



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ÁDAMO YÉSSUS BRITO DA SILVA

**FREQUÊNCIAS DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E PRESSÃO SELETIVA
NAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DO HIV-1 APÓS A INTRODUÇÃO DOS
INIBIDORES DE INTEGRASE NO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO
EUROPEIA**

Recife

2022

ÁDAMO YÉSUS BRITO DA SILVA

**FREQUÊNCIAS DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E PRESSÃO SELETIVA NAS
SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DO HIV-1 APÓS A INTRODUÇÃO DOS INIBIDORES
DE INTEGRASE NO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO EUROPEIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas (CCM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como requisito final para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical.

ORIENTADORA: Profa. Dra. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO.

COORIENTADOR: Prof. Dr. ÉLCIO DE SOUZA LEAL.

RECIFE – PE

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

S586f Silva, Ádamo Yésus Brito da.
 Frequências das mutações de resistência e pressão seletiva nas sequências genômicas do HIV-1 após a introdução dos inibidores de integrase no Brasil, Estados Unidos e União Europeia / Ádamo Yésus Brito da Silva. – 2022.
 74 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

 Orientadora : Heloísa Ramos Lacerda de Melo.
 Coorientador : Élcio de Souza Leal.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2022.

 Inclui referências.

 1. HIV. 2. Integrase de HIV. 3. Fármacos Anti-HIV. I. Melo, Heloísa Ramos Lacerda de (Orientadora). II. Leal, Élcio de Souza (Coorientador). III. Título.

610

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2023-062)

ÁDAMO YÉSUS BRITO DA SILVA

**FREQUÊNCIAS DAS MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA E PRESSÃO SELETIVA NAS
SEQUÊNCIAS GENÔMICAS DO HIV-1 APÓS A INTRODUÇÃO DOS INIBIDORES
DE INTEGRASE NO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO EUROPEIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas (CCM) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) como requisito final para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 15 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Kledoaldo Oliveira de Lima (Examinador Externo)

Hospital das Clínicas – HC/UFPE

Dra. Viviane Martha Santos de Moraes (Examinador Externo)

Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami – LIKA/UFPE

Dedico esse trabalho a todos os cientistas brasileiros que durante os últimos anos seguiram lutando mesmo diante de tantas adversidades. Lutando contra a onda de ataques sofridos quase que diariamente àqueles que não se dobraram às notícias falsas. Lutando contra os cortes de recursos que por muitas vezes inviabilizaram projetos promissores de grande impacto para a sociedade. Lutando contra as acusações de balburdia que as nossas Universidades Federais sofreram injustamente apesar do trabalho árduo e constante para formar os mais brilhantes pesquisadores do nosso país. Lutando contra a desinformação propagada por pessoas mal-intencionadas que roubaram o bem mais precioso desse país, as vidas dos brasileiros durante essa pandemia. E finalmente aqueles que não se calaram e levantaram a voz, seja nas suas casas, nos seus ambientes laborais e nas redes sociais para dizer que não vamos desistir, vamos seguir em frente e passar por isso, porque nós somos brasileiros, porque somos resistência!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer às duas mulheres mais inspiradoras da minha vida, minha mãe e minha irmã, que são os exemplos que eu tento seguir todos os dias para me tornar uma pessoa melhor. Em segundo lugar, mas não menos importante, quero agradecer à Cristyell Aranda, você que vem sendo meu companheiro de aventuras para a vida, que não me deixou sozinho, mesmo nos momentos mais sombrios que passei nos últimos dois anos. A vocês três, todo o meu amor e carinho.

Não posso deixar de lembrar aqui os amigos que seguraram a minha mão firme e forte e me deram a esperança para seguir em frente a cada passo mais difícil que tive que dar, a vocês, Aline Mirely, Antonio Neto, Caroline Louise, Pedro Vilarim, Rafael Santana, Rogério Rosa e Tarcísio Menezes, não tenho palavras para agradecer nem descrever a importância que vocês têm na minha vida.

Também preciso agradecer aos meus colegas mestrandos Amanda Dantas, Cláudia Albuquerque, Jimmy Desrosier, Juliana Mané, Luciano Brainer, Renato Birlo e Weverton Alves, e doutorandos Bruno Veras e Marcela Franklin que me ajudaram a superar os desafios que é ingressar numa pós-graduação.

Agradeço também a meus professores formadores, aqueles que desde a infância se empenharam e compartilharam seus dias de luta comigo e meus colegas para nos transmitir as noções básicas da vida em sociedade, passando por meus professores dos ensinos fundamental e médio que incansavelmente repetiam aula após aula os conceitos para que eu pudesse ter a base necessária para encarar os desafios que me viriam pela frente.

Aos meus professores formadores profissionais que por muitas vezes me foram duros em suas avaliações, semestre após semestre na Universidade, mas que garantiram que eu estivesse plenamente preparado para desenvolver minha missão na biomedicina com a excelência digna de honrar seus nomes, mas que ao mesmo tempo, sempre foram acolhedores e solícitos, mesmo diante dos questionamentos mais simples, me ensinando também a ter humildade e respeito pelo outro.

A todos os professores do PPGMedTrop que cederam o seu tempo e bagagem de conhecimentos durante essa longa trajetória na Medicina Tropical, a vocês, devo o despertar do meu senso crítico que me ajudaram na construção dessa dissertação.

Preciso expressar aqui minha mais profunda admiração aos meus orientadores que me conduziram nessa jornada da pós-graduação, Professora Dra. Heloísa Ramos e Professor Dr. Élcio Leal, por sua paciência e disposição em me guiar e por acreditarem que eu conseguiria chegar até o fim. E um agradecimento em especial ao Professor Dr. Kledoaldo Lima por ter cedido seu tempo para debater comigo por tantas horas e me ajudar a melhorar dia após dia minha bagagem científica e a entender que sempre há mais para aprender.

Finalmente, gostaria de agradecer à razão da minha vida, aquela que desde sempre me ofereceu seu sorriso, o mais lindo da face da terra, e o seu brilho de curiosidade no olhar. Foi ela quem me ensinou que minha curiosidade é minha maior virtude e me encorajou a ser livre para agir e pensar, ela que com seu quase um século de vida me ensina que eu posso ir sempre mais longe, mesmo que eu ainda não saiba disso. Foi você, vovó, minha “Linda”, a inspiração que me guia até hoje.

Te amo, Bibi, te amo, Bibi!

“Para os crentes, Deus está no princípio de todas as coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão” (MARK PLANK, 1988, p. 54).

