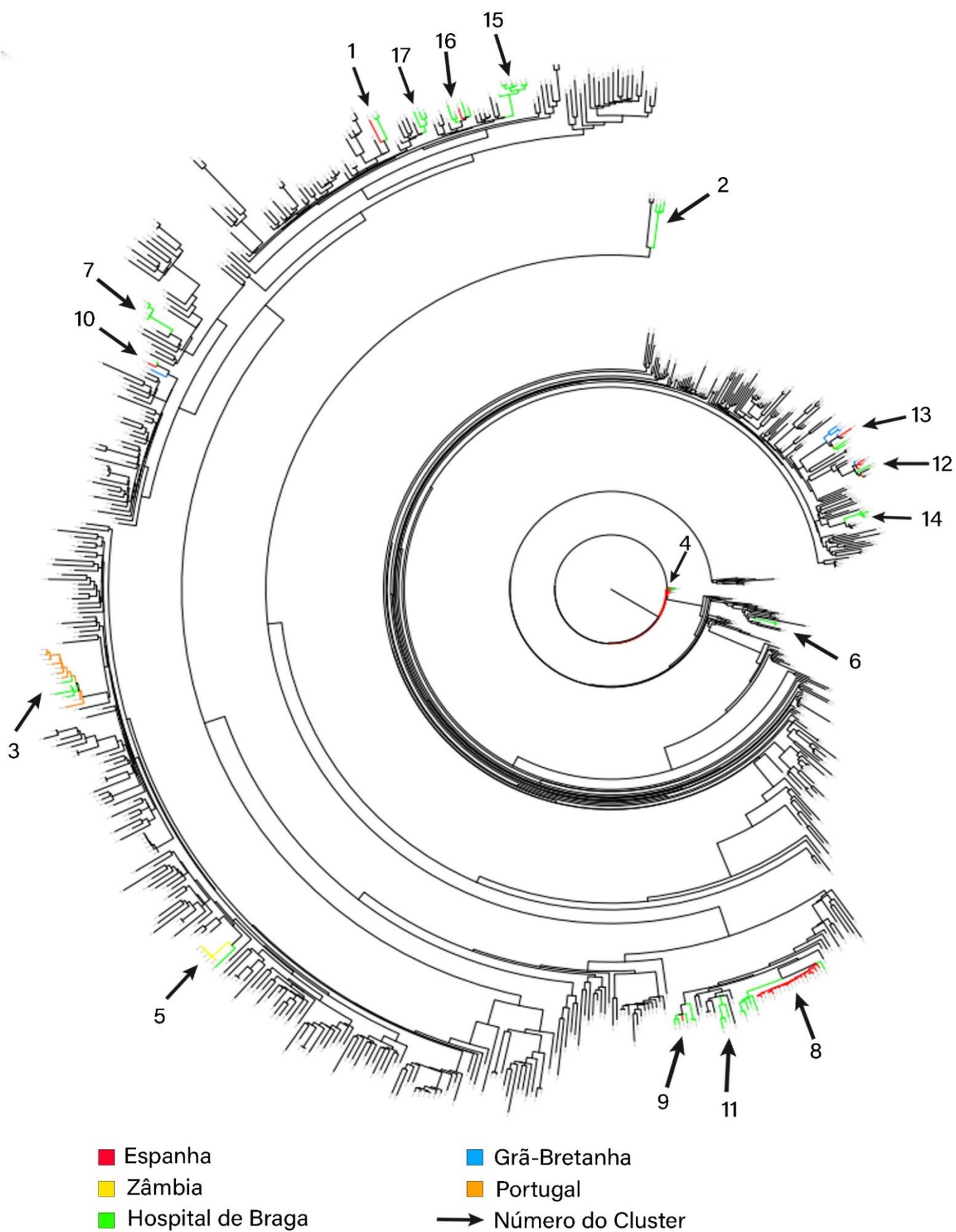


Figura 8: Árvore filogenética das 689 sequências com os clusters representados e a sua respetiva localização

Tabela 3: Clusters de transmissão.

