

Índice

1. Introdução	3
1.1. Partícula Viral e Organização Genómica	6
1.2. Ciclo de vida do VIH	9
1.3. Resposta Imunológica	11
1.4. Manifestações Clínicas	13
1.5. Diagnóstico Laboratorial	14
1.6. Terapêutica Antirretroviral	14
1.6.1. Inibidores da transcriptase reversa	16
1.6.1.1. Inibidores nucleosídicos	16
1.6.1.2. Inibidores não nucleosídicos	16
1.6.2. Inibidores da Protease	17
1.6.3. Inibidores da Integrase	17
1.6.4. Antagonistas do co-recetor CCR5	17
1.7. Mecanismos de resistência aos antirretroviricos	18
1.7.1. Resistência aos análogos de nucleósidos	18
1.7.2. Resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-nucleósidos	19
1.7.3. Resistência aos inibidores de proteases	19
1.8. Monitorização Laboratorial da Infeção VIH-2	19
1.8.1. Determinação da carga viral plasmática (virémia) do VIH-2 por PCR em Tempo real	19
1.8.2. Monitorização de resistências do VIH-2 aos anti-retrovirais	20
2.1. Objetivo Principal	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. Metodologia	23
3.2. Teste de resistências aos Inibidores da Protease e Transcriptase reversa do VIH-2	25
3.3. Teste de resistências aos Inibidores da Integrase do VIH-2	27

3.4. Teste de Determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-Receptores CCR5 ou CXR4	30
4. Resultados e Discussão.....	34
4.1 Caracterização Epidemiológica.....	34
4.2 Identificação e caracterização das principais mutações na TR e PR	35
4.3. Identificação e caracterização das principais mutações da INT.....	37
4.4.Determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-receptores CCR5 ou CCXR4.....	39
5. Conclusão:	40
6. Referências Bibliográficas	41

1. Introdução

A infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) foi descoberta em 1983 por Luc Montagnier num número reduzido de pessoas e evoluiu em poucos anos para um problema prioritário de saúde pública a nível mundial ^{1,2}.

O grau de morbilidade e mortalidade causada pelo VIH e o impacto global da infeção são muito elevados, como se pode verificar na figura 1. Em 2012, cerca de 35,3 milhões de pessoas no Mundo estavam infetadas com o vírus sendo que, desde o início da epidemia, cerca de 75 milhões de pessoas foram infectadas ³.

No ano de 2011, prevê-se que existissem cerca de 48.000 pessoas infetadas com VIH em Portugal ⁴.

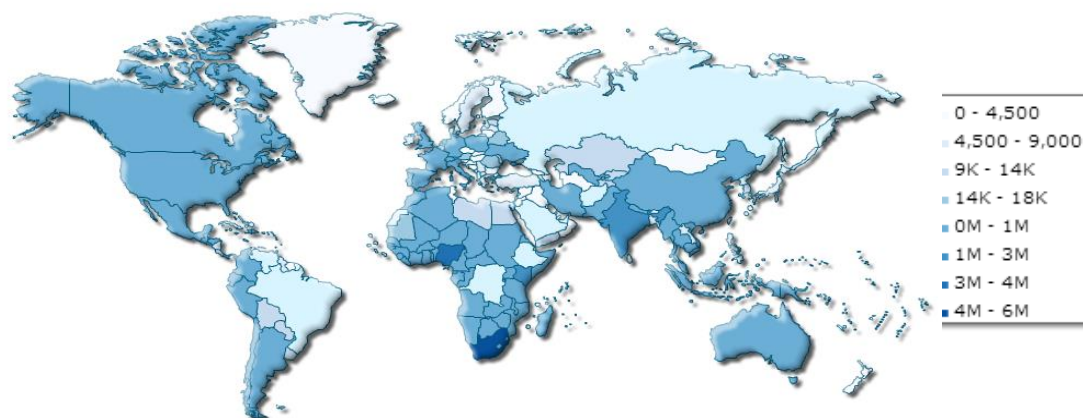


Figura 1: Estimativa da população infetada com VIH no mundo em 2012 (adaptado de <http://www.indexmundi.com/map/?t=0&v=35&r=xx&l=pt>)

Esta doença é caracterizada por uma profunda imunossupressão que está associada a infeções oportunistas e a neoplasias ¹.

Os agentes etiológicos da SIDA são o VIH-1 e VIH-2 que se distinguem por apresentarem diferentes propriedades antigénicas, moleculares e biológicas ^{1,2,5-8}.

O 2º agente causador de SIDA (VIH-2) foi inicialmente identificado, num grupo de indivíduos saudáveis do Senegal cujo soro apresentava uma reactividade cruzada mais forte para o Vírus da Imunodeficiência dos Símios (VIS)

do que para o VIH-1, levantando a suspeita de um novo retrovírus. Nos finais de 1985, a partir de um trabalho de colaboração entre clínicos, virologistas portugueses e investigadores franceses, foi possível o isolamento, em Paris, de um novo retrovírus a partir do sangue de doentes provenientes da Guiné-Bissau, internados na Unidade de Doenças Infeciosas e Parasitárias do Hospital Egas Moniz, o qual denominaram de VIH-2 ⁹.

Tal como o VIH-1, este vírus tem origem em África, muito provavelmente na região da Costa do Marfim, tendo a infeção progredido em epidemias localizadas, para as regiões limítrofes, atingindo sobretudo as ex-colónias francesas e portuguesas da África Ocidental. O VIH-1 é responsável pela pandemia a nível mundial, enquanto o VIH-2 é responsável por epidemias mais localizadas. Atualmente estima-se que a prevalência de infeção do VIH-2 seja 2 milhões em todo o mundo, principalmente em países de África Ocidental, como a Guiné – Bissau, Senegal e Guiné. De facto o grande foco de infeção pelo VIH-2 localiza-se nas ex-colónias portuguesas e francesas da África Ocidental, sobretudo na Guiné-Bissau onde a taxa de prevalência por VIH-2 é superior à do VIH-1. Por esta razão é sugerido que a infeção pelo VIH-2 se tenha disseminado a partir desta localização para outras regiões, sobretudo para a Europa, com maior expressão em Portugal e França. ^{5,10,11} Portugal é um dos países da Europa que apresenta uma alta taxa de prevalência de infeção pelo VIH-2 entre os casos de SIDA. Até 31.12.2011 registaram-se 527 casos de SIDA por este tipo de vírus, o que corresponde a 3,1% do total de casos de SIDA noticiados ¹².

O VIH-2 tem origem no VIS, resultando da passagem para o Homem da variante que infecta um primata *Sootymangabey* (*Cercocebustorquatusatys*) (VISsm), existente na África Ocidental. Do ponto de vista genético o VIH-2 está mais próximo do VIS, com uma homologia nucleotídica de 75% a 80%, em comparação com o VIH-1, com o qual tem 30% a 40% de homologia com os produtos do gene *env* e 60% com os produtos dos genes *gag* e *pol* ^{5,8}.

A análise filogenética do VIH-2 permitiu até ao momento a identificação de 7 subtipos diferentes (A-G). Contudo, apenas para os subtipos A e B a

patogenicidade é conhecida, sendo o subtipo A o mais prevalente na África Ocidental e Europa ^{2,4}

A transmissão do VIH ocorre através de relações sexuais desprotegidas, partilha de seringas entre toxicódependentes, receção de transfusões sanguíneas com sangue contaminado e também através da transmissão vertical ⁸.

Em Portugal, nos casos em que a categoria de transmissão é conhecida (N=499), 385 casos (77,2%) correspondem a transmissão heterossexual, 60 (12,0%) referem possível transmissão do vírus por transfusões sanguíneas e 20 casos (4,0%), estão notificados em indivíduos toxicódependentes ¹².

Enquanto na infeção pelo VIH-1 o pico de prevalência se situa entre os 20 e os 40 anos, no caso do VIH-2, a prevalência o pico de idade da população infetada pelo VIH-2 é maior, situando-se entre os 40 e os 60 anos. A baixa transmissibilidade por via sexual e a baixa mortalidade podem justificar esta diferença ^{5,10}.

Uma vez que se trata de uma doença sexualmente transmissível seria de esperar que o pico da prevalência se encontrasse entre os jovens adultos, tal como se sucede com o VIH-1 ². No entanto, alguns estudos a justificam esta prevalência elevada nos indivíduos de maior idade devido à Guerra Colonial que decorreu na Guiné-Bissau entre 1961 e 1974. Esta ocorrência histórica provocou uma migração massiva de soldados para esta região, o que juntamente com as elevadas taxas de prostituição e devido às condições mínimas de prestação de cuidados de saúde poderão justificar a elevada taxa de prevalência inicialmente encontrada para esta infecção, assim como o facto de o pico da prevalência se situar entre a população de idade mais avançada ⁴.

Como já foi referido, Portugal é um dos países da Europa que apresenta maior prevalência de infecção pelo VIH-2 entre a sua população. Por este motivo torna-se importante a caracterização da sua população infetada de modo a que as características epidemiológicas e o curso da infeção pelo VIH-2 se tornem mais claros, a fim de que se torne mais facilitado a construção de estratégias para reduzir o número de infetados.

1.1. Partícula Viral e Organização Genómica

O VIH-1 e o VIH-2 pertencem à família *Retroviridae*, sub-família *Lentivirinae*, que engloba os retrovírus associados a doenças não neoplásicas de evolução lenta e degenerativa. A estrutura genómica do VIH-2 é muito semelhante à estrutura do VIH-1 e do VIS, a principal diferença reside no facto de possuir um gene *vpx* em vez de um gene *vpu*. A homologia dos nucleótidos entre os dois vírus é cerca de 60% para as regiões mais conservadas dos genes *pol* e *gag*, mas apenas de 30 a 40% para os outros genes, incluindo o gene *env*^{2,14}.

As partículas virais do VIH, quando observadas ao microscópio electrónico, apresentam uma estrutura esférica, de aproximadamente 100 nm de diâmetro e uma simetria complexa. O genoma do VIH é composto por duas cadeias idênticas de Ácido Ribonucleico (ARN) que codifica os genes do vírus, rodeado por uma cápside. O ARN está ligado às proteínas da nucleocápside e às enzimas necessárias ao desenvolvimento do virião, como a transcriptase reversa, a protease e integrase. Este conjunto é envolvido por um envelope viral, que é composto por uma bicamada fosfolipídica¹. Na figura 2, pode-se observar uma imagem ilustrativa da estrutura do VIH.