RESUMO

Dentre as proteínas mais importantes para a replicação do HIV está a integrase (IN), responsável pela integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira que é alvo dos mais recentes antirretrovirais de primeira linha, os inibidores de integrase (IIN). O aparecimento cada vez mais frequente de mutações de resistência aos IIN em locais como o Brasil, Estado Unidos e União Europeia, regiões onde predomina o subtipo B do HIV-1, incluindo o aparecimento de mutações de resistência primária. Neste trabalho foram analisados três conjuntos de sequências virais obtidos do banco de sequências de Los Álamos e classificados de acordo com o algoritmo de Stanford. As sequências foram divididas em antes (PRE) e após (POS) à introdução dos IIN no Brasil (BR-PRE – 92 e BR-POS – 153; total 245 sequências), Estados Unidos (US-PRE – 268 e US-POS – 481; total 749 sequências) e União Europeia (EURO-PRE – 162 e EURO-POS – 284; total 446 sequências), e analisadas quanto ao nível de resistência aos IIN, padrão de assinatura de aminoácidos e pressão seletiva. Identificamos 65 (4,51%) sequências com mutações de resistência, 12 (4,9%) do Brasil, 29 (3,9%) dos Estados Unidos e 24 (5,4%) da União Europeia. Identificamos que 90 dos 288 sítios continham alterações de aminoácidos em todos 6 grupos de sequências, distribuídos nos três domínios da Integrase, N-terminal (23aa), sítio catalítico (44aa) e C-terminal (23aa). Encontramos sequências com mutações de resistência primárias em sequências de antes da introdução dos IIN nos Estados Unidos (B.US.2002.FJ469748.L861P) e União Europeia (B.CY.2007.JF683756.CY204). As mutações acessórias mais prevalentes foram E157Q e T97A e 24 sítios foram sugestivos de pressão seletiva positiva. A resistência de qualquer nível aos IINs de primeira geração RAL e EVG, ocorreram em maior número do que aos de segunda geração DTG e BIC, em todos os locais. A menor barreira genética e interações medicamentosas mais comuns dessa primeira geração de IIN são outras possíveis razões para tais achados. Observou-se uma frequência de mutações de resistência ao Dolutegravir menor do que 2% nas três regiões estudadas. Surpreendeu a baixa frequência de mutações de resistência ao Dolutegravir.

Palavras-chaves: HIV – integrase de HIV – fármacos anti-HIV.

ABSTRACT

Among the most important proteins for HIV replication is integrase (IN), which is responsible for integrating viral DNA into the host cell genome and is the target of the most recent first-line antiretroviral drugs, integrase inhibitors (IINs). The increasingly frequent appearance of resistance mutations to IINs in places such as Brazil, the United States and the European Union, regions where HIV-1 subtype B predominates, including the appearance of primary resistance mutations. In this work, three sets of viral sequences obtained from the Los Alamos sequence bank were analyzed and classified according to the Stanford algorithm. The sequences were divided into before (PRE) and after (POS) the introduction of IINs in Brazil (BR-PRE - 92 and BR-POS - 153; total 245 sequences), United States (US-PRE - 268 and US-POS - 481; total 749 sequences) and European Union (EURO-PRE - 162 and EURO-POS - 284; total 446 sequences), and analyzed for the level of resistance to IINs, amino acid signature pattern and selective pressure. We identified 65 (4.51%) sequences with resistance mutations, 12 (4.9%) from Brazil, 29 (3.9%) from the United States, and 24 (5.4%) from the European Union. We identified that 90 of 288 sites contained amino acid changes in all 6 sequence groups, distributed in the three Integrase domains, N-terminal (23aa), catalytic site (44aa) and C-terminal (23aa). We found sequences with primary resistance mutations in sequences from before the introduction of IINs in the United States (B.US.2002.FJ469748.L861P) and European Union (B.CY.2007.JF683756.CY204). The most prevalent accessory mutations were E157Q and T97A and 24 sites were suggestive of positive selective pressure. Resistance at any level to first-generation RAL and EVG NIDs occurred in greater numbers than to second-generation DTG and BIC at all sites. The lower genetic barrier and more common drug interactions of this first-generation NDI are other possible reasons for such findings. A frequency of Dolutegravir resistance mutations of less than 2% was observed in all three regions studied. The low frequency of Dolutegravir resistance mutations was surprising.

Keywords: HIV – integrase – anti-HIV agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxo de Seleção e Edição das Sequências do LANL.....	29
Figura 2 – Fluxo de Alinhamento e Experimentos Realizados.....	31
Gráfico 1 – Sequências do HIV-1 subtipos B e não-B no Los alamos HIV database	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequencias do Brasil com mutações primárias e acessórias e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos INSTI.....	34
Tabela 2 – Sequencias dos Estados Unidos com mutações primárias e acessórias e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos INSTI.....	35
Tabela 3 – Sequencias da União Europeia com mutações primárias e acessórias e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos INSTI.....	37
Tabela 4 – Sítios conservados da IN em relação à sequencia HXB2 de referência	39
Tabela 5 – Sítios com mutações de resistência com alterações de Aminoácidos em relação a sequência HXB2 de referência.....	40
Tabela 6 – Códon sob pressão seletiva positiva identificados pelo SLAC nas sequências do Brasil, Estados Unidos e União Europeia.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	aminoácido
BIC	Bictegravir
BR	Brasil
CRF	Forma recombinante circulante
DNA	ácido desoxirribonucleico
DRM	Mutações de resistência as drogas
DTG	Dolutegravir
EURO	União Europeia
EVG	Elvitegravir
FDA	Food and Drug Administration
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HSH	homens que fazem sexo com homens
IN	integrase do HIV
INSTI	inibidor de integrase de fragmento de transferência
IP	inibidor de protease
ITRN	inibidor de transcriptase reversa nucleosídico
ITRNN	inibidor de transcriptase reversa não-nucleosídico
KDa	quilodáltons
PEP	Profilaxia pós-exposição
PR	protease do HIV
PrEP	Profilaxia pré-exposição
PVHIV	pessoa vivendo com HIV
RAL	Raltegravir
RNA	Ácido ribonucleico
RNase H	ribonuclease H
RT	transcriptase reversa do HIV
SLAC	Single Likelihood Ancestor Counting
SUS	Sistema único de saúde
TARV	terapia antirretroviral
UDI	Usuário de drogas injetáveis
URF	Forma recombinante única