Designação	PAÍS	CLUSTER	SUBTIPO	GENÉRO	CIDADE	IDADE	VIA	NRTI	NNRTI	PI Major
21004285_Hbraga_PT_2013.35	PT	3	C	Male	Braga	40	IDU	None	None	None
24008102_Hbraga_PT_2013.55	PT	3	C	Male	Braga	52	IDU	None	E138EA	None
26011669_Hbraga_PT_2015.75	PT	3	C					None	None	None
92099333_Hbraga_PT_2015.87	PT	3	C					None	None	None
FJ360877_Blast_PT_2004	PT	3	C					None	None	None
FJ360878_Blast_PT_2004	PT	3	C					None	None	None
FJ360879_Blast_PT_2004	PT	3	C					None	None	None
FJ360880_Blast_PT_2004	PT	3	C					None	None	None
FJ360881_Blast_PT_2000	PT	3	C					None	None	None
FJ360882_Blast_PT_2008	PT	3	C					None	None	None
FJ360883_Blast_PT_2008	PT	3	C					None	V108VI	None
GQ399346_Blast_PT_2005	PT	3	C					None	None	None
HM102333_Blast_PT_2004	PT	3	C					None	None	None
40239744_Hbraga_PT_2015.47	PT	4	F1					None	V106I	None
KJ883096_Blast_ES_2011	ES	4	F1	Male		55	MSM	None	V106I	None
KJ883139_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		49	MSM	None	None	None
KJ883140_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		39	MSM	None	V106I	None
KJ883143_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		21	MSM	None	V106I	None
KJ883144_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		27	MSM	None	V106I	None
KJ883145_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		38	MSM	None	V106I	None
KJ883146_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		30	MSM	None	V106I	None
KJ883147_Blast_ES_2010	ES	4	F1	Male		46	MSM	None	V106I	None
KJ883150_Blast_ES_2011	ES	4	F1	Male		44	MSM	None	V106I	None
KT276260_Blast_ES_2014	ES	4	F1	Male		25	MSM	None	V106I	None
40172390_Hbraga_PT_2013.78	PT	7	CRF02_AG	Male	Barcelos	53	Heterosexual	M41L	V179E	None
40180523_Hbraga_PT_2013.78	PT	7	CRF02_AG	Female	Barcelos	52	Heterosexual	M41L	V179E	None
40222163_Hbraga_PT_2017.23	PT	7	CRF02_AG					M41L	V179E	None
40304905_Hbraga_PT_2017.23	PT	7	CRF02_AG					M41L	V179E	None
22016037_Hbraga_PT_2015.18	PT	8	A1	Male	Braga	36	MSM	None	None	None
40035147_Hbraga_PT_2015.17	PT	8	A1	Male	Guimarães	29	MSM	None	A98AG	None
40277068_Hbraga_PT_2016.53	PT	8	A1	Male	Famalicão	23	MSM	None	None	None
640998_Hbraga_PT_2015.46	PT	8	A1	Male	Braga	45	MSM	None	None	None
92045787_Hbraga_PT_2015.41	PT	8	A1	Male	Braga	48	BISSEXUAL	None	V179VFIL	None
99008459_Hbraga_PT_2015.24	PT	8	A1	Male	Braga	33	MSM	None	None	None
KU685561_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male		44	MSM	None	None	None
KY496622_Blast_ES_2015	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177654_Blast_ES_2016	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177656_Blast_ES_2016	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177677_Blast_ES_2013	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177680_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177681_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177683_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177685_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177686_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177692_Blast_ES_2015	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177694_Blast_ES_2016	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177699_Blast_ES_2017	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177700_Blast_ES_2017	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177724_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MK177754_Blast_ES_2016	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MN014504_Blast_ES_2015	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None
MN014505_Blast_ES_2014	ES	8	A1	Male			MSM	None	None	None

Foram identificadas mutações de resistência a três classes de fármacos, sendo elas a NRTI (12,2% $n=16$ ) (Figura 8), NNRTI (34,3% ([ $n=45$ ]) (Figura 9) e PI (7,90% [ $n=7$ ]), em 131 indivíduos. A mutação que prevalece em maior número é a M41L com 31,3% seguida pela M184V com 18,8% (NRTI), V179E com 24,4% seguida pela K103N com 15,6% (NNRTI), L90M com 57,1% (Pi major).

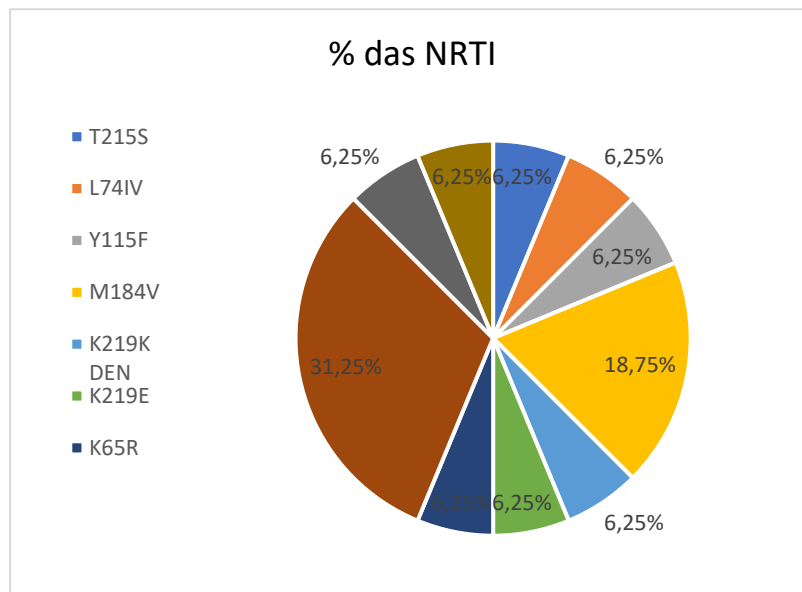


Figura 9: Mutações NRTI provenientes dos 131 indivíduos identificados com HIV-1 no Hospital de Braga, utilizando um banco de dados (Rhee 2003)