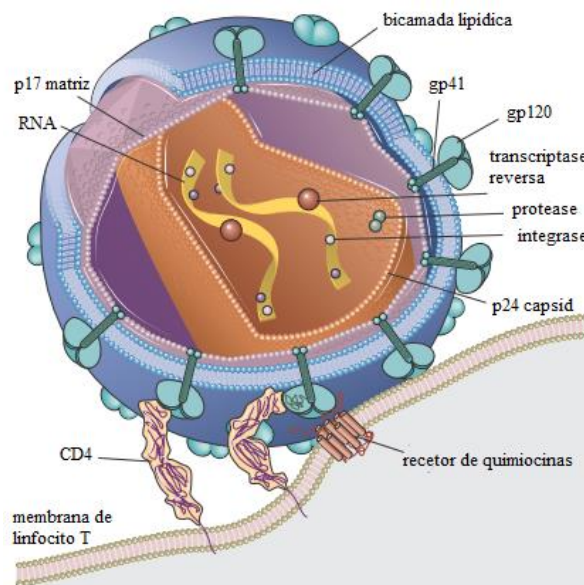


Figura 2: Estrutura do VIH (Adaptado de Abul K. Abbas, A.H.H.L., Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*. 2012: Philadelphia : Elsevier/Saunders)

O genoma do VIH-2 é constituído por duas cópias de ARN, com cerca de 9.200 pares de bases (pb). Ele é semelhante ao dos retrovírus em geral, sendo constituído por três genes estruturais: *gag*, *pol* e *env*, que codificam a maioria dos componentes estruturais e funcionais. O gene *env* codifica essencialmente as glicoproteínas do invólucro, que incluem a glicoproteína exterior gp105 e a glicoproteína transmembranária gp36, derivando estas da glicoproteína precursora gp140. O gene *gag* codifica as proteínas da nucleocápside p56, p26 e a proteína da matriz p16. As proteínas mais importantes codificadas pelo gene *pol* são a p68 que é precursora, a p53 (transcriptase reversa), a p11 (protease) e a p34 (integrase) ^{13,14}.

A transcriptase reversa (TR) está implicada na conversão do ARN viral de cadeia simples em Ácido desoxirribonucleico (ADN) proviral de cadeia dupla (transcrição reversa). A protease (PT) é responsável pelo processamento de poliproteínas durante a fase de maturação, cuja clivagem é essencial para assegurar a infeciosidade das partículas virais. A integrase (INT) está envolvida no transporte do complexo de pré-integração para o núcleo da célula e no mecanismo de integração do ADN retrotranscrito no genoma das células hospedeiras (provírus) ¹⁵.

Os genes reguladores e acessórios do VIH são: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, e *vpx* (para o VIH-2) ou *vpu* (para o VIH-1) ^{2,13,16}.

Os genes *tat* e *rev* codificam para proteínas reguladoras, com acção na activação da transcrição e regulação da expressão do ARNm vírico, respectivamente. O gene *nef* tem intervenção a nível da replicação vírica. O gene *vif* aumenta a infeciosidade vírica. Os genes *vpr* e *vpx* são necessários à replicação vírica eficiente ^{1,17-19}.

As repetições terminais longas (*Long Term Repetition* - LTRs) em cada extremidade do genoma regulam a expressão dos genes virais, a integração viral no genoma do hospedeiro e a replicação viral. Nas LTRs estão localizados elementos promotores importantes que asseguram a transcrição do ADN proviral.

Embora a expressão da regulação genética do VIH-2 pareça ser muito semelhante à do VIH-1, têm sido descritas várias diferenças que podem também ter importância relevante na diferente patogenezidade destes vírus ^{1,20,21}.

A estrutura genómica do VIH-2 é muito semelhante à estrutura do VIH-1. A homologia dos nucleótidos entre os dois vírus é cerca de 60% para as regiões mais conservadas dos genes *pol* e *gag* e cerca de 30 a 40% para os outros genes, incluindo o gene *env* ^{2,16}.

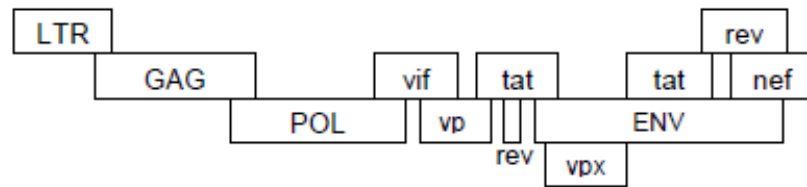


Figura 3: Representação do genoma do VIH-2

Tanto para VIH-1 como para VIH-2 foram identificados diferentes subtipos. No VIH-1, com base na sequência dos seus genes, foram identificados 3 grandes grupos: os grupos M, O e N. Para o grupo M estão identificados 9 subtipos: A, B, C, D, F, G, H, J, K ²².

Para o VIH-2, a sequenciação dos 3 genes estruturais *pol*, *env* e *gag* permitiu distinguir 8 diferentes subtipos de VIH-2 (A-H) ²³⁻²⁵. Em Portugal, assim como em toda a Europa, o subtipo de VIH-2 que predomina é o A ²⁶.

Em alguns casos, dois vírus de diferentes subtipos podem infectar o mesmo doente e existir recombinação genética, levando a uma geração de vírus com genoma de tipo mosaico. Muitas destas novas estirpes não apresentam capacidade replicativa mas as que são transmitidas, podem-se propagar muito rapidamente e são designadas de *Circulating Recombinant Forms* (CRFs) ²⁷.

Atualmente, para o VIH-1 estão descritas cerca de 50 CRFs diferentes ²⁸ mas a recombinação genética entre o VIH-2 é menos conhecida, sendo recentemente descrita a primeira forma recombinante deste vírus, a HIV-2CRF01_AB ²⁹.

1.2. Ciclo de vida do VIH

O recetor principal existente à superfície das células para a entrada, quer do VIH-1, quer do VIH-2, é o recetor T CD4 + existente nos linfócitos. O VIH-2, tal como o VIH-1, é um vírus com uma membrana de natureza lipídica que, para permitir que o core viral e o ARN viral atinjam o citoplasma da célula que infetam, tem de se fundir com a membrana celular. As espículas glicoproteicas existentes na superfície da partícula viral ligam-se a receptores existentes à superfície celular, induzindo a fusão das membranas celular e viral.

Estudos de cinética de fusão têm ajudado a esclarecer algumas diferenças observadas entre o VIH-1 e o VIH-2 sobre o seu mecanismo de entrada nas células. De facto, e embora a gp120 do VIH-1 tenha maior afinidade para o recetor T CD4+ do que a gp125 do VIH-2, a velocidade de fusão do VIH-2 é maior do que o VIH-1. Esta diferença parece residir na eficiência das alterações conformacionais que ocorrem na glicoproteína de superfície após interação com o recetor T CD4+ e que resultam na formação do local de ligação ao co-receptor na glicoproteína de superfície. No VIH-2 este processo é mais rápido do que no VIH-1, muito possivelmente porque a conformação constitutiva da gp125 é mais aberta, e por isso mais acessível, do que a da gp120. Nesta configuração da gp125, a região V3 encontra-se mais exposta para a ligação ao co-receptor ³⁰.

Esta diferença na configuração da gp120 e da gp125 é consistente com a observação de que o VIH-2 é mais suscetível aos anticorpos neutralizantes e com a existência de isolados primários de VIH-2 que infetam as células ligando-se diretamente aos co-receptores, sem a interação prévia com o recetor T CD4+ e, por isso, sem a necessidade de alterações conformacionais na glicoproteína de superfície induzidas pela ligação ao recetor T CD4+ ³¹. Os principais co-receptores

necessários para a entrada *in vivo* do VIH nas células são o CCR5 e o CXCR4, proteínas com sete regiões transmembranares que são receptores naturais das α e β quimiocinas. O tropismo do VIH para estes co-receptores está correlacionado com a capacidade de replicação dos vírus nas diferentes linhas celulares. Os vírus que utilizam o CCR5 (vírus R5) são geralmente isolados na fase assintomática da doença, infetam preferencialmente macrófagos, não formam sincícios (células gigantes multinucleadas) e têm uma taxa de replicação lenta/baixa. Os vírus que usam o co-receptor CXCR4 (vírus X4) são isolados numa fase mais avançada da doença, infetam preferencialmente linfócitos, formam sincícios e têm uma taxa de replicação rápida/alta. Os vírus que usam ambos os co-receptores são designados de vírus R5X4 ³².

Durante o ciclo de infeção do VIH ocorrem os seguintes processos:

- ❖ Interação entre o virião e os linfócitos T CD4⁺ através da glicoproteína viral gp120 e o recetor celular CD4. Nesta interação intervém também outras proteínas de membrana celular (receptores de quimiocinas) que atuam como co-receptores do vírus entre as quais se destacam CCR5 e CXCR4;
- ❖ Fusão das membranas com conseqüente libertação no citoplasma da celular da cápside viral;
- ❖ Transcrição reversa do genoma do vírus de ARN a ADN complementar (ADNc) por intermédio da atividade da TR viral;
- ❖ Degradação do ARN da heteroduplex e síntese da segunda cadeia ADN. Estas atividades são também catalisadas pela TR;
- ❖ Circularização do ADN e migração para o núcleo celular;
- ❖ Integração no genoma celular através das sequências LTR, por ação de uma INT viral;
- ❖ Transcrição do ADN proviral através da maquinaria celular;
- ❖ Processamento dos transcritos primários até formar ARN genómico viral e ARNm viral;
- ❖ Processamento da proteína viral através da atividade da PT viral e de certas proteínas celulares;
- ❖ Montagem e libertação do virião ^{18,20,33,34}.

Na figura 4, pode-se observar uma imagem ilustrativa do ciclo descrito.

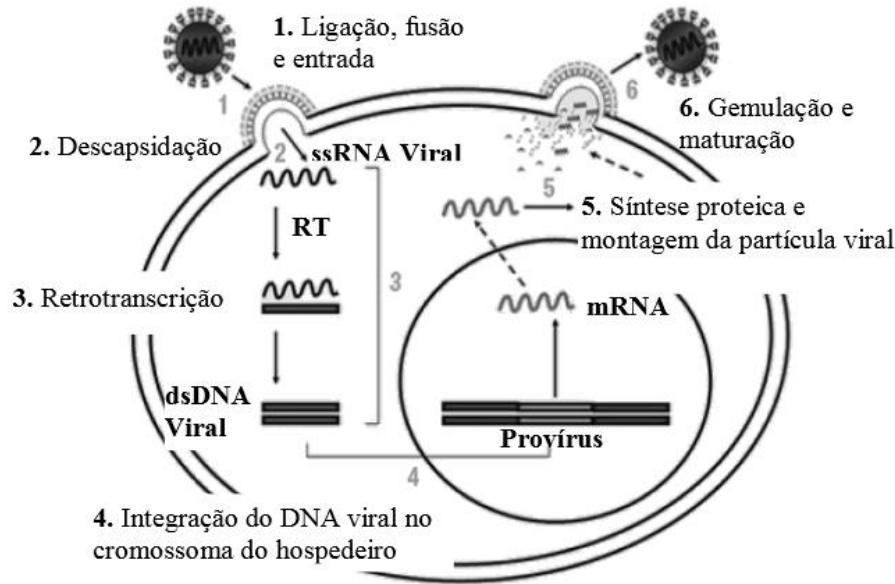


Figura 4: Ciclo replicativo do VIH (adaptado de Fanales-Belasioetal., 2010 ³⁵)

1.3. Resposta Imunológica

Embora os estudos existentes sejam reduzidos, existem várias características da resposta imunológica contra o VIH-2 que a distinguem da infeção pelo VIH-1, mesmo nos indivíduos que se encontram numa fase avançada da doença. As respostas imunitárias, especialmente na fase assintomática da infeção por VIH-2, são mais fortes e eficazes do que no VIH-1, resultando em níveis mais baixos de replicação viral. Ao contrário da maioria dos indivíduos infectados com VIH-1, a maioria dos indivíduos infetados com VIH-2 têm respostas T celulares proliferativas para as proteínas *env* e *gag* de VIH-2 e VIS. Uma resposta citotóxica forte é também comum na infeção por VIH-2. Na infeção por VIH-1 raramente se encontram anticorpos neutralizantes, mas uma infeção por VIH-2 induz anticorpos neutralizantes contra vírus homólogos com extensa reatividade cruzada contra vírus VIH-2 heterólogos, VIH-1 e VIS ³⁶.