US	Estados Unidos
VESPA	Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis
VF	falha virológica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO HIV-1 SUBTIPO B	18
2.2	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DA INTEGRASE DO HIV-1	21
2.3	INIBIDORES DE INTEGRASE	22
2.4	MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA NO GENE DA INTEGRASE	24
2.5	FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	GERAL	27
3.2	ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1	SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS	28
4.2	ALINHAMENTO E EDIÇÃO	29
4.3	STANFORD DRUG RESISTANCE DATABASE	30
4.4	VIRAL EPIDEMIOLOGY SIGNATURE PATTERN ANALYSIS – VESPA.....	31
4.5	<i>SINGLE-LIKELIHOOD ANCESTOR COUNTING</i> – SLAC	31
5	RESULTADOS	32
5.1	O HIV-1 B É SUSCEPTÍVEL AOS INSTI	32
5.2	A IN MANTÉM UMA PROPORÇÃO DE SÍTIOS CONSERVADOS.....	39

5.3	OS SÍTIOS DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS DA IN NÃO ESTÃO SOB PRESSÃO SELETIVA POSITIVA	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A – ALTERAÇÕES NOS PADRÕES DE ASSINATURAS DE AMINOÁCIDOS DOS CÓDONS DA INTEGRASE DO HIV-1 DO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO EUROPEIA	53
	APÊNDICE B – VALORES DE DN-DS DOS CÓDONS DA INTEGRASE DO HIV-1 DO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO EUROPEIA.....	64

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) ainda tem se demonstrado um desafio para a saúde pública mundial, o que se deve principalmente às características moleculares e à rápida capacidade de mutação do vírus (TAYLOR et al., 2008). O HIV conseguiu se espalhar pelos mais diversos continentes, desde a África, onde se originou, atingindo populações na Ásia, Europa, Oceania e Américas (AVERT FOUNDATION, 2020). A disseminação do HIV no Brasil tem particular importância nas Américas, por ser o país que concentra o maior número de casos da região, sendo responsável por quase 1 milhão de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) dentre os 2,1 milhões da região (BRASIL et al., 2018; UNAIDS, 2020). Em particular, o subtipo B se destaca em todas as regiões do país, seja pela sua alta prevalência (acima de 60%) ou pela capacidade de recombinação com outros subtipos (ARAUJO et al., 2010; LOPES et al., 2015; MACHADO et al., 2017). Dentre as proteínas mais importantes para a replicação do HIV está a integrase (IN), composta por 288 aminoácidos (aa) e responsável pela integração do ácido desoxirribonucleico (DNA) viral ao da célula hospedeira (MACHADO; GOMES; GUIMARÃES, 2019). Essa proteína apresenta três domínios principais de aminoácidos, o N-terminal (posição 1-49 aa), o Sítio Catalítico (50-212 aa) e o C-terminal (213-288 aa), que desempenham papéis importantes no processo de integração, estabilização molecular, interação com cofatores celulares e outras proteínas virais, tais como a transcriptase reversa (RT) e a ribonuclease H (RNase H) (CECCHERINI-SILLBERSTEIN et al., 2009). Os inibidores de integrase, também conhecidos por inibidores de integrase por fragmento de transferência (INSTI) vem sendo incluídos na terapia de primeira linha em vários países por apresentarem menos efeitos colaterais, poucas interações com outros fármacos e reduzirem rapidamente a carga viral do paciente (SEPHA et al., 2020). No entanto, estudos têm reportado o aparecimento cada vez mais frequente de mutações de resistência aos inibidores de integrase em locais como Estado Unidos e Brasil, inclusive com o aparecimento de mutações de resistência primárias, países em que o subtipo B representa uma grande parcela das infecções (CECCHINI et al., 2019; CHANG et al., 2016; DE SOUZA CAVALCANTI et al., 2015; MENZA et al., 2017). No Brasil, desde 2008, os IIN são utilizados na terapia antirretroviral (TARV), inicialmente com o uso do raltegravir (RAL) em terapias de resgate de pacientes em falha virológica (VF) para esquemas terapêuticos baseados em inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN), não nucleosídicos (ITRNN) e inibidores de protease (IP). Em 2017, o 19 dolutegravir (DTG) foi incorporado à TARV como medicamento de primeira linha para os recém diagnosticados com HIV (BRASIL et al., 2018), sendo os IIN indicados tanto

em PVHIV virgens de tratamento quanto em falha terapêutica. Dentre as mutações descritas para o gene da integrase, as substituições T66AIK, E92Q, G118R, E138KAT, G140SAC, Y143RC, S147G, Q148HRK, N155H e R263K são classificadas como mutações primárias (ou major), responsáveis pela queda na susceptibilidade de pelo menos um dos quatro IIN, podendo gerar alto grau de resistência e falha virológica (STANFORD UNIVERSITY, 2019a). O monitoramento dos perfis de resistência aos IIN tem sido apontado como necessário em países onde a TARV vem se tornando mais acessível no sentido de fornecer informações sobre o perfil clínico, mutacional e acompanhar as tendências de falha virológica nessas PVHIV (CECCHINI et al., 2019). Portanto, neste estudo, nós avaliamos as alterações polimórficas, evolução molecular e perfil de resistência antirretroviral em sequências do subtipo B do HIV-1 do Brasil. Estados Unidos e União Europeia, a fim de verificar o padrão evolutivo destas sequências antes e após a introdução dos IIN em seus respectivos países.