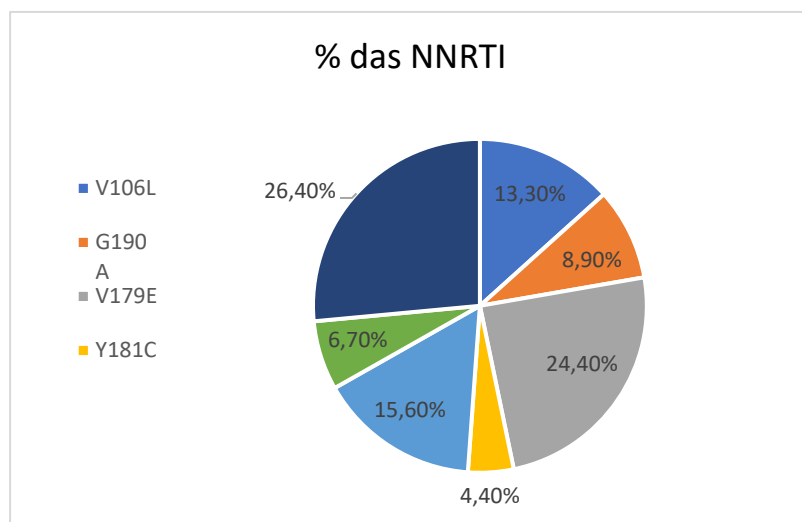


Figura 10: Mutações NNRTI provenientes dos 131 indivíduos identificados com HIV-1 no Hospital de Braga, utilizando um banco de dados (Rhee 2003)

Após verificar a data de sequenciação e a data de início de tratamento concluiu-se que relativamente às mutações NRTI (Figura 10), apenas dois indivíduos poderão apresentar mutações adquiridas na transmissão, relativamente a mutações NNRTI (Figura 11), apenas sete indivíduos tinham mutações possivelmente adquiridas na transmissão e relativamente as mutações PI *major* todas foram adquiridas depois de iniciar o tratamento.

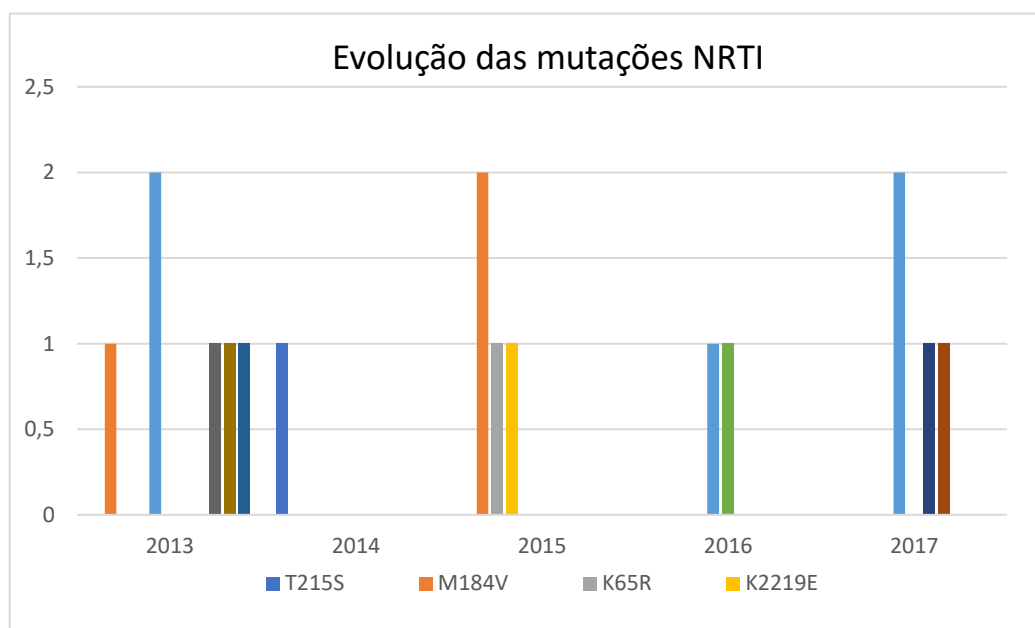


Figura 11: Evolução das mutações NRTI desde 2013 até 2017.

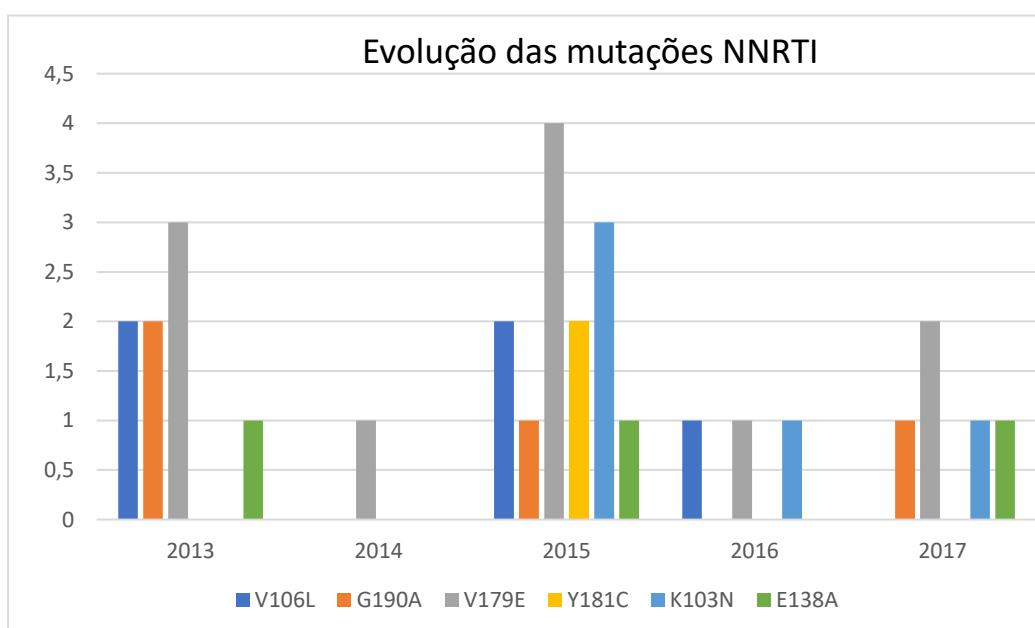


Figura 12: Evolução das mutações NNRTI desde 2013 até 2017.