Estes anticorpos neutralizantes são específicos para as glicoproteínas do invólucro. Estudos da resposta dos linfócitos T citotóxicos em cultura mostraram

que os linfócitos de indivíduos infetados pelo VIH-2, 18/20 (90%), tinham atividade dirigida contra as proteínas do gene *gag* e 14/20 (70%) contra as proteínas do gene *pol* ³⁷. A extensão da atividade citolítica específica, contra as proteínas codificadas pelos genes *gag*, *pol* e *nef* de linfócitos T citotóxicos em cultura, pertencentes a indivíduos assintomáticos infetados pelo VIH-2 na Gâmbia é inversamente correlacionada com a carga proviral ³⁸. Foi também publicado um trabalho que comparou as propriedades imunossupressoras da gp105 (VIH-2) e da gp120 (VIH-1), de forma a correlacionar a provável ausência ou menor capacidade imunossupressora da gp105 com a menor patogenicidade do VIH-2. Contrariamente ao que seria esperado, a gp105 apresentou maior atividade imunossupressora do que a gp120, e os autores acabaram por concluir que as propriedades imunossupressoras das glicoproteínas do invólucro viral poderão ter uma ação benéfica, em vez de prejudicial, para o hospedeiro, limitando a replicação viral. Esta hipótese pode em parte explicar o declínio menos acentuado do número de células T CD4+ na infeção pelo VIH-2 ³⁹. Um mecanismo que poderá também explicar a reduzida depleção de células T CD4+ nos indivíduos infetados pelo VIH-2 é o facto de as suas células T CD4+ serem menos suscetíveis à apoptose ⁴⁰. A resposta imunológica específica em indivíduos infetados pelo VIH-2 gera também maiores quantidades de interleucina 2 (IL-2) do que na infeção pelo VIH-1, particularmente no subgrupo de células T CD4 +. Considerando o papel central da IL-2 como um factor de sobrevivência e proliferação linfocitária, poderá ser uma possível função imunológica para o curso distinto da imunodeficiência pelo VIH-2 ⁴¹. A IL-16 é igualmente produzida em quantidades mais elevadas nas células infetadas com o VIH-2 do que com o VIH-1 ⁴².

Em resumo, as alterações imunológicas, que podem ser observadas clinicamente, incluem hipergamaglobulinemiapoliclonal, aumento sérico dos marcadores de ativação celular, tais como a α -2 microglobulina e a neopterinina, diminuição da proliferação linfocitária após estimulação com lectinas, elevação ligeira a moderada das células T CD8+ e uma diminuição progressiva da contagem das células T CD4+.

1.4. Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da infeção por VIH-2 são semelhantes as da infeção pelo VIH-1: ambos os vírus causam falência imunológica com progressão para SIDA. No entanto, a infeção por VIH-2 tem um prognóstico melhor e a progressão para doença é mais lenta ⁴³. Normalmente, as pessoas infetadas pelo VIH-2 tem um período de latência clínica dez ou mais anos e alguns pacientes podem nunca progredir para SIDA ⁴⁴. A taxa de mortalidade de infeção por VIH-2 calcula-se que seja 2/3 inferior à infeção pelo VIH-1 ⁴³. Quando a infeção progride, a carga viral e as manifestações clínicas tem uma evolução semelhante às encontradas nas infeções pelo VIH-1. O tempo de sobrevivência com SIDA é geralmente maior na infeção por VIH-2 ⁴⁴. Na infeção pelo VIH-1, os sintomas podem ser divididos em duas categorias distintas: sintomas causados pelo vírus propriamente dito e sintomas causados pelas infeções oportunistas ou tumores, resultantes da destruição do sistema imunitário. Na infeção pelo VIH-2 verifica-se o mesmo: pode causar linfadenopatias difusas, perda de peso e diarreia crónica na ausência de qualquer outro agente causal identificável. Também como no caso da infeção pelo VIH-1, a infeção pelo VIH-2, por si só, pode causar patologias a nível do sistema nervoso central e periférico. A infeção pelo VIH-1 caracteriza-se inicialmente, e na maioria dos casos, por uma fase aguda sintomática, semelhante à de uma síndrome gripal ou a uma síndrome mononucleósica. No caso da infeção pelo VIH-2, pensa-se que eventualmente ocorrerá também uma fase aguda sintomática. No entanto, foi descrito apenas um caso, provavelmente por ausência de estudos ⁴⁵. A infeção por VIH-2 está também associada a muitas das infeções oportunistas encontradas na infeção pelo VIH-1 como: tuberculose, candidíase esofágica, toxoplasmose cerebral, erupções por *herpes zoster*, retinite por citomegalovírus, salmonelose sistémica e diarreia secundária por *Isosporabelli* ou *cryptosporidium* ⁴⁶. A maior diferença poderá estar no facto de o Sarcoma de Kaposi se fazer sentir com menor frequência nos indivíduos infetados pelo VIH-2 ⁴⁶. Apesar das infeções oportunistas e tumores na infeção pelo VIH-2 serem semelhantes aos da infeção pelo VIH-1, os doentes com SIDA provocada pelo

VIH-2 vivem geralmente mais tempo do que os doentes com SIDA provocada pelo VIH-1 ⁴⁶.

1.5. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico de infeção por VIH-2 deve ser apoiado em testes de diferenciação realizados num laboratório acreditado, não esquecendo que, particularmente para o VIH-2, a indetectabilidade da carga víral não exclui o diagnóstico de infeção. A co-infeção por VIH-1 e VIH-2 é rara mas está bem documentada, particularmente em indivíduos oriundos de África Ocidental.

O diagnóstico da infeção VIH envolve a utilização sequencial de dois métodos de diagnóstico, que apesar de ambos detetarem anticorpos, são diferentes na tecnologia. Os primeiros a serem utilizados são conhecidos como métodos de rastreio e os segundos são considerados como métodos confirmatórios ou suplementares. Dentro das técnicas de rastreio, a mais conhecida é a *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), o *Western-blot* deteta anticorpos específicos contra as proteínas dos diversos constituintes da partícula viral do VIH-1, nomeadamente do núcleo (p17, p24 e p55), polimerase (p31, p51 e p66) e do envelope (gp41, gp120 e gp160). No VIH-2 a deteção é feita através das proteínas do *gag* (g26 e gp34) e do *env* (gp105). O Western-blot deve ser sempre usado após os testes de rastreio dado que é um teste altamente específico e que tem como objectivo, em termos práticos, informar-nos se um resultado positivo de um teste de rastreio é de facto um resultado verdadeiro positivo (VP), deste modo, confirma se um doente que tem um teste ELISA positivo está ou não infetado.

1.6 Terapêutica Antirretroviral

O acompanhamento médico do doente infetado pelo VIH exige, actualmente, uma planificação de cuidados a longo prazo, similar à dispensada a outras doenças crónicas. Embora não seja possível a erradicação do VIH com os

fármacos disponíveis, a reconstituição imunológica pode ser obtida, mesmo em estados avançados da infeção.

Na avaliação e acompanhamento dos doentes infetados por VIH-2 devem ser seguidas, de um modo geral, as mesmas recomendações gerais que são adotadas para os infetados por VIH-1. Os principais marcadores biológicos de evolução da infeção e os mais específicos são a carga viral e a contagem de linfócitos T CD4+. A contagem de linfócitos T CD4+ é um marcador imunológico que permite avaliar a cada momento de evolução da infeção o estado imunológico do indivíduo. Serve para determinar a probabilidade do desenvolvimento de infeções oportunistas. A infeção por VIH-1 encontra-se mais bem documentada na literatura médica do que a infeção por VIH-2 dado a primeira apresentar maior impacto em termos epidemiológicos.

Os objetivos da terapêutica antirretroviral são reduzir a carga viral e preservar e melhorar a função do sistema imunológico, atrasando a evolução da doença e modificando a história natural desta infeção. Desta forma, previne-se a ocorrência de manifestações oportunistas associadas ao VIH, melhora-se a qualidade de vida e prolonga-se a vida do doente. Para que estes objetivos sejam atingidos é fundamental que o tratamento seja feito de forma rigorosa e de acordo com as indicações do médico. Se o doente não cumprir adequadamente a medicação, a quantidade de medicamento que existe no sangue é insuficiente para inibir o crescimento do vírus e reduzir a carga viral. Isto permite que o vírus continue a destruir as células T CD4+ e também que adquira resistência aos medicamentos que o doente está a tomar de forma errada. Por outro lado, quando isto acontece, existe uma grande probabilidade de que ocorra resistência a outros medicamentos que pertencem às mesmas classes daqueles que está a tomar – é a chamada Resistência Cruzada. Atualmente, estão disponíveis diferentes classes de antirretrovirais, com alvos de ação e formas de atuação distintas, o que permite e facilita as combinações de medicação. Os vírus VIH precisam de três enzimas, que são essenciais nas etapas do seu ciclo de vida: a transcriptase reversa, a integrase e protease. Os antirretrovirais são geralmente nomeados de acordo com a enzima que bloqueiam, por isso temos os inibidores da transcriptase reversa

(ITR), os inibidores da protease (IP) e os inibidores de integrase (IIN). Existem ainda os inibidores da fusão (IF) que, como o nome indica, atuam na célula a nível dos recetores, impedindo a fusão destes com o vírus ou bloqueando a sua entrada na célula hospedeira, no entanto esta classe de fármacos actualmente não é muito recomendada devido a vários factores, entre eles, a falta de adesão dos doentes devido a efeitos secundários severos^{47,48}. Os antagonistas do CCR5 pertencem a uma classe relativamente nova de anti-retrovirais conhecidos como inibidores de entrada. Eles actuam ligando-se à parte hidrofóbica das quimiocinas CCR5, impedindo a ligação com a glicoproteína viral. A sua principal vantagem é serem ativos contra vírus resistentes às demais classes de antirretrovirais, além de ser mais tolerado e seguro, pois actua fora da célula. Apenas os vírus com tropismo para os co-recetores CCR5 são bloqueadas por este composto através da inibição do co-recetor CCR5 e/ou CXCR4^{47,48}.

1.6.1. Inibidores da transcriptase reversa

1.6.1.1. Inibidores nucleosídicos

Os inibidores nucleosídeos da transcriptase reversa (INTRs) são pró-fármacos que necessitam de um passo inicial de fosforilação intracelular (adição de três resíduos fosfato) para exercerem a sua função antiviral. Estes bloqueiam a atividade da TR ao competirem com o substrato pelo centro ativo da enzima, incorporando-se na cadeia de ADN viral complementar que se está a formar e atuando como terminadores de cadeia, de forma antecipada^{21,49-53}.

1.6.1.2. Inibidores não nucleosídicos

Inibidores não nucleosídeos da transcriptase reversa (INNTRs), que bloqueiam a atividade de polimerase da enzima através da indução de alterações conformacionais que alteram o seu local catalítico. São pequenas moléculas de natureza hidrofóbica que inibem especificamente a TR do VIH-1 e não apresentam qualquer atividade contra o VIH-2^{53,54}.