2 REVISÃO DE LITERATURA

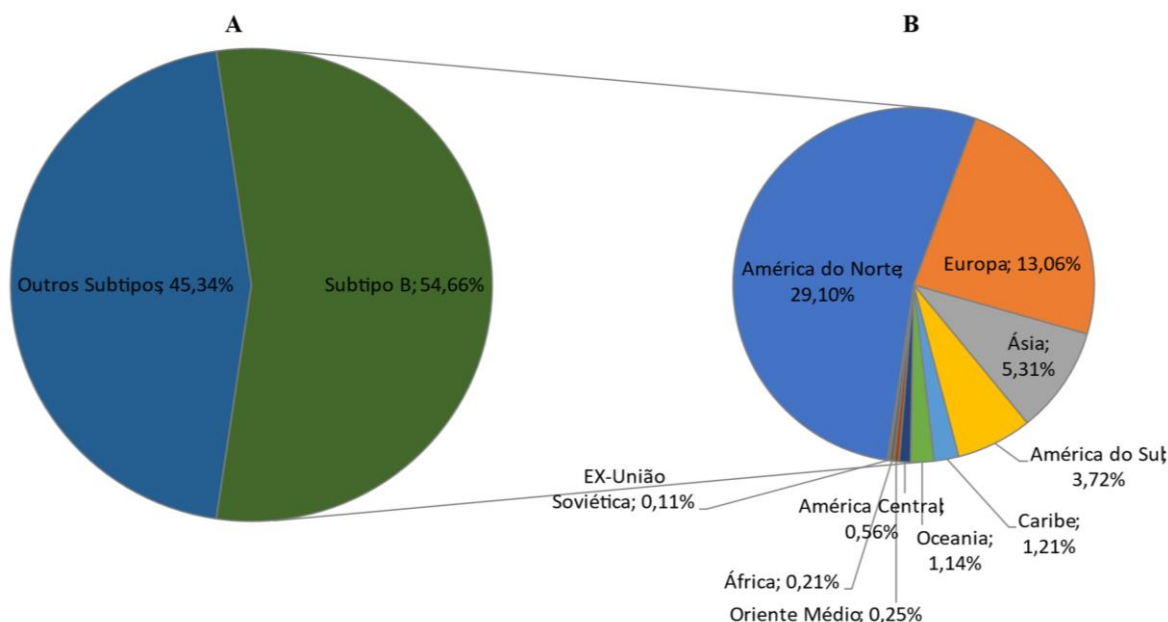
2.1 EPIDEMIOLOGIA DO HIV-1 SUBTIPO B

A infecção pelo HIV ainda tem se demonstrado um desafio para a saúde em todo o mundo, o que se deve principalmente às suas características moleculares (TAYLOR et al., 2008). Essa infecção conseguiu se disseminar pelas mais diversas regiões do globo, desde a África, em meados de 1920, e atinge hoje mais de 37.9 milhões de pessoas na chegando à Ásia, Europa, Oceania e Américas, e neste último afeta mais de 1,8 milhões de pessoas (AVERT FOUNDATION, 2020).

O HIV é classificado em dois tipos principais, HIV-1 e HIV-2, que diferem em aproximadamente 55% do seu genoma (BELOUKAS et al., 2016). O tipo 1 é o mais prevalente e representa em torno de 95% de todas as infecções no mundo e tendo progressão mais rápida, sendo dividido em 4 grandes grupos, o grupo M (ou Major), o grupo O (Outlier), o grupo N (não pertencente a nenhum dos outros dois grupos anteriormente descritos, ou Não-M/Não-O) (RIEDEL; RIBAS, 2015; YAMAGUCHI et al., 2019). O grupo M é o mais epidêmico, causando mais de 90% das infecções, distribuídas em 9 subtipos, sendo eles A, B, C, D, F, G, H, J e K, além de mais de 100 formas recombinantes circulantes (CRF) e várias formas recombinantes únicas (URF) distribuídas globalmente (AVERT FOUNDATION, 2019; YAMAGUCHI et al., 2019).

O subtipo B tem sido o foco da maior parte dos estudos por dois fatores principais: foi o primeiro subtipo isolado no mundo e por estar presente em vários continentes distintos com o maior percentual de sequências depositadas nos bancos de dados públicos (Gráfico 1) que abrangem diferentes regiões, tais como, Europa (76,5%), Oceania (82,5%), América do Norte (97,7%) e América do Sul (68,4%). Inicialmente, o subtipo B se originou no Centro-Oeste da África, na região de Camarões, e acabou chegando ao Haiti e República Dominicana por viajantes que retornaram após a independência do país Africano e de lá chegou aos Estados Unidos, onde passou a se disseminar na população do país norte americano silenciosamente, primeiro em homossexuais masculinos e homens que fazem sexo com homens (HSH) e posteriormente em usuários de drogas injetáveis (UDI) e heterossexuais, e a partir de então, se espalhou para outras regiões do globo constituindo o clado conhecido como variante B pandêmico chegando à Europa, Oceania e América Latina (JUNQUEIRA; DE MATOS ALMEIDA, 2016; LANL, 2015).

Gráfico 1 – Sequências do HIV-1 subtipos B e não-B no Los alamos HIV database



Fonte: <https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp> (acessado em: 02 janeiro de 2021).

Legenda: **A)** Distribuição percentual das sequências do Subtipo B e Não-B (Outros Subtipos) no Los Alamos HIV database. **B)** Origem percentual por região geográfica das sequências do subtipo B do Los Alamos HIV database.

A Europa Central e Ocidental, desde a introdução do clado B em meados dos anos 1980, tem sido majoritariamente atingida por esse subtipo, que se mantém como o mais prevalente sobre outros subtipos e recombinantes ao longo do tempo (BELOUKAS et al., 2016). Ao chegar lá, o subtipo B conseguiu se disseminar na parte central e ocidental do continente a maior parte dos países chegando a 70,2% dos novos diagnósticos no continente e atingindo mais de 80% em países como Alemanha, Espanha, Polônia e República Checa (BELOUKAS et al., 2016). No entanto, em países como Portugal, o subtipo B não atingiu uma prevalência alta, porém, se recombinau com o subtipo G que é o mais prevalente (30%) trazido pelo intercâmbio entre a metrópole e as colônias portuguesas na África, originando a CRF14_BG se espalhando para a Espanha pelas fronteiras entre os dois países (NIKOLOPOULOS; KOSTAKI; PARASKEVIS, 2016).

A chegada do HIV-1 B na América Latina se deu em duas rotas principais, a primeira foi a partir do Caribe pela introdução do subtipo por viajantes oriundos do Haiti e República Dominicana, disseminando na região o clado B não-pandêmico, porém, este representa apenas uma pequena fração das infecções deste subtipo na região que foi atingida posteriormente pela introdução do clado B pandêmico, importado dos Estados Unidos, que tornou a variante mais

prevalente na maior parte dos países (cerca de 70%) (JUNQUEIRA; DE MATOS ALMEIDA, 2016).

No Brasil, a introdução do vírus começa na década de 1980 onde ele teria entrado pela Região Sudeste, primeiramente pelos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, e se expandido pela região, e só depois seguido para outros grandes centros metropolitanos do país, atingindo, inicialmente, uma maioria de HSH e hemotransfundidos (hemofílicos), mas com o decorrer dos anos, foi se espalhando para outras subpopulações no país, atingindo heterossexuais, população feminina e com crescente interiorização da epidemia (DIVINO, 2017). O subtipo de maior prevalência é o B, e esse dado tem particular importância pela dimensão numérica de infecções que o país representa na América do Sul com mais de 900mil PVHIV (ARRUDA et al., 2018).

Em quase todas as regiões do Brasil o subtipo B é o dominante, a exceção da Região Sul do país onde ele divide espaço com o subtipo C e recombinantes entre os dois subtipos (PASSAES et al., 2009). Nas outras regiões, onde o subtipo B é o mais prevalente, os subtipos C e F também estão presentes, mas em uma proporção menor, assim como os recombinantes BC e BF mostrando a capacidade do subtipo B de se recombinar com facilidade, inclusive com recombinantes descritos nos genes da integrase (IAMARINO et al., 2012a).