## 5. Discussão dos resultados

Desde a sua origem, o HIV-1 tem sofrido continuamente uma diversificação genética que pode ser intensificada pela massiva globalização da população humana. Apesar da percepção que os regimes antirretrovirais atuais têm eficácias comparáveis entre os diversos subtipos de HIV-1 existentes, há evidências que mostram que alguns subtipos de HIV-1 podem apresentar uma transmissão mais eficaz em diferentes vias, diferentes eficiências na aquisição de resistências, tornando a investigação da diversidade do HIV-1 uma prioridade. É de extrema importância realizar a monitorização da pandemia de HIV-1 usando análises de dados filogenéticos e epidemiológicos como ferramentas na reconstrução de redes de transmissão viral, de modo a desenvolver medidas preventivas mais eficazes.

Neste estudo, analisamos 131 indivíduos infetados pelo HIV-1 da região do Minho, Portugal. Na nossa população de estudo, a heterogeneidade dos subtipos de HIV-1 é atribuível a indivíduos nascidos em Portugal presumivelmente infetados na região (9/17, *clusters*), assim como de indivíduos infetados no estrangeiro (8/17, *clusters*).

Os dados existentes reforçam que Portugal contrasta com o resto do Oeste-Europa em relação à sua distribuição de subtipos de HIV-1, pois como podemos observar na ilustração 2, o subtipo que prevalece é o B, sendo que em Portugal o subtipo mais prevalente é o subtipo G (Figura 1). Analisando a distribuição geográfica do vírus nos últimos 30 anos observa-se que este contraste se manteve constante. É importante entender melhor as causas subjacentes a essa diferença, também à luz das evidências que apoiam um aumento recente de infeções por subtipos de HIV-1 não-B em vários países da Europa Ocidental. Uma análise filogenética da população no presente estudo indica altas distâncias genéticas interindividuais para os subtipos mais prevalentes, B e G, sugerindo antigas e múltiplas introduções de vírus desses subtipos na região. Esta observação está de acordo com a predominância do subtipo B na Europa Ocidental, provavelmente tendo sido introduzido em várias ocasiões no final dos anos 70 e início dos anos 80 (Vermund e Leigh-Brown 2012). Quanto aos subtipos G, de acordo com a literatura, é possível que as intensas migrações humanas entre Portugal e as suas ex-colónias africanas neste período, devido sobretudo às guerras de independência,

tenham contribuído para a sua introdução precoce em Portugal. No entanto, a justificação não parece totalmente plausível uma vez a migração de ex-colónias africanas também ocorreu para outros países da Europa onde o subtipo G não prevalece.

Em relação à distribuição das sequências agrupadas por subtipo (*clusters*) seria expectável obter vários *clusters* do subtipo B e G, no entanto podemos verificar que sequências do subtipo A1, F1, C e CRF02\_AG também foram incorporadas em cadeias de transmissão.

O *cluster* do subtipo A1 (*cluster* 8) é o maior, o que permite concluir que este subtipo está a aumentar bastante em Portugal. Após a introdução de um subtipo de HIV-1 numa nova região, a sua capacidade de se estabelecer e levar à formação de grandes cadeias de transmissão é um tanto elusiva. O subsubtipo A1 foi previamente caracterizado como um genótipo viral que poderia levar a uma progressão lenta da doença em diferentes populações. A infeção por vírus MA1 pode levar a uma menor carga viral e uma diminuição mais lenta da contagem de células T CD4+ quando comparada com infeções por um vírus do subtipo predominante (BEST-HOPE study group et al. 2019).

É proveniente de pelo menos três regiões geográficas diferentes: Europa não Leste; África; e Europa Oriental. Segundo o autor “Alexandre Carvalho et al. 2021” todos os subtipos na região do Minho (Portugal) sofreram um aumento estatisticamente significativo na deteção de infeções A1, dos anos 2000 a 2012, e segundo os dados obtidos entre 2013 até 2017 conclui-se que esse aumento continuou.

Em relação ao *cluster* 4, é possível verificar que este é do subtipo F1, sendo também um subtipo não B. Segundo (Delgado et al. 2015) conclui-se que inicialmente era um grupo de indivíduos infetados em Espanha, mas posteriormente se alastrou para outros países sendo que agora é possível comprovar que também está relacionado com um indivíduo de Braga. Este foi diagnosticado uns anos mais tarde (2014), no entanto é provável que tenha contraído a doença ao mesmo tempo que os restantes indivíduos. Trata-se de uma transmissão sexual entre homens pois todos os indivíduos são do sexo masculino. Em relação a estes *clusters* observou-se que quase todos os indivíduos pertencentes apresentavam uma mutação NNRTI denominada V106I. Esta mutação ocorre em 1 a 2% dos vírus de pessoas não tratadas e tem um peso de 1,5 no *score* de suscetibilidade genotípica Tibotec ETR, o que, sozinho, parece ter pouco ou nenhum



efeito na suscetibilidade aos NNRTI. Como esta mutação aparece em quase todos os indivíduos podemos concluir que se trata de uma mutação transmissível.