1.6.2. Inibidores da Protease

Os IPs, são inibidores competitivos que exercem a sua atividade baseada no princípio de mimetização molecular do domínio de ligação do substrato natural ao centro ativo da protease. Estes impedem a clivagem das poliproteínas precursoras do vírus pela PR viral, originando partículas virais estruturalmente desorganizadas e não infecciosas ^{52,55,56}.

1.6.3. Inibidores da Integrase

A integração do ADNc viral no genoma do hospedeiro é essencial para a manutenção, expressão e replicação viral. O inibidor da integrase bloqueia a etapa de transferência de cadeia, impedindo a integração, com formação de formas circularizadas do genoma viral ^{47,57}.

1.6.4 Antagonistas do co-recetor CCR5

Os antagonistas do CCR5 pertencem a uma classe relativamente nova de antirretrovirais conhecidos como inibidores de entrada. Eles atuam ligando-se à parte hidrofóbica da citocina CCR5, impedindo a ligação com a glicoproteína viral.

Maraviroc (Selzentry®) foi o primeiro fármaco desta nova classe, Inibidores dos co-receptores CCR5, a ser aprovado pela Federal *Drugs Association* (FDA). A sua principal vantagem é ser ativo contra vírus resistentes às demais classes de antirretrovirais, além de ser mais tolerado e seguro, pois atua fora da célula. Apenas as células com recetores CCR5 são bloqueadas por este composto ⁵⁸.

Algumas estirpes do vírus usam o receptor CXCR4, que não é bloqueado pelo Maraviroc, podendo assim ocorrer, por pressão seletiva: uma seleção dos viriões com CXR4, logo resistentes ao Maraviroc.

1.7 Mecanismos de resistência aos antirretroviricos

A resistência consiste no conjunto de mecanismos que um microrganismo pode desenvolver para escapar à ação dos fármacos administrados. Para este efeito, os vírus desenvolvem mutações que poderão ter como resultado uma perda total ou parcial da suscetibilidade do agente infeccioso ao fármaco. A resistência é conseguida essencialmente através de mutações nos genes que codificam as proteínas virais ²¹.

Existem dois conceitos que são importantes para a compreensão do desenvolvimento de resistência à droga. Em primeiro lugar, a infeção pelo VIH é caracterizada por elevados níveis de produção de vírus. Em segundo lugar, a transcrição reversa do ARN viral em ADN é muito propensa a erros, apresentando, em média, uma mutação para cada transcrição do genoma viral. A maioria destes erros são substituições de bases, mas podem também ocorrer duplicações, inserções e recombinações. A alta taxa de replicação do VIH combinada com a elevada taxa de mutação que ocorre durante cada ciclo de infeção, leva a que o vírus possa ganhar algumas vantagens seletivas, tal como uma diminuição na sua suscetibilidade a determinado fármaco antirretroviral ⁵⁹.

As mutações de resistência alteram geralmente a forma das proteínas virais e conseguem reduzir a atividade farmacológica mediante vários mecanismos:

1.7.1 Resistência aos análogos de nucleósidos

Existem dois mecanismos de resistência associados aos INTRs. O primeiro é mediado pela aquisição de mutações que conferem à TR um grau de discriminação superior entre os nucleótidos (dNTPs) e os seus análogos, prevenindo a ligação dos inibidores durante a síntese da cadeia nascente de ADNc. O segundo mecanismo é mediado pelo aparecimento de mutações associadas à capacidade de remoção dos INTRs, a partir da extremidade 3' da cadeia nascente de ADN, após a sua incorporação, permitindo assim a

continuação da síntese do ADNc viral. Os INTRs apresentam uma barreira genética elevada, pois é necessária uma acumulação progressiva de mutações para conferir um alto grau de resistência^{60,61}.

1.7.2 Resistência aos inibidores da transcriptase reversa não-nucleósidos

As mutações responsáveis pela resistência aos INTRs produzem-se através das substituições de aminoácidos ao nível da região de ligação dos próprios inibidores⁵³. Uma só mutação pode produzir um alto nível de resistência a um ou mais fármacos desta família^{21,50}.

1.7.3 Resistência aos inibidores de proteases

Algumas das mutações relacionadas com a resistência aos IPs estão directamente relacionadas com a união da PR ao inibidor (mutações primárias) e outras melhoram a atividade dos mutantes sem estarem relacionadas directamente com a união ao inibidor (mutações secundárias). As resistências aos IPs aparecem mais lentamente do que aos INTRs^{21,50,62}.

1.8. Monitorização Laboratorial da Infeção VIH-2

1.8.1 Determinação da carga viral plasmática (virémia) do VIH-2 por PCR em Tempo real

Nos últimos anos, o acompanhamento clínico dos indivíduos infetados por VIH sofreu profundas alterações: o teste que permite a deteção e quantificação do ARN VIH-1 no plasma (carga viral) é considerado imprescindível na avaliação e tratamento dos indivíduos infetados com VIH-1. A determinação da carga viral do VIH-1 tem sobretudo dois objetivos: calcular o risco de progressão da doença e controlar a eficácia da terapêutica antirretroviral, quer em ensaios clínicos quer na prática clínica. Poucos estudos foram feitos com o objetivo de estudar a carga viral

na infeção pelo VIH-2, tendo estes sido realizados sobretudo em populações africanas e com base em metodologias desenvolvidas pelos próprios investigadores²⁶.

Apenas o subtipo A e o subtipo B do VIH-2 são prevalentes e têm sido encontrados fora África Ocidental. No entanto não existe nenhum teste comercial aprovado para a determinação/quantificação das cargas virais do VIH-2, desenvolvendo cada laboratório a técnica que lhe permita obter dados fidedignos,

A determinação da carga viral plasmática do VIH-2 é importante porque reflete o nível corporal total da replicação viral, constituindo um indicador da progressão da infeção, e da eficácia ou da falência da terapêutica antirretroviral, sendo importante a implementação de testes *in house* em laboratórios de referência para a correta monitorização desta infeção viral.

1.8.2. Monitorização de resistências do VIH-2 aos anti-retrovirais

A monitorização de resistências aos anti-retrovirais pode ser feita recorrendo-se a dois tipos de ensaio: fenotípicos e genotípicos.

Os ensaios fenotípicos consistem na obtenção de vírus recombinantes contendo sequências do gene *pol*, a partir do ARN genómico das estirpes em estudo, inseridas em vetores virais baseados no VIH, mas defetivos para aquele gene. Seguidamente mede-se o grau de inibição da replicação viral em sistema de culturas celulares *in vitro*, sob pressão seletiva de concentrações crescentes de diferentes fármacos antirretrovirais⁶⁴.

Os testes genotípicos pretendem detetar de um modo direto, mutações associadas à resistência fenotípica a fármacos capazes de inibir a replicação viral. Estes testes baseiam-se na sequenciação nucleotídica direta dos genes alvo, o gene *pol*. A identificação das mutações associadas é realizada de forma semi-automatizada, através da utilização de algoritmos informáticos que permitem a

elaboração de relatórios onde os padrões de mutação encontrados são associados a diferentes níveis de suscetibilidade aos antirretrovirais ⁶⁴.

Existe ainda pouca informação disponível relativamente à eficiência dos fármacos antirretrovirais nos pacientes infetados com VIH-2. Uma das razões para esta falta de informação poderá ser o facto de nas áreas geográficas onde a infeção por VIH-2 é mais prevalente o acesso às drogas antirretrovirais ser muito limitado, por questões económicas e logísticas ²⁵.

Os testes de resistência são muito utilizados nos países desenvolvidos para o VIH-1 e estes constituem uma mais-valia na escolha da terapia antirretroviral. No caso do VIH-2 não existe ainda um teste comercial para a deteção de mutações que conferem resistência a fármacos anti-retrovirais. Mas, é extremamente importante desenvolver técnicas que permitam detetar as mutações que estão associadas à resistência aos fármacos antirretrovirais.

2.1 Objetivo Principal

O principal objetivo deste projeto consiste em avaliar importância do laboratório de Biologia Molecular no diagnóstico e monitorização dos doentes infetados por VIH-2 na região norte. O Centro de Biologia Molecular está integrado no Serviço de Imunohemoterapia no Centro Hospitalar São João sendo um dos hospitais referência no tratamento destes doentes na região Norte.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a importância da implementação de um protocolo laboratorial para determinar a carga viral plasmática (virémia) do VIH-2 por PCR em Tempo real.
- ❖ Avaliar a importância da implementação de um protocolo laboratorial que permita identificar as mutações nos genes codificantes das enzimas protease e transcriptase reversa do VIH-2, que conferem resistência aos antirretrovíricos por sequenciação.
- ❖ Avaliar a importância da implementação de um protocolo laboratorial que permita identificar as mutações no gene codificante da enzima integrase do VIH-2, que conferem resistência aos antirretrovíricos por sequenciação.
- ❖ Avaliar a importância da implementação de um protocolo laboratorial para a determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-receptores CCR5 ou CXR4 por sequenciação.
- ❖ Identificar os principais polimorfismos e mutações e relaciona-los com a terapêutica instituída.
- ❖ Caracterizar epidemiologicamente os doentes infetados pelo VIH-2 acompanhados nas consultas de doenças infecciosas do Centro Hospitalar São João.

3. Metodologia

O Centro de Biologia Molecular (CBM) está integrado no Serviço de Imuno-Hemoterapia (SIH) do Centro Hospitalar de São João (CHSJ). Desde 2003 que este laboratório implementa protocolos laboratoriais, *in house*, aplicando técnicas de biologia molecular como *Polimerase Chain Reaction* (PCR) clássica e em PCR em tempo real e técnicas de sequenciação para dar resposta às necessidades dos doentes infetados por VIH-2. Serão descritos por ordem cronológica os protocolos implementados.

3.1. Determinação da carga viral plasmática (virémia) do VIH-2 por PCR em Tempo real

A prova destina-se a determinar o número de cópias por mL do HIV-2 em amostras de plasma. O ensaio tem como princípio PCR em Tempo Real, usando uma sonda Taqman. O protocolo descrito por *Damond et al*⁶³ foi adaptado e otimizado no laboratório.

O ARN Viral foi isolado e purificado usando o equipamento automático *QIASymphony*® e o kit *QIASymphony Virus/Bacteria*® - *Quiagen*. O protocolo foi otimizado pelo laboratório. O protocolo proposto pelo fabricante permite a extração com *inputs* de amostras de 200, 500 e 1000 µl e com volumes de eluição compreendidos entre 60 e 110 µl. A extracção é realizada em 1000 µl de plasma, com um volume de eluição 30 µl, de forma a aumentar a concentração.