Essa capacidade de recombinação do subtipo B pode ajudar a explicar a facilidade em que o subtipo teve se espalhar e se adaptar as mais diversas regiões do país. Machado et al. (2017b) estudaram as variações do HIV-1 na região norte do Brasil, Estado do Pará, em grávidas e encontraram uma prevalência do subtipo B entre 90% e 97,1% (RT e PR, respectivamente), encontrando também os subtipos C e F na região, porém com prevalências menores (RT: 3,3% e 6,7%; PR: 2,9% e 0%, para cada respectivo subtipo). Na região Sudeste, Iamarino et al. (2012a), examinando genomas da IN encontraram prevalências semelhantes para o subtipo B (81,52%). Percentuais semelhantes foram descritos em outros estudos em São Paulo, tanto para pacientes virgens de IIN (85%), como em pacientes em VF com terapia de resgate com IIN (88%), porém, no espaço entre os dois estudos foram observadas mutações de resistência no gene da integrase nos pacientes que faziam uso de IIN (MANTOVANI et al., 2012a; DE SOUZA CAVALCANTI et al., 2014a).

Em um estudo multicêntrico realizados em 4 hemocentros de duas regiões (Sudeste e Nordeste) do Brasil em doadores de sangue, Alencar et al. (2013) encontraram uma frequência de 76% do subtipo B nas amostras obtidas no geral, porém, se apresentou com um percentual

um pouco menor na região Nordeste (Recife, 73%) que nos estados da região Sudeste (São Paulo, 80%; Rio de Janeiro, 76%; Minas Gerais, 78%). Na Região Sul, estudos de Soares et al. (2003) demonstraram uma prevalência de 45% do subtipo B puro em pacientes acompanhados no Hospital das Clínicas de Porto Alegre, percentual que não depois também foi encontrado por Barral et al. (2017) através de estudos em pacientes em falha, porém, no estudo mais recente, dos 16% de sequências recombinantes encontradas, todas continham fragmentos do subtipo B (BF1, BC e BCF1).

Essa grande capacidade de recombinação está ligada as características moleculares e ao ciclo de replicação do HIV-1, em que estudos tem demonstrado que tanto a IN quanto a RT são as principais responsáveis pelos processos de replicação, inclusive interagindo entre si em mecanismos que regulam as etapas iniciais da infecção, estabilização molecular das estruturas de replicação, controle da velocidade de transcrição reversa do ácido ribonucleico (RNA) viral, transporte do DNA viral de dupla fita para o núcleo, e outros processos de interação de ligação molecular e produção de metabólitos que interagem entre as duas enzimas (CHAKRABORTY et al., 2013)

2.2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DA INTEGRASE DO HIV-1

A Integrase do HIV é uma proteína de aproximadamente 288 aminoácidos, correspondendo as posições de nucleotídeos 4230 à 5096 da sequência de referência HXB2 do HIV-1, com peso molecular de 32 quilodaltons (KDa), tem origem da clivagem pela protease (PR) da poliproteína produzida pelo gene pol durante a maturação da partícula viral (KATZ, 1994; IAMARINO et al., 2012b). Essa enzima está presente em todos os retrovírus e desempenha importantes papéis catalíticos durante a replicação viral, além de exercer outras funções, como, estabilização molecular de estruturas, reconhecimento do DNA viral de fita dupla, carregamento para o núcleo, interação com outras proteínas virais, tal como a própria RT e catalização da reação de integrase por fragmento de transferência (CHAKRABORTY et al., 2013).

O sítio ativo da enzima é formado pelos aminoácidos das posições A228, P233, L45, K160, W235, G47, L46 e A263, associado a ele, existe um cofator metálico divalente (Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+}) e a interação é formada por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os aminoácidos da proteína que executa a reação de transferência do DNA viral (DE MELO; FERREIRA, 2012; DA SILVA et al., 2019).

Adaptado de: Hajimahdi, Z., & Zarghi, A. (2016). Progress in HIV-1 Integrase Inhibitors: A Review of their Chemical Structure Diversity. Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 15(4), 595–628.

Durante o processo de replicação do HIV, após a transcrição reversa, o DNA viral resultante é acoplado ao complexo de pré-integração (PIC) que é formado por uma série de proteínas virais e cofatores celulares que tem as funções de carrear, clivar e integrar o material genético do vírus ao DNA nuclear da célula hospedeira, a porção do PIC que realiza esse processo de integração é chamada de integrase de fragmento de transferência, que catalisa a ligação da porção 3' do DNA viral (CRAIGIE, 2012).

2.3 INIBIDORES DE INTEGRASE

A TARV tem se tornado a principal estratégia de combate ao HIV, desde a esfera de tratamento das PVHA, prevenção, com a profilaxia pré-exposição (PrEP), como estratégia emergencial na profilaxia pós-exposição (PEP), e finalmente como forma de impedir novas infecções como o tratamento como prevenção (TASP) (BAIN; NKOKE; NOUBIAP, 2017).

A evolução da TARV de primeira linha, desde os inibidores de transcriptase reversa nucleosídicos (ITRN) e inibidores de transcriptase reversa não-nucleosídicos (ITRNN), passando para os inibidores de protease (IP) e chegando aos inibidores de integrase (IIN) favoreceu o avanço e melhoria da qualidade de vida das PVHIV (SEIDL; ZANNON; TRÓCOLI, 2005). No entanto, novas mutações de resistência (DRM) vêm emergindo, limitando as estratégias terapêuticas, em especial nos pacientes que experimentaram diferentes esquemas terapêuticos (PAREDES et al., 2017a). Assim, a vigilância dos perfis de resistência do HIV tem se tornado uma questão em pauta recorrente para monitoramento das DRM, contribuindo para o planejamento de novas estratégias de prevenção e tratamento das PVHA (TANURI, 2015).

O primeiro inibidor de integrase aprovado pelo FDA foi o raltegravir (MK-0518 ou RAL) que faz parte dos inibidores de integração por fragmento de transferência (INSTI na sigla em inglês), porque se liga ao sítio ativo da enzima e impede que a reação de transferência do DNA viral, obtido por transcrição seja efetuada. A ligação do RAL é feita no sítio ativo, nas posições D64, D116 e E152, chaves para a catalização da transferência por serem um sítio de

ligação do cofator metálico divalente, que pode ser tanto o magnésio (Mg^{2+}) quanto o manganês (Mn^{2+}), e por ser uma ligação muito específica tem muito baixa interação e efeitos adversos (COCOHOBA; DONG, 2008). Em 2012, surgiu um segundo IIN para uso em PVHIV, o elvitegravir (EVG), o primeiro a ser formulado para uma dose ao dia. Isso se deve ao fato de que, diferente do RAL, ele tem metabolização pelo citocromo P450 CYP3A4/5, o que permitiu a formulação conjunta com um inibidor do CYP3A4/5 e a utilização de uma dose diária (ANSTETT et al., 2017).