O *cluster 7*, é formado apenas por quatro indivíduos pertencentes ao Hospital de Braga que foram diagnosticados com o subtipo CRF02\_AG. Foi identificada a transmissão heterossexual e duas mutações, uma mutação NRTI: M41L (apresenta um impacto negativo maior na resposta virológica a um regime contendo ABC, ddi ou TDF) e uma mutação NNRTI: V179E. Ambas estão presentes em todos os indivíduos e por isso conseguimos concluir que se trata de mutações transmitidas. No entanto, a mutação V179E é pouco estudada, e ocorre mais frequentemente em CRF02\_AG, apesar de apenas com uma taxa de 0,6% (Bennett e outros, 2009). Esta mutação é não polimórfica, fracamente selecionada por NVP e EFV e associado com resistência de baixo nível a NVP, EFV e etravirina (ETR) (Liu et al. 2020).

O *cluster 3*, é formado por 13 pessoas, sendo relativamente antigo, uma vez que podemos estimar que teve origem em 2000 havendo evidências que suportam que continuava em circulação em 2015 (Tabela 3).

Em relação às mutações obtidas é possível observar que as mutações com maior percentagem de incidência encontram-se nos *clusters* de transmissão como a M41L e V179E. Esta mutação (V179E), apesar de ser pouco estudada, tem surgido ao longo dos anos em Portugal sendo que é possível que venha a expandir ainda mais sendo de interesse a realização futura de um estudo mais aprofundado.

## 6. Conclusão

O objetivo deste trabalho foi a caracterização epidemiológica molecular de HIV num corte de pessoas infetadas com HIV seguidas no Hospital de Braga. Deste modo, foi possível comprovar o contraste a nível da diversidade do HIV-1 existente entre Portugal e o resto da Europa ocidental. Subtipos não tão comuns como o A1 e F1 estão cada vez mais enraizados o que possibilita que no futuro sejam subtipos de existência constante em Portugal.

Concluimos também que a prevalência dos subtipos do HIV-1 está a mudar visto o crescimento nos últimos anos dos subtipo A1 e F1.

O estudo das mutações de transmissão é um estudo deveras importante pois percebendo melhor as mutações é possível perceber as características do mecanismo de transmissão assim como combatê-la.

No futuro seria interessante estudar as possíveis causas por trás das mudanças dos subtipos e o seu impacto na infeção. Seria também interessante fazer a análise do aprofundar mais a descoberta da possível transmissão da mutação V179E visto ser uma mutação pouco abordada e pouco característica em Portugal que pode ter impacto no sucesso terapêutico.

## 7. Referências Bibliográficas

- BEST-HOPE study group, Pedro M. M. Araújo, Alexandre Carvalho, Marta Pingarilho, Ana B. Abecasis, e Nuno S. Osório. 2019. "Characterization of a Large Cluster of HIV-1 A1 Infections Detected in Portugal and Connected to Several Western European Countries". *Scientific Reports* 9 (1): 7223. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43420-2>.
- Blassel, Luc, Anna Zhukova, Christian J Villabona-Arenas, Katherine E Atkins, Stéphane Hué, e Olivier Gascuel. 2021. "Drug Resistance Mutations in HIV: New Bioinformatics Approaches and Challenges". *Current Opinion in Virology* 51 (dezembro): 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.09.009>.
- Brosch, J.R. 2018. "AIDS/HIV and Neurological Disease ☆". Em *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, B9780128093245037000. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.03620-8>.
- Delgado, Elena, María Teresa Cuevas, Francisco Domínguez, Yolanda Vega, Marina Cabello, Aurora Fernández-García, Marcos Pérez-Losada, et al. 2015. "Phylogeny and Phylogeography of a Recent HIV-1 Subtype F Outbreak among Men Who Have Sex with Men in Spain Deriving from a Cluster with a Wide Geographic Circulation in Western Europe". Editado por Chiyu Zhang. *PLOS ONE* 10 (11): e0143325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143325>.
- Edwards, Richard J. 2019. "Phylogenetic Tree Rooting". Em *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 727–35. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20258-6>.
- Essex, M. 2008. "AIDS: Overview". Em *International Encyclopedia of Public Health*, 90–98. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373960-5.00455-X>.
- Gholami, Mohammad, Negin Hosseini Rouzbahani, Siamak Mirab Samiee, Katayoun Tayeri, Khodayar Ghorban, Alireza Dolatyar Dehkharghani, Ali Akbar Gholami, et al. 2020. "HIV-1 Drug Resistance Mutations Detection and HIV-1 Subtype G Report by Using next-Generation Sequencing Platform". *Microbial Pathogenesis* 146 (setembro): 104221. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104221>.
- Guindon, Stéphane, Jean-François Dufayard, Vincent Lefort, Maria Anisimova, Wim Hordijk, e Olivier Gascuel. 2010. "New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0". *Systematic Biology* 59 (3): 307–21. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Hemelaar, Joris, Ramyadarsini Elangovan, Jason Yun, Leslie Dickson-Tetteh, Isabella Fleminger, Shona Kirtley, Brian Williams, et al. 2019. "Global and Regional Molecular Epidemiology of HIV-1, 1990–2015: A Systematic Review, Global