No ARN extraído foi realizada uma reacção de transcrição reversa seguida de uma reacção de *Polimerase Chain Reaction* (RT-PCR). Este método consiste em obter ADNc por reacção de transcrição reversa tendo como molde a molécula ARN. Posteriormente na mesma reacção ocorre a amplificação, por PCR em tempo real, que se caracteriza por uma reacção na qual ocorre em simultâneo a amplificação e deteção, usando *primers* e uma sonda *Taqman*. As sequências alvo correspondem à região central do gene *gag* do VIH-2, usando os *primers*: HIV-

2 gag F3 (5'-gCgCgAgAAACTCCgTCTTg) e HIV-2 gag R1 (5'-TTCgCTgCCCACACAATATgTT) e o kit *LightCycler RNA Master probes* (Roche Diagnostics). Os produtos amplificados são detectados através da utilização de uma sonda de hidrólise (sonda Taqman):HIV-2 gag (6FAM-5'TAggTTACggCCCggCggAAAgAXT-PH). Os *primers* e sonda são sintetizados pela empresa TIB Molbiol, Germany. Como “standards” de quantificação são utilizadas diluições de uma solução stock da estirpe do VIH-2, (HIV-2 NIH-Z Strain Purified Virus de concentração $7,2 \times 10^{10}$ cp/mL e do lote 5B0021-PV da Advanced Biotechnologies Incorporated). A partir da solução stock são efetuadas diluições em plasma humano negativo, para obter as concentrações de $7,2 \times 10^5$ cp/mL; $7,2 \times 10^4$ cp/mL; $7,2 \times 10^3$ cp/mL; $7,2 \times 10^2$ cp/mL; $3,6 \times 10^2$ cp/mL e $1,8 \times 10^2$ cp/mL. Os “standards” são tratados da mesma forma que as amostras testadas. A reacção foi realizada no equipamento LightCycler 2.0 da Roche®.

Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes temperaturas de hibridização dos *primers* e sonda. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela1.

Tabela.1 – Protocolo para a determinação da carga viral VIH-2

Mistura de Reação (<i>Master Mix</i>)		Protocolo de RT-PCR em tempo real			
H2O	10.8 µl	Transcricpase reversa:	61°C	20 minutos	
Primer F3/R1 (10µM)	1 µl	Desnaturação		95°C	30 seg.
Sonda(5 µM)	2 µl	Desnaturação	95°C	1 seg.	45 ciclos
LC-RNA M.H.Probes	7.5 µl	Hibridização	61°C	15 seg.	
ARN	5 µl	Extensão	72°C	5 seg.	

3.2. Teste de resistências aos Inibidores da Protease e Transcriptase reversa do VIH-2

O Teste de resistências aos IPs e ITRs do VIH-2 tem como objetivo a determinação das mutações genotípicas da protease (PR) e transcriptase reversa (TR) que conferem resistências aos antiretroviricos em doentes infetados por VIH-2. O protocolo foi adaptado e otimizado baseando no protocolo descrito por Ricardo Camacho, *et al.* O ARN Viral foi isolado e purificado usando o equipamento automático *QIASymphony®* e o kit *QIASymphony Virus/Bacteria® - Quiagen*. O protocolo foi otimizado pelo laboratório. A extracção é realizada em 1000 µl de plasma, com um volume de eluição 30 µl, de forma a aumentar a concentração.

O ARN foi convertido em ADNc por reacção de transcrição reversa e deste são amplificadas, por PCR clássico, sequências do gene *pol* que codificam para a PT e TR virais. Para a realização da mistura de reacção (master Mix) usa-se o kit *Acess Quick RT-PCR System®* comercializado pela *Promega*. Os *primers* usados têm as seguintes sequências: JA218 (5'- GAAAGAAGCCCCGCAACTTCC e JA221 (5'- GCTCTGCTTCTGCTAATTCTGTCCA). Os *primers* são sintetizados pela empresa TIB Mobiol, Germany. Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes temperaturas de hibridização dos *primers*. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela 2.

Tabela 2 : Protocolo de RT- PCR do teste genotipico para a determinação de mutações no gene da PR e TR do VIH-2

Mistura de Reação(Master Mix)		Protocolo de RT-PCR			
H2O	14µl	Transcrição reversa		48°C	45 minutos
AVM/Tfl 5x Buffer	5 µl	Desnaturação		94°C	2 minutos
dNTP'S (10µM)	1 µl	Desnaturação	94°C	15 seg	40 ciclos
Primer JA218 (10µM) Primer JA221 (10µM)	0,5 µl	Hibridização dos primers	54°	30 seg	
MgSO4	1 µl	Extensão	68°	2 min	
Amv RT/ Tlf	1 µl	Extensão final		68°	5 minutos
ARN	7,5 µl				

Seguidamente foi realizado um protocolo de *nested*-PCR, amplificando-se um fragmento de 1480 pb do gene *pol* do VIH-2. Um *nested*-PCR consiste numa reacção de PCR em que o ADN a amplificar é o produto de uma prévia reacção de PCR. Para a realização da mistura de reacção (master Mix) usa-se o kit *Taq DNA Polymerase* (Thermoscientific®) comercializado pela Bioportugal. Os *primers* usados têm as seguintes designações e sequências: JA219 (5'AGGGGCTRACACCAACAGCAC) e JA220MOD (5'GTCTTTTATICCTGGGTAGAITTGTG) e são sintetizados pela empresa TIB Mobiol, Germany. Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes temperaturas de hibridização dos *primers*. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela 3.

Tabela 3 : Protocolo de *nested* - PCR do teste genotípico para a determinação de mutações da PR e TR do VIH-2

Mistura de Reacção (Master Mix)		Protocolo de <i>nested</i> - PCR			
MgCl ₂ (25mM)	5 µl	Desnaturação inicial		94°C	2 minutos
Buffer(NH₄SO₄)(10x)	5 µl	Desnaturação	94°C	15 seg.	40 ciclos
dNTP'S (10µM)	2 µl	Hibridização dos primers	60°C	30 seg.	
Primer JA219 (10µM) Primer JA220mod (10µM)	1 µl	Extensão	72°C	2 minutos	
Enz Taq (5U/ µl)	0,5 µl	Extensão final		72° C	5 minutos
Produto de 1ºPCR	3 µl				

Os produtos de PCR são submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, sujeito a uma voltagem de 100 Volts, durante 30 min em tampão TBE 1x. Visualizam-se os fragmentos no espectro Ultra-violeta (UV), usando o transluminador. Juntamente com as amostras coloca-se um DNA *master ladder* e por comparação efectuou-se uma semi-quantificação da concentração de DNA

para cada amostra, permitindo diluir a amostra para obter uma concentração ótima para a reacção de sequenciação (20-40 ng/ µl). Procedeu-se à purificação do produto de PCR devidamente diluído, usando a enzima *exosap* da *Celera*® e realizando as condições descritas pela fabricante.

Para a realização da reacção de sequenciação utilizou-se o Kit *BigDye3.1 sequencing*® da AppliedBiosystem® seguindo as instruções descritas e os primers JA219, JA220, JA222 (5'- ACCTCCAATAATCCTTATAATACC), JA223 (5'ACTGAATTTCTGTGAAATCTTGAGT), hiv2seqF (5'AGTCACAGCATAACATTGAG G) e hiv2seqR (5'-TGCCAAAATGTTGATTGGG). Os *primers* JA219, JA220, JA222, JA223 foram os mesmos utilizados no protocolo descrito².

Os *primers* **hiv2seqF** e **hiv2seqR** foram desenhados pelo CBM, usando o programa Primer3Plus <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus>.

As eletroforeses capilares são realizadas no sequenciador *ABI 3130xl Genetic Analyzer* da Applied Biosystem® segundo as instruções do fabricante.

As sequências de nucleótidos obtidas são reunidas, editadas e analisadas com o *software* SeqScape v2.6 da Applied Bioscience®. As sequências consenso obtidas são inseridas no programa <http://www.rega.leuven.be/cev/> da universidade de Leuven na Bélgica. Desta forma é possível determinar o subtipo viral e identificar as mutações presentes nos genes estudados. O relatório fornecido indica a existência de deleções e inserções, a similaridade dos genes e ainda a suscetibilidade e/ou resistência aos fármacos antirretroviral.

3.3 Teste de resistências aos Inibidores da Integrase do VIH-2

O Teste de resistências aos Inibidores da Integrase do VIH-2 tem como objetivo a determinação das mutações genotípicas da INT que conferem resistências aos antirretroviricos em doentes infectados por VIH-2. O protocolo foi adaptado e otimizado baseando no protocolo descrito Roquebert, B., et al⁶⁵.

O ARN Viral é isolado e purificado usando o equipamento automático *QIASymphony®* e o kit *QIASymphony Virus/Bacteria®* - *Quiagen*. O protocolo foi otimizado pelo CBM. A extracção é realizada em 1000 µl de plasma, com um volume de eluição 30 µl, de forma a aumentar a concentração.

O ARN foi convertido em ADNc por reacção de transcrição reversa e deste são amplificadas, por RT-PCR clássico, sequências do gene *pol* que codificam para a IN viral. Para a realização da mistura de reacção (master Mix) utiliza-se o kit *Acess Quick RT-PCR System®* comercializado pela *Promega* e os *primers* com as seguintes sequências: INTHIV2O-F (5' ATAGTAGACTCACARTATGTMATGGG) e INTHIV2O-R (5' RGTTC CAATATSCYTGTAYCTCTAG), obtendo-se um fragmento de 1228 pb. Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes temperaturas de hibridização dos *primers*. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela 4.

Tabela 4: Protocolo de RT- PCR do teste genotipico para a determinação de mutações na INT do VIH-2

Mistura de Reacção (Master Mix)		Protocolo de RT-PCR			
H2O	14µl	Transcrição reversa	48°C	45 minutos	
AVM/Tfl 5x Buffer	5 µl	Desnaturação	94°C	2 minutos	
dNTP'S (10µM)	1 µl	Desnaturação	94°C	15 seg.	40 ciclos
Primer INTHIV2O-F (10µM) Primer INTHIV2O-R (10µM)	0,5 µl	Hibridização dos primers	55°C	30 seg.	
MgSO4 (25mM)	1 µl	Extensão	68°C	90 seg.	
Amv RT/ Tlf (5U/ µl)	1 µl	Extensão final	68° C	5 min	
ARN	7,5 µl				

Seguidamente são realizados dois protocolos de nested-PCR, amplificando-se dois fragmentos do gene *pol* do VIH-2 de 778 pb e 443pb. Para a realização das misturas de reacções (master Mix) usa-se o kit *Taq DNA Polymerase* (Thermoscientific®) comercializado pela Bioportugal. Para o 1º PCR os *primers* usados são: INTHIV2I-F (5`- GTCATATCCCCTATTCTC) e o INTHIV2O-F (5` ATAGTAGACTCACARTATGTMATGGG) e para o 2º PCR são usados os *primers*: INTHIV2I-R (5`TGCATGAATTTTAAAAGAAGGG) e o INTHIV2IS-F (5` AATATTACYCTRCTGCAAGT). Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes temperaturas de hibridização dos *primers*. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela 5.

Tabela 5. Condição para os protocolos de nested-PCR * *Primers* combinados como descritos anteriormente.