Os medicamentos anteriores são conhecidos como inibidores de integrase de primeira geração, por terem uma barreira genética um pouco inferior aos de segunda geração, dentre eles, o dolutegravir (DTG), aprovado desde 2012 pelo FDA. Ele tem muito menos interações que os IINs de primeira geração por ter alta afinidade pelo sítio ativo da integrase, o que faz com que a sua liberação seja progressiva, não necessitando de inibidor de metabolismo do CYP3A4/5, onde também é metabolizado, e ainda podendo ser utilizado em dose única (CAHN et al., 2013). Assim como o DTG, em 2017 foi aprovado pelo FDA um segundo IIN de segunda geração, o Bictegravir. Com uma barreira genética superior, maior efeito em cepas resistentes, formulação de uma dose ao dia, tempo de ação superior como as vantagens do BIC em relação aos IINs anteriores (MARKHAM, 2018).

No Brasil, desde 2009, o raltegravir (RAL), o primeiro IIN aprovado no país, vem sendo utilizado como terapia de resgate no Sistema Único de Saúde (SUS) (DE SOUZA CAVALCANTI et al., 2014a), porém, em 2017, o SUS disponibilizou o uso de IIN para terapia de primeira linha (recém diagnosticados) no tratamento de PVHIV, o dolutegravir (BATISTA et al., 2019). Existem ainda mais dois IINs aprovados pela FDA nos Estados Unidos, mas que ainda não estão disponíveis no Brasil que são o elvitegravir (EVG) e o bictegravir (BIC) (COCOHOBA; DONG, 2008; BALLANTYNE; PERRY, 2013; TSIANG et al., 2016; UNGER et al., 2016).

Novas terapias vêm sendo desenvolvidas nos últimos anos com os INSTIs. Abordagens farmacológicas diferentes, como o comprimido único vem ganhando espaço desde a introdução do BIC e mais recentemente com a aprovação do cabotegravir (CAB) (MARKHAM, 2020). Dentre as essas abordagens estão as terapias de longa duração (LAT) de CAB mais rilpivirina (RPV) com resultados que indicam a manutenção da supressão viral com injeções mensais

reportado pelo estudo de fase III ATLAS (Antiretroviral Therapy Long Acting Suppression) (SWINDELLS et al., 2020).

Os inibidores de integrase têm se tornado as drogas de escolha para primeira linha da TARV por características que os tornam superiores as classes de ITRN, ITRNN e IP, como a potência farmacológica, pois pequenas doses já são suficientes para atingir a supressão virológica, alta barreira genética, o que dificulta com que uma terapia implementada deixe de ter o efeito desejado, baixa toxicidade (não afeta reações sistêmicas como os ITRN, ITRNN e IP), poucas interações farmacológicas (podem ser usados em pessoas que tem outras condições de saúde) e rápida supressão virológica, o que contribuiu para que estes medicamentos se tornassem essenciais, tanto no tratamento contínuo, quanto em terapias de resgate (RHEE et al., 2019).

2.4 MUTAÇÕES DE RESISTÊNCIA NO GENE DA INTEGRASE

Mutações no gene da integrase se classificam em mutações primárias (Major DRM), que são aquelas que se estabelecem em sítios conservados da proteína, levam a alta redução da susceptibilidade dos antirretrovirais, podendo causar a falha virológica da TARV. Em contraponto, mutações secundárias (Minor DRM), ou são raras, aparecendo apenas após uma VF, ou quando naturalmente presentes, tem baixíssimo efeito sobre a susceptibilidade do IIN sem a presença de uma mutação primária, mas, quando em conjunto elas contribuem como mecanismo compensatório para aumentar a taxa de replicação viral, por isso, também são chamadas de mutações acessórias (STANFORD UNIVERSITY, 2016).

Juntamente com o uso em maior escala dos IINs, estudos vêm demonstrando o aparecimento de DRMs relacionadas a essa classe de ARVs (GARRIDO; DE MENDOZA; SORIANO, 2008; WINTERS et al., 2012; DE SOUZA CAVALCANTI et al., 2014b; RHEE et al., 2019). Existem 25 códons com DRMs conhecidas para a integrase do HIV-1 que se subdividem em mutações primárias (Major DRM) e mutações acessórias (Minor DRM) catalogadas pelo Stanford University HIV Database (HIVdb) (STANFORD UNIVERSITY, 2019b).

As Major DRMs e Minor DRMs podem afetar de formas distintas os diferentes IINs, causando desde uma queda acentuada na susceptibilidade em alguns e em outros não apresentar efeito algum (PAREDES et al., 2017b). Dentre essas, ainda existem aquelas que causam

redução de susceptibilidade em todos os IINs, tais como as alterações nos códons T66, E92, G118, E130, G140, Q148, N155 e R263 (STANFORD UNIVERSITY, 2019a). As MajorDRMs mais prevalentes (Y143R, Q148H/R e N155H) estão associadas a um conjunto característico de mutações secundárias que favorecem seus mecanismos de replicação (QUASHIE; MESPLÈDE; WAINBERG, 2013). Além desses, diversas outras MinorDRMs tem sido reportadas na literatura tais como G118R, T125A/V/M/Q, E138K, V151I, S153Y/F, M154I/L, K156N/R, E157Q, V165I, V201I, I203M, T206S, S230N/G, R263K, H51Y, T66A/I, V72I, L74I/M, E92Q e T97A, demonstrando a alta variabilidade da IN, tanto em paciente naïve quanto naqueles expostos a IINs previamente (MANTOVANI et al., 2012b; RHEE et al., 2019).

Dentre as drogas mais afetadas estão os IINs de primeira geração (RAL e EVG), os quais sofrem maior redução de susceptibilidade, ou até a perda completa da sua ação frente as mutações nos códons T66, E92, G140, Q148 e N155 (STANFORD UNIVERSITY, 2019a). A mutação no códon Q148 é a que mais afeta os IINs mais recentes, como o DTG e BIC, causando uma queda acentuada na resposta ao tratamento e quando em conjunto com outras MinorDRMs pode acarretar VF em todos os ARVs da classe (H51Y + E92Q + G140S + Q148K + N155H + G163R) (STANFORD UNIVERSITY, 2019c)

2.5 FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS

Pra investigar essas mutações, uma série de ferramentas tem sido desenvolvidas ao longo dos anos, uma delas é o HIValg (STANFORD UNIVERSITY, 2021) que é capaz de identificar por mapeamento de leitura curta alterações do genoma do HIV. Dessa forma ele é capaz de unificar uma base de dados de mutações de resistência, calcular scores de susceptibilidade para os ARVs e reunir informações sobre mutações de resistência para interpretação dos resultados das análises feitas pelo algoritmo auxiliem na tomada de decisão (STANFORD UNIVERSITY, 2019b, 2019c, 2019d).