- Survey, and Trend Analysis". *The Lancet Infectious Diseases* 19 (2): 143–55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30647-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30647-9).
- Hutchinson, Janis Faye. 2001. "The Biology and Evolution of HIV". *Annual Review of Anthropology* 30 (1): 85–108. <https://doi.org/10.1146/annurev.anthro.30.1.85>.
- Kalish, Marcia L., Bette T. Korber, Satish Pillai, Kenneth E. Robbins, Yee Sin Leo, Ae Saekhou, Iris Verghese, et al. 2002. "The Sequential Introduction of HIV-1 Subtype B and CRF01AE in Singapore by Sexual Transmission: Accelerated V3 Region Evolution in a Subpopulation of Asian CRF01 Viruses". *Virology* 304 (2): 311–29. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1691>.
- Kaushik, S., e J.A. Levy. 2009. "HIV/AIDS". Em *Encyclopedia of Microbiology*, 391–413. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00189-9>.
- Lewthwaite, Penny, e Ed Wilkins. 2009. "Natural History of HIV/AIDS". *Medicine* 37 (7): 333–37. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.04.015>.
- Li, Wei-You, Szu-Wei Huang, Sheng-Fan Wang, Hsin-Fu Liu, Chih-Hung Chou, Shang-Jung Wu, Hsien-Da Huang, et al. 2021. "Source Identification of HIV-1 Transmission in Three Lawsuits Using Ultra-Deep Pyrosequencing and Phylogenetic Analysis". *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 54 (4): 596–605. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2019.12.002>.
- Liu, Yongjian, Hanping Li, Xiaolin Wang, Jingwan Han, Lei Jia, Tianyi Li, Jingyun Li, e Lin Li. 2020. "Natural Presence of V179E and Rising Prevalence of E138G in HIV-1 Reverse Transcriptase in CRF55\_01B Viruses". *Infection, Genetics and Evolution* 77 (janeiro): 104098. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104098>.
- Luo, Xiao-lu, Li-da Mo, Guo-sheng Su, Jin-ping Huang, Jing-yu Wu, Han-zhen Su, Wan-hong Huang, Shun-da Luo, e Zu-yan Ni. 2019. "Incidence and Types of HIV-1 Drug Resistance Mutation among Patients Failing First-Line Antiretroviral Therapy". *Journal of Pharmacological Sciences* 139 (4): 275–79. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.11.016>.
- Malim, M. H., e P. D. Bieniasz. 2012. "HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (5): a006940–a006940. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006940>.
- Nakamura, Tsukasa, Kazunori D Yamada, Kentaro Tomii, e Kazutaka Katoh. 2018. "Parallelization of MAFFT for Large-Scale Multiple Sequence Alignments". Editado por John Hancock. *Bioinformatics* 34 (14): 2490–92. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty121>.
- Painter, Mark M., e Kathleen L. Collins. 2019. "HIV and Retroviruses". Em *Reference Module in Biomedical Sciences*, B9780128012383662000. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66202-5>.

- Papa, Anna, Evagelia Papadimitriou, Androniki Papoutsis, Vassilios Kiosses, e Antonis Antoniadis. 2002. "HIV-1 Subtypes and Circulating Recombinant Forms (CRFs) in Northern Greece". *Virus Research* 85 (1): 85–93. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00020-5).
- Patiño-Galindo, J.A., Michael M. Thomson, Lucía Pérez-Álvarez, Elena Delgado, María Teresa Cuevas, Aurora Fernández-García, Rafael Nájera, et al. 2016. "Transmission Dynamics of HIV-1 Subtype B in the Basque Country, Spain". *Infection, Genetics and Evolution* 40 (junho): 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.02.028>.
- Pineda-Peña, Andrea-Clemencia, Nuno Rodrigues Faria, Stijn Imbrechts, Pieter Libin, Ana Barroso Abecasis, Koen Deforche, Arley Gómez-López, Ricardo J. Camacho, Tulio de Oliveira, e Anne-Mieke Vandamme. 2013. "Automated Subtyping of HIV-1 Genetic Sequences for Clinical and Surveillance Purposes: Performance Evaluation of the New REGA Version 3 and Seven Other Tools". *Infection, Genetics and Evolution* 19 (outubro): 337–48. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.032>.
- Ragonnet-Cronin, Manon, Emma Hodcroft, Stéphane Hué, Esther Fearnhill, Valerie Delpech, Andrew J Leigh Brown, e Samantha Lycett. 2013. "Automated Analysis of Phylogenetic Clusters". *BMC Bioinformatics* 14 (1): 317. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-317>.
- Rhee, S.-Y. 2003. "Human immunodeficiency virus reverse transcriptase and protease sequence database". *Nucleic Acids Research* 31 (1): 298–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg100>.
- Sahni, Ak, Rm Gupta, A Nagendra, Sk Nema, R Rai, e Jr Bhardwaj. 2007. "Identification of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Subtypes by Heteroduplex Mobility Assay". *Medical Journal Armed Forces India* 63 (3): 249–52. [https://doi.org/10.1016/S0377-1237\(07\)80146-8](https://doi.org/10.1016/S0377-1237(07)80146-8).
- Santos-Pereira, Ana, Carlos Magalhães, Pedro M. M. Araújo, e Nuno S. Osório. 2021. "Evolutionary Genetics of Mycobacterium Tuberculosis and HIV-1: "The Tortoise and the Hare"". *Microorganisms* 9 (1): 147. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010147>.
- Schulz, Thomas F. 1998. "Retrovirus, Infection and Immunity". Em *Encyclopedia of Immunology*, 2092–98. Elsevier. doi:10.1006/rwei.1999.0529
- Shafer, Robert W. 2006. "Rationale and Uses of a Public HIV Drug-Resistance Database". *The Journal of Infectious Diseases* 194 (s1): S51–58. <https://doi.org/10.1086/505356>.
- Souza, Marcus Vinícius Nora de, e Mauro Vieira de Almeida. 2003. "Drogas Anti-VIH: Passado, Presente e Perspectivas Futuras". *Química Nova* 26 (3): 366–72. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300014>.