Mistura de Reacção (Master Mix)		Protocolo de nested - PCR			
MgCl ₂	5 µl	Desnaturação inicial		94°C	2 minutos
Buffer (NH₄SO₄)(10x)	5 µl	Desnaturação	94°C	15 seg.	40 ciclos
dNTP'S (10µM)	2 µl	Hibridização dos primers	55°C	30 seg.	
Primers* (10µM)	1 µl	Extensão	72°C	90 seg.	
Enz Taq(5U/ µl)	0,5 µl	Extensão final		72°C	5 minutos
Produto do 1ºPCR	3 µl				

Os produtos de PCR são submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, sujeito a uma voltagem de 100 Volts, durante 30 min em tampão TBE 1x. Visualizam-se os fragmentos no espectro UV, usando o transluminador. Juntamente com as amostras coloca-se um DNA *master ladder* e por comparação efectuou-se uma semi-quantificação da concentração de DNA para cada amostra, permitindo diluir a amostra para obter uma concentração ótima para a reacção de sequenciação (20-40 ng/ µl). Procedeu-se à purificação do produto de PCR

devidamente diluído, usando a enzima *exosap* da *Celera*® e realizando as condições descritas pela fabricante.

Para a realização da reacção de sequenciação utilizou-se o Kit *BigDye3.1 sequencing*® da AppliedBiosystem® seguindo as instruções descritas, e utilizaram-se os *primers* INTHIV2I-F e INTHIV2O-F para sequenciar o produto do 1º PCR obtido e os *primers* INTHIV2I-R e o INTHIV2IS-F para sequenciar o produto do 2º PCR.

As eletroforeses capilares são realizadas no sequenciador *ABI 3130xl Genetic Analyzer* da Applied Biosystem® seguindo as instruções do fabricante.

As sequências de nucleótidos obtidas são reunidas, editadas e analisadas com o *software* SeqScape v2.6 da Applied Bioscience®. As sequências consenso obtidas são inseridas no programa <http://www.rega.leuven.be/cev/> da universidade de Leuven na Bélgica. Desta forma é possível determinar o subtipo viral e identificar as mutações presentes nos genes estudados. O relatório fornecido indica a existência de deleções e inserções, a similaridade dos genes e ainda a susceptibilidade e/ou resistência aos fármacos antirretrovirais.

3.4. Teste de Determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-Receptores CCR5 ou CXR4

O teste laboratorial de determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-Receptores CCR5 ou CXR4 permite a determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-Recetores das quimiocinas CCR5 ou CXR4 existentes nos linfócitos TCD4+ em doentes infetados por VIH-2. O protocolo foi adaptado e otimizado baseando no protocolo descrito por Benoit Visseaux ¹¹.

O ADN pró-Viral é isolado e purificado usando o equipamento automático *QIASymphony*® e o Kit “QIASymphony DNA” Protocolo BC-200V6 seguindo as instruções do fabricante.

O ADN é extraído das amostras de *buffy-coat* e amplificado por PCR as sequências da região hipervariável V3 no gene *Env* que codifica para as

glicoproteínas de superfície virais. Para a realização das misturas de reacções (master Mix) usa-se o kit *Taq DNA Polymerase* (Thermoscientific®) comercializado pela Bioportugal e os *primers*: THIV2OF (5'- ATT TTC CAG GTS TGG CAR AGG TC e o THIV2OR (5'- GCA CAT CCC CAT GAA TTT AG), amplificando-se um fragmento com 2463 pb. Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes temperaturas de hibridização dos *primers*. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela 6.

Tabela 6- Protocolo de PCR para a determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-Recetores CCR5 ou CXR4

Mistura de Reacção (Master Mix)		Protocolo de PCR			
MgCl ₂ (25mM)	5 µl	Desnaturação inicial		94°C	5 minutos
Buffer(NH₄SO₄)(10x)	5 µl	Desnaturação	94°C	15 seg.	30 ciclos
dNTP'S (10µM)	2 µl	Hibridização dos primers	55°C	30 seg.	
Primer THIV2OF (10µM) Primer THIV2OR (10µM)	1 µl	Extensão	72°C	2 minutos	
Enz Taq(5U/ µl)	0,5 µl	Extensão final		72°	5 minutos
ADN proviral	3 µl				

Seguidamente é realizado um protocolo de *nested*-PCR, amplificando-se um fragmento de 1027 pb. Para a realização da mistura de reacção (master Mix) usa-se o kit *Taq DNA Polymerase* (Thermoscientific®) comercializado pela Bioportugal. Os *primers* usados têm as seguintes sequências THIV2IF (5' AGARTCATGTGAYAARCAYTATTGGGA) e THIV2IR (5' GCTGTTGCTGYTGCTGCACTATCC) Para a optimização do protocolo, foram realizados diferentes ensaios com concentrações diferentes de MgCl₂ e diferentes

temperaturas de hibridização dos *primers*. O protocolo mais específico e eficiente foi escolhido e está descrito na tabela 7.

Tabela 7. Protocolo de Nested-PCR para a determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-Recetores CCR5 ou CXR4

Mistura de Reacção (Master Mix)		Protocolo de nested- PCR			
MgCl ₂ (25mM)	5 µl	Desnaturação inicial		94°C	5 minutos
Buffer(NH₄SO₄)(10x)	5 µl	Desnaturação	94°C	15 seg.	45 ciclos
dNTP'S (10µM)	2 µl	Hibridização dos primers	60°C	45seg.	
Primer THIV2IF (10µM) Primer THIV2IR (10µM)	1 µl	Extensão	72°C	90 seg.	
Enz Taq(5U/ µl)	0,5 µl	Extensão final		72°C	5 minutos
Produto do 1ºPCR	3 µl				

Os produtos de PCR são submetidos a uma corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, sujeito a uma voltagem de 100 Volts, durante 30 min em tampão TBE 1x. Visualizam-se os fragmentos no espectro UV, usando o transluminador. Juntamente com as amostras coloca-se um DNA *master ladder* e por comparação efectuou-se uma semi-quantificação da concentração de DNA para cada amostra, permitindo diluir a amostra para obter uma concentração ótima para a reação de sequenciação (20-40 ng/ µl). Procedeu-se à purificação do produto de PCR devidamente diluído, usando a enzima *exosap* da *Celera*® e realizando as condições descritas pela fabricante. Para a realização da reacção de sequenciação utilizou-se o Kit *BigDye3.1 sequencing*® da AppliedBiosystem® seguindo as instruções descritas, e utilizaram-se os *primers* os primers THIV2IF e THIV2IR.

As eletroforeses capilares são realizadas no sequenciador *ABI 3130xl Genetic Analyzer* da Applied Biosystem® segundo as instruções do fabricante.

As sequências de nucleótidos obtidas são reunidas, editadas e analisadas com o *software* SeqScape v2.6 da Applied Bioscience®.

Para a determinação do tropismo do VIH-1 existe um algoritmo disponível no site WWW.Geno2pheno.com no qual se pode submeter as sequências nucleotídicas obtidas e determinar se o vírus tem Tropismo para o co-receptor CCR5 ou CXCR4.

No entanto, para o VIH-2 ainda não existe nenhum algoritmo disponível. No CBM para a determinação do Tropismo viral foram utilizados os mesmos critérios descritos por Benoit Visseaux ¹¹.

As sequências consenso obtidas foram partilhadas com este grupo de investigadores franceses, que nos ajudaram a validar o método implementado e permitiu a determinação do tropismo viral aos doentes infectados com VIH-2 que necessitavam de um esquema terapêutico que incluísse o Maraviroc.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização Epidemiológica

O CBM desde 2003 até outubro de 2015 realizou um total de 2826 determinações de virémia do VIH-2. Analisando os dados obtidos no nosso sistema informático (SISLAB) caracterizamos epidemiologicamente os doentes com infeção pelo VIH-2 acompanhados nas consultas de doenças infecciosas CHSJ nos itens idade, sexo e carga vírica. Os resultados obtidos evidenciam que é nos pacientes com idade mais avançada que se encontra o pico de prevalência da infeção, com 66,67% dos pacientes a terem idades compreendidas entre os 25 e os 54 anos (figura 5).

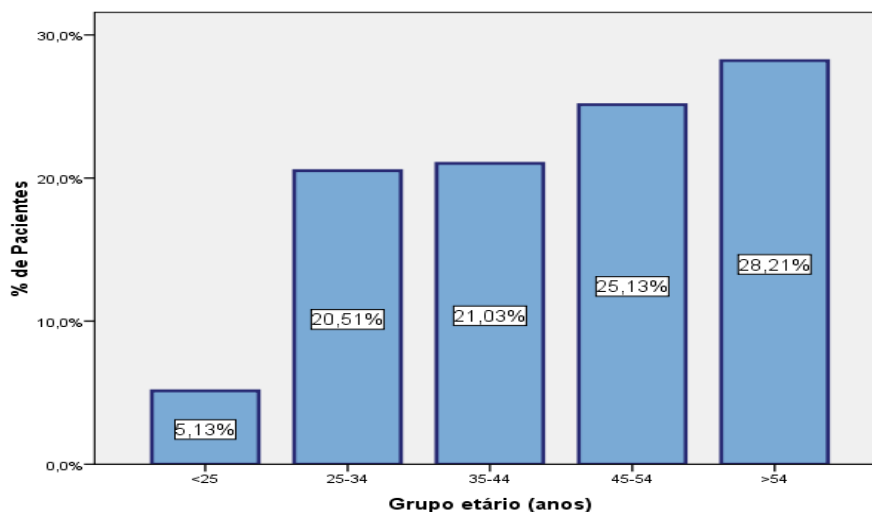


Figura 5: Frequência de pacientes por grupo etário

Os pacientes do sexo masculino e de idade mais avançada foram os que apresentaram valores de carga do VIH-2 mais elevadas. Por outro lado, os pacientes com menos de 45 anos apresentaram valores de cargas víricas reduzidos ao longo das várias quantificações realizadas.

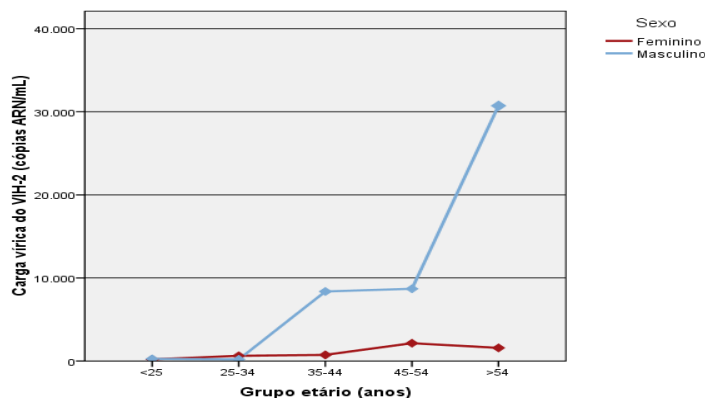


Figura 6: Carga vírica do VIH-2 por grupo etário e por sexo

4.2 Identificação e caracterização das principais mutações na TR e PR

Desde a implementação em 2014, realizamos 66 testes de resistências aos IP/TR e 30 testes de resistências aos inibidores da IN.

Identificaram-se no gene da TR 28 mutações diferentes, sendo as mais prevalentes as mutações: K65R, V111I, Q151M e M184V.

A mutação V111I representa 20,7% do total de mutações encontradas. Esta mutação não existe no VIH-1 e está geralmente associada à mutação Q151M. Estas duas mutações em conjunto conferem resistência à maioria dos INTRs. As mutações K65R e M184V correspondem respectivamente a 8,3% e 11,6 % (figura 7).