Além das mutações de resistência, outro aspecto importante para auxiliar a entender a dinâmica de mutações nas sequências do HIV é sua análise de aminoácidos e nucleotídeos, comparando com sequências de referência e verificando as tendências de alterações ao longo do tempo. Nesse sentido, ferramentas como o Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis (VESPA) tem se tornado úteis, ainda mais para grandes bancos de dados e com sequências longas (KORBER; MYERS, 1992).

Outra ferramenta importante é o Single likelihood ancestor counting (SLAC). O SLAC é capaz de detectar seleção positiva em sequências de DNA baseado na comparação de espécies diferentes para determinar se as mudanças observadas em uma determinada posição são consistentes com a seleção positiva. Ao utilizar a abordagem probabilística de máxima verossimilhança, o método calcula a probabilidade de que uma mudança em uma posição específica ocorra devido à seleção positiva ou à deriva genética neutra. Ele usa o modelo de códon para avaliar a probabilidade de cada possível mudança em uma sequência de DNA ou proteína e, em seguida, compara essas probabilidades para determinar se a mudança foi mais provável devido à seleção positiva. Uma das principais vantagens é sua capacidade de analisar grandes conjuntos de dados e identificar locais específicos em uma sequência onde a seleção positiva ocorreu, o que pode fornecer informações valiosas sobre a função biológica de uma região (KOSAKOVSKY POND; FROST, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Determinar o grau de susceptibilidade aos inibidores de integrase e o perfil evolutivo das sequências do subtipo B do HIV-1 presentes no banco de dados público Los Alamos HIV database, selecionadas do Brasil, Estados Unidos e União Europeia, antes e após a introdução dos Inibidores de Integrase (IIN) na terapia antirretroviral (TARV).

3.2 ESPECÍFICOS

- I. Identificar os perfis de susceptibilidade aos inibidores de integrase do Brasil, Estados Unidos e União Europeia;
- II. Determinar os polimorfismos mais prevalentes nas sequências do HIV-1 subtipo B presentes nas sequências do Brasil, Estados Unidos e União Europeia selecionadas;
- III. Avaliar a pressão seletiva antes e depois da introdução dos IIN nas sequências do subtipo B e determinar como essa pressão tem afetado as mutações de resistência nessa classe de drogas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE SEQUÊNCIAS

As sequências utilizadas neste estudo foram obtidas do Los Alamos HIV Database (<https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/search/search.html>). Os critérios de busca foram ajustados para filtrar as sequências de interesse da seguinte forma: “Virus: HIV-1”; “Subtype: B” e “Genomic region: p31 (integrase)”. Esses critérios foram combinados com os critérios geográficos e regionais para recuperar do banco de dados apenas as sequências de interesse de cada país e região.

A variável “Sampling country” correspondente ao país de acordo com o padrão internacional “ISO 3166 Country names”, foi utilizada para identificar a origem das sequências indexadas BR e US (para Brasil e Estados Unidos, respectivamente) (ISO, 2013; LANL, 2013). Para recuperar as sequências da União Europeia (EURO) foi utilizada a variável “Geographical Information”, nela foi definido o filtro “Geographic region: Europe” como parâmetro de busca. Posteriormente, no grupo de sequências da Europa, foram excluídas as sequências dos países que não faziam parte da União Europeia no período de interesse, visto que a plataforma não faz essa diferenciação.

Em seguida, foi feita filtragem de duplicatas de pacientes através de uma funcionalidade da plataforma do Los Alamos na opção “One sequence/patient”. No momento do download foi definido o método de nomeação das sequências através da opção “compose a label” que seguiu os seguintes parâmetros: 1) Subtipo; 2) País de origem; 3) Ano da amostra; 4) Número de acesso (accession) e 5) Nome da sequência. Foi definido conjuntamente o separador de parâmetros de nomeação (“.”) e o caractere de dado não disponível (“-”). A sequência de referência do HIV-1 subtipo B (HXB2) foi recuperada e nomeada da mesma forma que as anteriores, porém, acrescida posteriormente do caractere de diferenciação “Ref.” para facilitar a sua identificação nos alinhamentos. Após aplicar todos os critérios de seleção o Los Alamos retornou total de 3873 sequências, sendo 331 do Brasil, 2778 dos Estados Unidos e 764 da União Europeia.

As sequências baixadas foram salvas em arquivos “.fasta” de forma a facilitar as análises posteriores. Ao analisá-las encontramos que algumas delas não possuíam estavam identificadas com o ano, variável essencial neste estudo, e utilizando o BioEdit foi feita a exclusão destas sequências, resultando na exclusão de 1422 sequências dos três arquivos.