- Spector, S.A. 2014. "Human Immunodeficiency Virus Type-1". Em *Reference Module in Biomedical Sciences*, B978012801238300088X. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00088-X>.
- Struck, Daniel, Glenn Lawyer, Anne-Marie Ternes, Jean-Claude Schmit, e Danielle Perez Bercoff. 2014. "COMET: Adaptive Context-Based Modeling for Ultrafast HIV-1 Subtype Identification". *Nucleic Acids Research* 42 (18): e144–e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gku739>.
- Thomson, Michael M, Lucía Pérez-Álvarez, e Rafael Nájera. 2002. "Molecular Epidemiology of HIV-1 Genetic Forms and Its Significance for Vaccine Development and Therapy". *The Lancet Infectious Diseases* 2 (8): 461–71. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00343-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00343-2).
- Vermund, S. H., e A. J. Leigh-Brown. 2012. "The HIV Epidemic: High-Income Countries". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (5): a007195–a007195. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007195>.
- Woodburn, Blaide, Ann Emery, e Ronald Swanstrom. 2021. "Human Immunodeficiency Virus (Retroviridae)". Em *Encyclopedia of Virology*, 460–74. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814515-9.00042-4>.
- Zhu, Tuofu, Bette T. Korber, Andre J. Nahmias, Edward Hooper, Paul M. Sharp, e David D. Ho. 1998. "An African HIV-1 Sequence from 1959 and Implications for the Origin of the Epidemic". *Nature* 391 (6667): 594–97. <https://doi.org/10.1038/35400>.

# Anexos

Tabela 4: informação completa de todos o os clusters de transmissão

Designação	CLUSTER	SUBTIPO	GENÉRO	VIA	NRTI	NNRTI	PI Major
92067172_Hbraga_PT_2016.71	1.	G?			None	None	None
94018179_Hbraga_PT_2016.98	1.	G?			None	None	None
AF423755_Blast_ES_1999	1.	BG			None	None	None
40183942_Hbraga_PT_2017.14	2.	A1,D			None	None	None
406404_Hbraga_PT_2016.41	2.	A1,D,B			None	None	None
569198_Hbraga_PT_2017.15	2.	A1,D,B			None	None	None
21004285_Hbraga_PT_2013.35	3.	C	Male	IDU	None	None	None
24008102_Hbraga_PT_2013.55	3.	C	Male	IDU	None	E138EA	None
26011669_Hbraga_PT_2015.75	3.	C			None	None	None
92099333_Hbraga_PT_2015.87	3.	C			None	None	None
FJ360877_Blast_PT_2004	3.	C			None	None	None
FJ360878_Blast_PT_2004	3.	C			None	None	None
FJ360879_Blast_PT_2004	3.	C			None	None	None
FJ360880_Blast_PT_2004	3.	C			None	None	None
FJ360881_Blast_PT_2000	3.	C			None	None	None
FJ360882_Blast_PT_2008	3.	C			None	None	None
FJ360883_Blast_PT_2008	3.	C			None	V108VI	None
GQ399346_Blast_PT_2005	3.	C			None	None	None
HM102333_Blast_PT_2004	3.	C			None	None	None
40239744_Hbraga_PT_2015.47	4.	F1			None	V106I	None
KJ883096_Blast_ES_2011	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883139_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	None	None
KJ883140_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883143_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883144_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883145_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883146_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883147_Blast_ES_2010	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KJ883150_Blast_ES_2011	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
KT276260_Blast_ES_2014	4.	F1	Male	MSM	None	V106I	None
40254254_Hbraga_PT_2015.82	5.	C			None	None	None
KC018551_Blast_ZM_2007	5.	C			None	None	None
KM050627_Blast_ZM_2007	5.	C			None	None	None
MT195234_Blast_ZM_2007	5.	C			None	None	None
MT195235_Blast_ZM_2007	5.	C			None	None	None
MT195237_Blast_ZM_2007	5.	C			None	None	None
23000084_Hbraga_PT_2016.78	6.	F1			None	None	None
40202814_Hbraga_PT_2015.87	6.	F1			None	None	None
96006063_Hbraga_PT_2016.78	6.	F1			None	None	None
40172390_Hbraga_PT_2013.78	7.	CRF02_AG	Male	Heterosexual	M41L	V179E	None
40180523_Hbraga_PT_2013.78	7.	CRF02_AG	Female	Heterosexual	M41L	V179E	None
40222163_Hbraga_PT_2017.23	7.	CRF02_AG			M41L	V179E	None
40304905_Hbraga_PT_2017.23	7.	CRF02_AG			M41L	V179E	None
22016037_Hbraga_PT_2015.18	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
40035147_Hbraga_PT_2015.17	8.	A1	Male	MSM	None	A98AG	None
40277068_Hbraga_PT_2016.53	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
640998_Hbraga_PT_2015.46	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
92045787_Hbraga_PT_2015.41	8.	A1	Male	BISSEXUAL	None	V179VFIL	None
99008459_Hbraga_PT_2015.24	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
KU685561_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
KY496622_Blast_ES_2015	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177654_Blast_ES_2016	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177656_Blast_ES_2016	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177677_Blast_ES_2013	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177680_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177681_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177683_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177685_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177686_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177692_Blast_ES_2015	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177694_Blast_ES_2016	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177699_Blast_ES_2017	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177700_Blast_ES_2017	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177724_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MK177754_Blast_ES_2016	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MN014504_Blast_ES_2015	8.	A1	Male	MSM	None	None	None
MN014505_Blast_ES_2014	8.	A1	Male	MSM	None	None	None