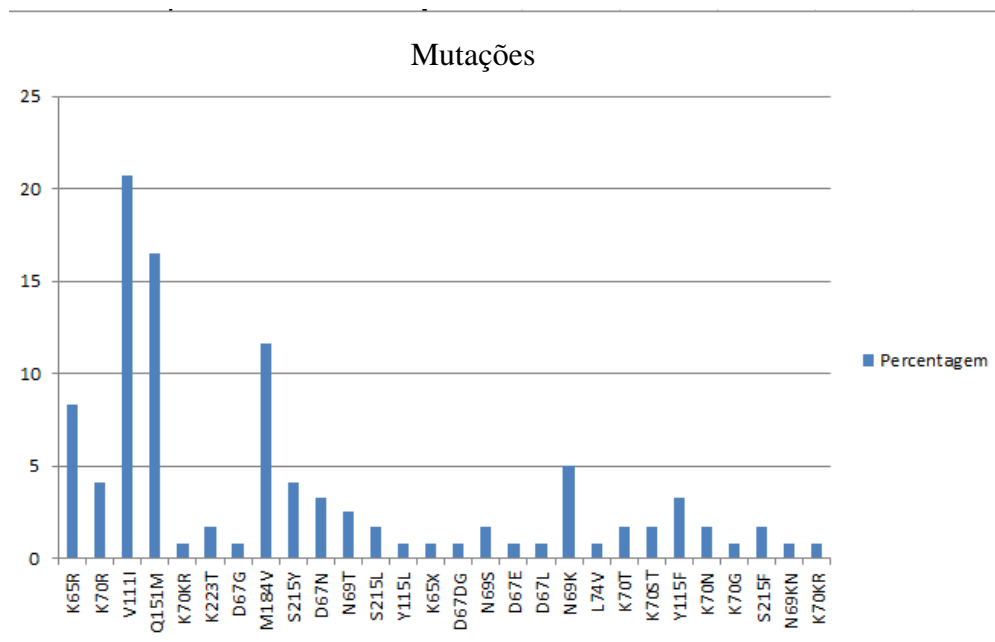


Figura 7: Prevalência das mutações encontradas no gene da TR

A mutação M184V confere resistência à lamivudina (3TC) e emtricitabina (FTC), no entanto, esta exerce efeitos favoráveis na suscetibilidade a outros fármacos INTRs, podendo melhorar a evolução clínica e imunológica através da diminuição da replicação viral⁵⁰.

A mutação K65R provoca resistência a Tenofovir (TDF), Didanosina (ddI), Estavudina (d4T) e Abacavir (ABC) mas, no entanto, aumenta a suscetibilidade à zidovudina (AZT)⁵¹.

A obtenção de uma frequência mais elevada para estas mutações no gene da transcriptase reversa é concordante com estudos anteriores.^{49, 52}

Na análise do gene da protease encontrou-se um total de 12 mutações diferentes, sendo que as mutações que apresentam maior frequência são: V47A, I84V, I54M e L90M (figura 8).

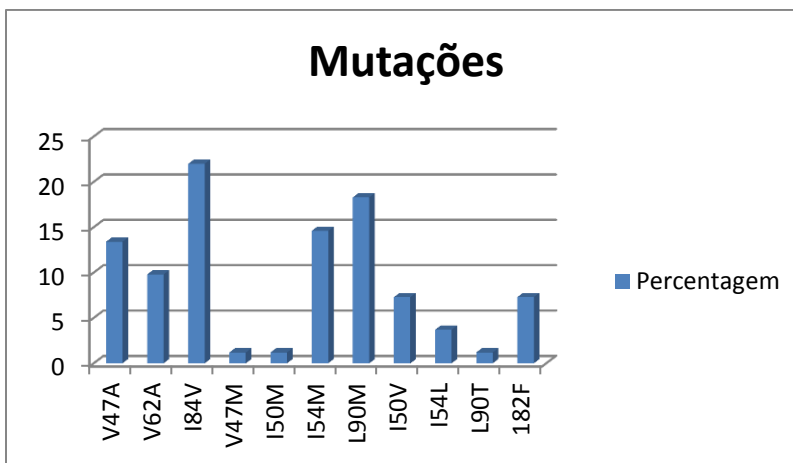


Figura 8: Prevalência das mutações encontradas na PT

A mutação I54M representa 14,6% do total de mutações encontradas no gene da PT. Esta é uma mutação não polimórfica que confere resistência Fosamprenavir (FPV), Lopinavir (LPV) e Darunavir (DRV). A mutação I84V representa 22,0% do total de mutações encontradas no gene da PT. Esta mutação é também não polimórfica e diminui a suscetibilidade geralmente a Darunavir (IDV), LPV, DRV, Saquinavir (SQV) e Tipranavir (TPV).⁵¹

A mutação L90M representa 18,3% do total de mutações encontradas no gene da PT e reduz a suscetibilidade a todos os IPs exceto TPV e DRV.⁵¹

A mutação V47A representa 13,4% do total de mutações encontradas no gene da protease. Esta mutação leva a uma redução da suscetibilidade ao LPV.⁵³

4.3. Identificação e caracterização das principais mutações da INT

Desde a implementação em 2014, realizamos 30 testes de resistências aos inibidores da IN.

Encontraram-se 4 mutações diferentes, E92Q, T97A, N155H e Y143C, sendo que as mais prevalentes são as mutações T97A e N155H. A mutação T97A representa 14,3% do total de mutações encontradas. A mutação N155H representa 28,6% do total de mutações encontradas (figura 9).

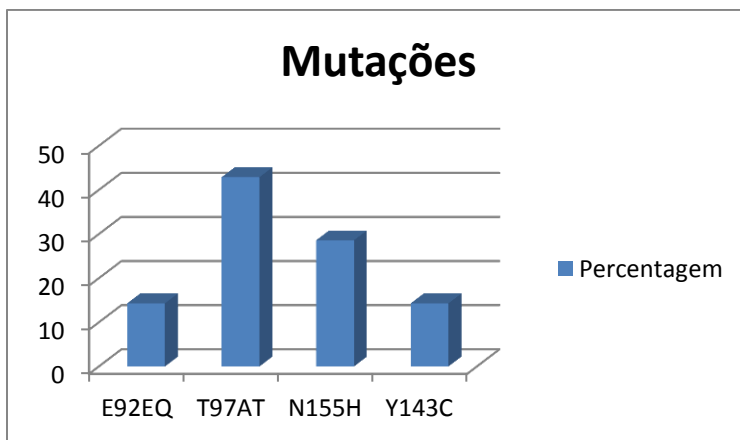


Figura 9: Prevalência das mutações encontradas na IN

A mutação N155H é uma mutação não polimórfica que por si só reduz a suscetibilidades ao RAL e ao Elvitegravir (EVG). A suscetibilidade a estes fármacos é ainda mais reduzida quando esta mutação está combinada com E92Q e outras mutações primárias ou acessórias que confirmam resistência aos IIN.⁵

4.4. Determinação do Tropismo do VIH-2 aos Co-receptores CCR5 ou CCXR4

O teste para a determinação do tropismo foi implementado em Julho de 2015. Realizaram-se 17 testes a 10 doentes. Os resultados encontrados estão na tabela 8.

Tabela 8: Amostras de cada paciente, data da colheita e tropismo determinado

Paciente	Data da Amostra	Tropismo Viral
Pc1	13-07-2014	X4
Pc1	13-07-2015	X4
Pc2	06-06-2014	X5
Pc2	23-07-2014	X4
Pc3	26-05-2014	X5
Pc3	23-07-2014	X5
Pc3	20-07-2015	X5
PC4	22-07-2014	X4
PC4	21-05-2015	X4
PC5	12-08-2014	X5
PC6	21-07-2014	X5
PC7	09-02-2015	X4
PC7	17-07-2015	X4
PC8	28-07-2014	X5
PC8	17-07-2015	X5
PC9	08-07-2014	X4
PC10	17-07-2015	X4

Dos resultados obtidos podemos constatar que 4 doentes apresentam tropismo viral para o co-receptor CCR5; 5 doentes apresentam tropismo viral para o CXCR4 e 1 doente apresenta resultados discrepantes aguardando colheita de uma amostra mais recente para esclarecimento da situação.

O número reduzido de doentes não nos permite tirar conclusões, mas podemos constatar que 50% dos doentes apresentam Tropismo para o co-recetor CCXR4. Este facto pode ser explicado pelos doentes serem portadores de infeção VIH-2 á mais de 15 anos.

5. Conclusão:

É complexo o desafio para o estudo desta problemática que é a infeção VIH/SIDA, pois é um problema de saúde pública que afeta a população em geral e está associada a comportamentos de risco.

Mais delicado ainda é estudar este problema em indivíduos seropositivos para o VIH-2, pelo número limitado de doentes infetados por este vírus, não sendo economicamente vantajoso para as empresas na área de diagnóstico laboratorial, o investimento em ensaios para o diagnóstico e monitorização da infeção. É por isso pertinente que os serviços hospitalares, nomeadamente serviços de doenças e infecciosas e em parceria com o laboratório de Biologia Molecular continuem a realizar esforços para proporcionar as mesmas oportunidades a doentes infetados por VIH-2 que as que têm atualmente os infetados por VIH-1.

Os objetivos deste projeto foram atingidos com sucesso, pois o CBM foi capaz de, recorrendo à tecnologia disponível, ao conhecimento e domínio científico e prático das várias metodologias, implementar métodos laboratoriais *in house*, para diagnóstico e monitorização dos doentes infetados pelo VIH-2. Com a implementação da determinação da carga viral foi possível calcular o risco de progressão da doença e controlar a eficácia da terapêutica antirretroviral na prática clínica destes doentes. Com a implementação dos testes genótipicos para identificação de mutações que conferem resistências aos vários alvos terapêuticos, torna-se possível adotar protocolos terapêuticos mais eficazes para cada paciente.

6. Referências Bibliográficas

1. Cellular and Molecular Immunology: with STUDENT CONSULT Online Access, 7e (Abbas, Cellular and Molecular Immunology): 9781437715286: Medicine & Health Science Books @ Amazon.com, <http://www.amazon.com/Cellular-Molecular-Immunology-STUDENT-CONSULT/dp/1437715281> (accessed 25 November 2015).
2. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, et al. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*; 326: 662–9, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3031510> (accessed 15 November 2015).
3. Fact sheet | UNAIDS, <http://www.unaids.org/en/resources/campaigns/globalreport2013/factsheet> (accessed 25 November 2015).
4. Faria NR, Hodges-Mameletzis I, Silva JC, et al. Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. *J Gen Virol*; 93: 889–99, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3542711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2012, accessed 25 November 2015).
5. Doms RW, Reeves JD. Human immunodeficiency virus type 2. *J Gen Virol*; 83: 1253–1265, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12029140> (2002, accessed 12 October 2015).
6. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*; 220: 868–71, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183> (1983, accessed 14 November 2014).
7. Brun-Vezinet F, Rey MA, Katlama C, et al. Lymphadenopathy-associated virus type 2 in AIDS and AIDS-related complex. Clinical and virological features in four patients. *Lancet (London, England)*; 1: 128–32, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2879971> (1987, accessed 26 November 2015).
8. Cloyd MW. Human Retroviruses, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7934/> (1996, accessed 26 November 2015).
9. FERREIRA MOS. Infecção VIH/SIDA, 2º curso de pósgraduação – colectânea de textos. In: LECOUR H, SARMENTO R (eds). Vila Nova de Famalicão: Glaxo Smith Kline, 2004, pp. 347–52.
10. De Cock KM, Weiss HA. The global epidemiology of HIV/AIDS. *Trop Med Int Heal* 2000; 5: A3–A9.
11. Visseaux B, Charpentier C, Collin G, et al. Cenicriviroc, a Novel CCR5 (R5) and CCR2 Antagonist, Shows In Vitro Activity against R5 Tropic HIV-2 Clinical Isolates. *PLoS One*; 10: e0134904, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4527700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2015, accessed 26 November 2015).
12. Infecções D de D, Epidemiológica UDREV, Infecções NDVLDD. *Infecção VIH/SIDA : a situação em Portugal a 31 de dezembro de 2012*. Lisboa, http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/984/3/relatorio_VIH_SIDA_2011_versao_web.pdf (2013, accessed 26 November 2015).
13. Markovitz DM. Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Int J Gynecol Obstet*; 42: 323, http://www.researchgate.net/publication/14819551_Infection_with_the_human_immunodeficiency_virus_type (1993, accessed 26 November 2015).
14. Tomasselli AG, Hui JO, Sawyer TK, et al. Specificity and inhibition of proteases from human immunodeficiency viruses 1 and 2. *J Biol Chem*; 265: 14675–83, http://www.researchgate.net/publication/20953750_Specificity_and_inhibition_of_proteases_from_human_immunod

- efficiency_viruses_1_and_2 (1990, accessed 26 November 2015).
15. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol*; 34: 233–44, <http://www.journalofclinicalvirology.com/article/S1386653205002374/fulltext> (2005, accessed 26 November 2015).
 16. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science (80-)*; 233: 343–346, <http://www.sciencemag.org/content/233/4761/343.abstract> (1986, accessed 26 November 2015).
 17. Wagner E. *Basic Virology*. Oxford: Blackwell Publishing, 2004.
 18. Koito A, Ishizaka Y (eds). *Retroviruses, retroelements and their restrictions*. Frontiers Media SA, <https://books.google.com/books?id=ZlwhCgAAQBAJ&pgis=1> (2015, accessed 26 November 2015).
 19. Watts JM, Dang KK, Gorelick RJ, et al. Architecture and secondary structure of an entire HIV-1 RNA genome. *Nature*; 460: 711–6, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2724670&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2009, accessed 10 November 2015).
 20. Cann A. *Principles of Molecular Virology*. Academic Press, 2001.
 21. Soriano V. *VI CURSO DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA CLÍNICOS*. Publicaciomes Permanyer., 2005.
 22. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, et al. Global and regional distribution of HIV-1 genetic subtypes and recombinants in 2004. *AIDS*; 20: W13–23, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053344> (2006, accessed 26 November 2015).
 23. Chen Z, Luckay A, Sodora DL, et al. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J Virol*; 71: 3953–60, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=191547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (1997, accessed 26 November 2015).
 24. Yamaguchi J, Devare SG, Brennan CA. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 16: 925–30, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10875618> (2000, accessed 15 November 2015).
 25. Damond F, Brun-Vezinet F, Matheron S, et al. Polymorphism of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) protease gene and selection of drug resistance mutations in HIV-2-infected patients treated with protease inhibitors. *J Clin Microbiol*; 43: 484–7, <http://jcm.asm.org/content/43/1/484.abstract> (2005, accessed 26 November 2015).
 26. Soriano V, Gomes P, Heneine W, et al. Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) in Portugal: clinical spectrum, circulating subtypes, virus isolation, and plasma viral load. *J Med Virol*; 61: 111–6, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10745242> (2000, accessed 26 November 2015).
 27. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, et al. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*; 46: 5–14, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20348614> (2010, accessed 31 August 2015).
 28. Binley JM, Wrin T, Korber B, et al. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol*; 78: 13232–52, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=524984&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2004, accessed 28 October 2015).
 29. Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, et al. HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 54: 241–7, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20502347> (2010, accessed 31 October 2015).

30. Gallo SA, Reeves JD, Garg H, et al. Kinetic studies of HIV-1 and HIV-2 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Retrovirology*; 3: 90, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1693918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2006, accessed 26 November 2015).
31. Sourial S, Nilsson C, Wärnmark A, et al. Deletion of the V1/V2 region does not increase the accessibility of the V3 region of recombinant gp125. *Curr HIV Res*; 4: 229–37, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611061> (2006, accessed 26 November 2015).
32. TAVEIRA N. *Etiologia da infeção VIH/SIDA*. In LECOUR, H.; SARMENTO, R. - *Infeção VIH/SIDA, 2º curso de pós-graduação – colectânea de textos*. Vila Nova de Famalicão: Glaxo Smith Kline, 2004.
33. Flint S. *Principles of virology*. ASM Press, 2000.
34. Vogt P. Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19388/> (1997, accessed 26 November 2015).
35. Masse S, Lu X, Dekhtyar T, et al. In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 2 with decreased susceptibility to lopinavir. *Antimicrob Agents Chemother*; 51: 3075–80, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2043247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2007, accessed 26 November 2015).
36. WHO. UNAIDS Report. Approaches to the development of broadly protective HIV vaccines: challenges posed by the genetic biological and antigenic variability of HIV-1. *AIDS* 2001; 1–25.
37. Bertoletti A, Cham F, McAdam S, et al. Cytotoxic T cells from human immunodeficiency virus type 2-infected patients frequently cross-react with different human immunodeficiency virus type 1 clades. *J Virol*; 72: 2439–48, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (1998, accessed 26 November 2015).
38. Berry N, Ariyoshi K, Jaffar S, et al. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *J Hum Virol*; 1: 457–68, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10195267> (accessed 26 November 2015).
39. Gomes P, Abecasis A, Almeida M, et al. Transmission of HIV-2. *Lancet Infect Dis*; 3: 683–684, <http://www.thelancet.com/article/S1473309903007977/fulltext> (2003, accessed 26 November 2015).
40. Jaleco AC, Covas MJ, Victorino RM. Analysis of lymphocyte cell death and apoptosis in HIV-2-infected patients. *Clin Exp Immunol*; 98: 185–9, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1534404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (1994, accessed 26 November 2015).
41. Alatrakchi N, Damond F, Matheron S, et al. Proliferative, IFN γ and IL-2-producing T-cell responses to HIV-2 in untreated HIV-2 infection. *AIDS*; 20: 29–34, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327316> (2006, accessed 26 November 2015).
42. Sousa AE, Chaves AF, Loureiro A, et al. Comparison of the frequency of interleukin (IL)-2-, interferon-gamma-, and IL-4-producing T cells in 2 diseases, human immunodeficiency virus types 1 and 2, with distinct clinical outcomes. *J Infect Dis*; 184: 552–9, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11494161> (2001, accessed 26 November 2015).
43. Andersson S. HIV-2 and Immune Response. *AIDS Rev* 2011; 3: 11–13.
44. Mota-Miranda A, Gomes H, Lima-Alves C, et al. Perinatally acquired HIV-2 infection diagnosed at 15 and 24 years of age. *AIDS*; 15: 2460–1, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11826851> (2001, accessed 26 November 2015).
45. OLIVEIRA J. *História natural da infeção VIH*. In LECOUR, H.; SARMENTO, R. - *Infeção VIH/SIDA, 2º curso de*

pós-graduação – colectânea de textos. Vila Nova de Famalicão: Glaxo Smith Kline, 2004.

46. Mansinho K. *Infeção pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 2*. In LECOUR, H.; SARMENTO, R. - *Infeção VIH/SIDA, 2º curso de pós-graduação – colectânea de textos*. Vila Nova de Famalicão: Glaxo Smith Kline, 2004.
47. Sousa CIC de. Diversidade genética e resistência natural ao Maraviroc em estirpes do vírus da imunodeficiência humana Tipo 1 (HIV-1) em circulação em utilizadores de drogas por via endovenosa na Grande Lisboa, <http://run.unl.pt/handle/10362/8170> (2012, accessed 26 November 2015).
48. Rodés B, Holguín A, Soriano V, et al. Emergence of drug resistance mutations in human immunodeficiency virus type 2-infected subjects undergoing antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*; 38: 1370–4, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=86447&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2000, accessed 26 November 2015).
49. Hirsch MS, Conway B, D'Aquila RT, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults with HIV infection: implications for clinical management. International AIDS Society--USA Panel. *JAMA*; 279: 1984–91, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643863> (1998, accessed 30 October 2015).
50. Deeks SG. International perspectives on antiretroviral resistance. Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 26 Suppl 1: S25–33, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264999> (2001, accessed 26 November 2015).
51. Sluis-Cremer N, Arion D, Parniak MA. Molecular mechanisms of HIV-1 resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs). *Cell Mol Life Sci*; 57: 1408–22, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11078020> (2000, accessed 26 November 2015).
52. Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: an update. *Antiviral Res*; 85: 210–31, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19616029> (2010, accessed 26 November 2015).
53. Chen R, Quinones-Mateu ME, Mansky LM. Drug resistance, virus fitness and HIV-1 mutagenesis. *Curr Pharm Des*; 10: 4065–70, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15579088> (2004, accessed 19 October 2015).
54. Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia M, et al. Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science*; 250: 1411–3, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1701568> (1990, accessed 26 November 2015).
55. Temesgen Z, Warnke D, Kasten MJ. Current status of antiretroviral therapy. *Expert Opin Pharmacother*; 7: 1541–54, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16872258> (2006, accessed 26 November 2015).
56. De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents*; 33: 307–20, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19108994> (2009, accessed 7 September 2015).
57. Katlama C, Murphy R. Emerging role of integrase inhibitors in the management of treatment-experienced patients with HIV infection. *Ther Clin Risk Manag*; 5: 331–40, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2697544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2009, accessed 26 November 2015).
58. MacArthur RD, Novak RM. Reviews of anti-infective agents: maraviroc: the first of a new class of antiretroviral agents. *Clin Infect Dis*; 47: 236–41, <http://cid.oxfordjournals.org/content/47/2/236.full> (2008, accessed 26 November 2015).
59. Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance. *N Engl J Med*; 350: 1023–35, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999114> (2004, accessed 8 November 2015).
60. Geretti AM. Antiretroviral Resistance in Clinical Practice, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2239/> (2006, accessed 26 November 2015).

61. Shafer RW, Schapiro JM. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART. *AIDS Rev*; 10: 67–84, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2547476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (accessed 15 September 2015).
62. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM, et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors. *Nature*; 374: 569–71, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7700387> (1995, accessed 26 November 2015).
63. Damond F, Gueudin M, Pueyo S, et al. Plasma RNA viral load in human immunodeficiency virus type 2 subtype A and subtype B infections. *J Clin Microbiol*; 40: 3654–9, <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=130845&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> (2002, accessed 26 November 2015).
64. Vitor D. Subtipos Genéticos e Resistência do Hiv-1. 2005.
65. Roquebert B, Damond F, Collin G, et al. HIV-2 integrase gene polymorphism and phenotypic susceptibility of HIV-2 clinical isolates to the integrase inhibitors raltegravir and elvitegravir in vitro. *J Antimicrob Chemother*; 62: 914–20, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718922> (2008, accessed 26 November 2015).