25000077_Hbraga_PT_2013.85	9.	A1	Male	Heterosexual	None	None	None
27007053_Hbraga_PT_2013.56	9.	A1	Male	Heterosexual/M	None	None	None
27017103_Hbraga_PT_2016.06	9.	A1	Male	Heterosexual	None	None	None
40184732_Hbraga_PT_2013.93	9.	A1	Male	Heterosexual	None	K103KI	None
40261667_Hbraga_PT_2016.04	9.	A1	Male	Heterosexual	None	None	None
MK177789_Blast_ES_2013	9.	A1	Male	MSM	None	None	None
92131025_Hbraga_PT_2015.65	10.	CRF02_AG			None	None	None
HF567908_Blast_ES_2012	10.	CRF02_AG	Male	MSM	None	None	None
MF109702_Blast_GB_2013	10.	CRF02_AG	Male	MSM	None	None	None
40254410_Hbraga_PT_2015.86	11.	A1	Male	MSM	None	None	None
571843_Hbraga_PT_2016.18	11.	A1	Male	MSM	None	None	None
94009650_Hbraga_PT_2017.09	11.	A1	Male	Heterosexual	None	None	None
97011186_Hbraga_PT_2016.29	12.	B			None	None	None
GQ399817_Blast_PT_2005	12.	B			None	None	None
KX662823_Blast_GB_2010	12.	B			None	None	None
MF403696_Blast_ES_2013	12.	B			None	None	None
MF403755_Blast_ES_2013	12.	B			None	None	None
MF404164_Blast_ES_2007	12.	B			None	None	None
520958_Hbraga_PT_2016.09	13.	B	Male	Heterosexual	None	None	None
634049_Hbraga_PT_2015.88	13.	B	Male	MSM	None	None	None
GQ399287_Blast_PT_2004	13.	B			None	None	None
KX662234_Blast_GB_2009	13.	B			None	None	None
MF404328_Blast_ES_2012	13.	B			None	None	None
MT570406_Blast_GB_2015	13.	B			None	None	None
MT571214_Blast_GB_2014	13.	B			None	None	None
MT571260_Blast_GB_2014	13.	B			None	None	None
22006224_Hbraga_PT_2013.88	14.	B	Male	Other	None	V106I,G19	None
40162625_Hbraga_PT_2013.65	14.	B	Male	MSM	None	V106I,G19	None
40172412_Hbraga_PT_2015.18	14.	B	Male	MSM	None	V106I,G19	None
40278111_Hbraga_PT_2016.54	14.	B	Male	MSM	None	V106I,G19	None
20020863_Hbraga_PT_2013.84	15.	G	Male	IDU	None	V179E	None
27009378_Hbraga_PT_2015.56	15.	G			None	V179E	None
29000631_Hbraga_PT_2016.59	15.	G			None	V179E	None
92116474_Hbraga_PT_2015.63	15.	G			None	V179E	None
92119764_Hbraga_PT_2015.54	15.	G			None	V179E	None
92125837_Hbraga_PT_2016.82	15.	G			None	V179E	None
92130250_Hbraga_PT_2017.11	15.	G			None	V179E	None
126800_Hbraga_PT_2015.76	16.	G			None	None	None
21010522_Hbraga_PT_2013.47	16.	G	Male	IDU	None	None	None
92012213_Hbraga_PT_2015.54	16.	G			None	K101E	None
92096933_Hbraga_PT_2016.92	16.	G			None	None	None
GU362884_Blast_ES_2009	16.	G			None	None	None
40006058_Hbraga_PT_2016.56	17.	G			None	None	None
40203737_Hbraga_PT_2016.97	17.	G			None	None	None
655551_Hbraga_PT_2016.86	17.	G			None	Y181C	None