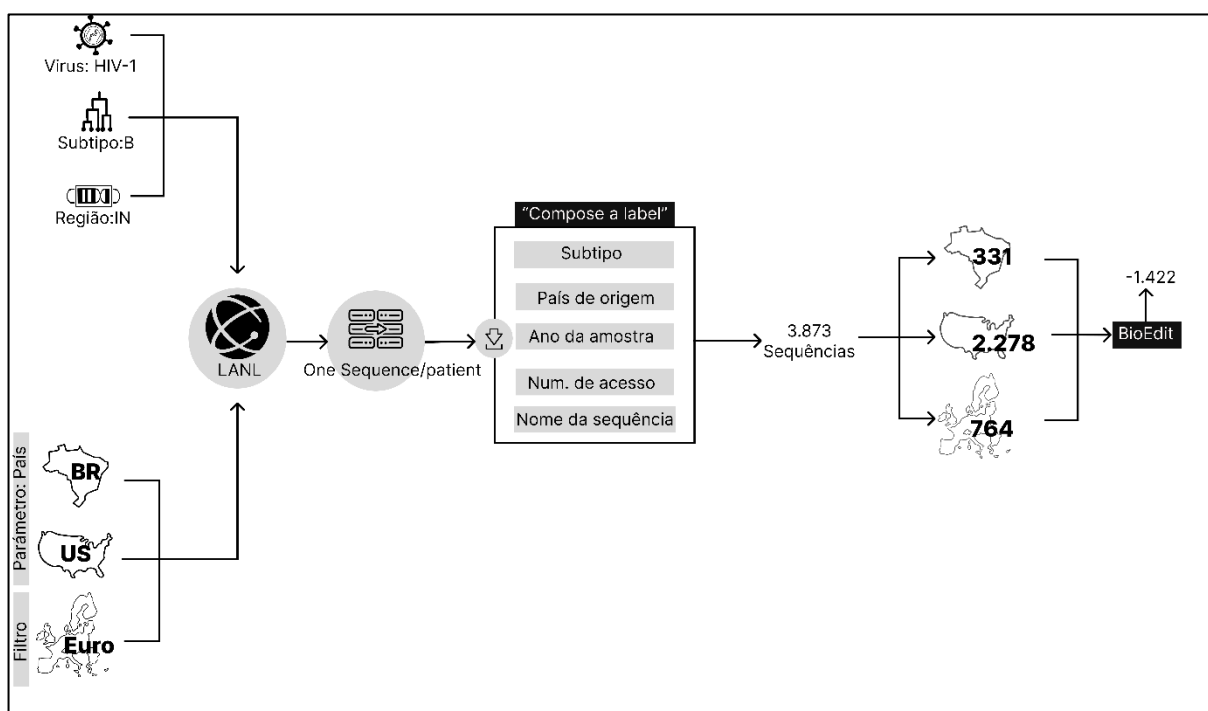
4.2 ALINHAMENTO E EDIÇÃO

Na etapa de alinhamento, foi inserida uma cópia da sequência de referência do HIV “Ref.B.FR.83.K03455.HXB2_LAI_IIIB_BRU” e o conjunto foi submetido ao MAFFT versão 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Os parâmetros de alinhamento foram:

- I. UPPERCASE/lowercase: Amino acid → UPPERCASE / Nucleotide → lowercase;
- II. Direction of nucleotide sequences: Same as input;
- III. Output order: Aligned.

Ao concluir o alinhamento, os arquivos foram novamente inspecionados para identificar as sequências geradoras de GAPs, com códons divergentes e códons de parada que poderiam interferir na acurácia das análises gerando viés, eliminando assim mais 1011 sequências. Ao final das etapas preparatórias foram selecionadas para análise 1440 sequências, sendo 245 do Brasil, 749 dos Estados Unidos e 446 de países da União Europeia. Após o alinhamento inicial do MAFFT, os arquivos foram inspecionados novamente através do software AliView versão 1.27 (LARSSON, 2014) e realizada mais uma busca por duplicatas, e em seguida, nova submissão ao MAFFT, sob os mesmos parâmetros, para confirmar o alinhamento (Figura 1).

Figura 1 – Fluxo de Seleção e Edição das Sequências do LANL



Legenda: IN: Integrase do HIV-1; BR: Brasil; US: Estados Unidos; EURO: União Europeia; LANL: Los Alamos National Laboratory. **Créditos:** Imagem por Cristyell Aranda (2023).

Nesta etapa também foi feita a separação das sequências em país/região, sendo Brasil, Estados Unidos e União Europeia, e por período Pré e Pós introdução dos IINs respectivo de para cada país/região. O resultado foram seis (6) arquivos representando as sequências pré e pós IINs do Brasil (BR-PRE e BR-POS), Estados Unidos (US-PRE e US-POS) e da União Europeia (EURO-PRE e EURO-POS), respectivamente.

4.3 STANFORD DRUG RESISTANCE DATABASE

Para avaliar o perfil de susceptibilidade aos IINs as sequências foram submetidas ao HIValg do HIV Drug resistance database (HIVdb) – Stanford University (<https://hivdb.stanford.edu/hivalg/by-sequences/>) a fim de identificar a presença de mutações de resistência e computar os escores de susceptibilidade, empregando a lista padronizada de “Surveillance Drug Resistance Mutations” (SDRM) estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BENNETT et al., 2008). O sistema de HIValg utilizado calcula os scores de susceptibilidade baseados em três algoritmos combinados, o HIVdb 9.0 mantido pela “Stanford University” dos Estados Unidos, o ANRS 30 (ARNS, 2020) da “Agence National de Recherches sur le Sida” da França e o Rega 10.0 do “Rega Institute for Medical Research” da Bélgica (VERCAUTEREN et al., 2013).

O sistema classifica as mutações de resistência em quatro (4) tipos diferentes: primárias (ou Major), acessórias polimórficas (ou Minor-polymorphic), acessórias não-polimórficas (ou Non-polymorphic) e mutações raras (Rare) (STANFORD UNIVERSITY, 2016) (Tabela 1), e calcula scores para os quatro (4) IINs (BIC, DTG, EVG e RAL) aprovados para uso nos Estados Unidos e União Europeia, classificando a sequência com base no seu perfil de susceptibilidade em:

- I. Susceptível (Susceptible), com scores entre 0 e 9 pontos;
- II. Potencial baixo (Potential-low), com scores entre 10 e 14;
- III. Baixo (Low), com scores entre 15 e 29;
- IV. Intermediário (Intermediate), com scores entre 30 e 59;
- V. Alta (High) com scores acima de 60 pontos.

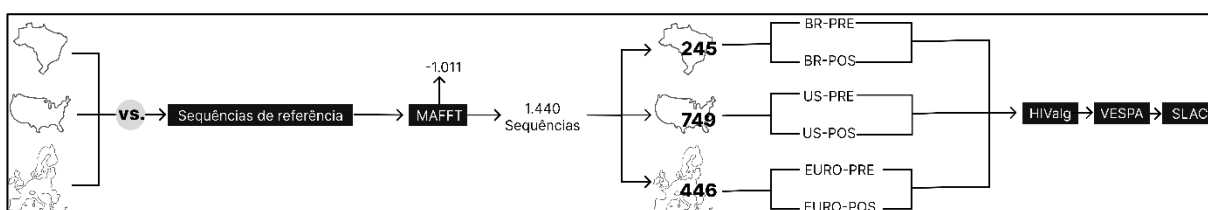
4.4 VIRAL EPIDEMIOLOGY SIGNATURE PATTERN ANALYSIS – VESPA

Em seguida, avaliamos as divergências entre os padrões de assinaturas de aminoácidos nos conjuntos de sequências através do Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis – VESPA (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/VESPA/vespa.html>) para avaliar a ocorrência de polimorfismos nas regiões NTD, CCD e CTD, além dos sítio de ligação com o cofator celular LEDGF/p7. A sequência Ref.B.FR.83.K03455.HXB2_LAI_IIIB_BRU foi definida como sequência de fundo (background), enquanto que cada um dos conjuntos PRE e POS foram submetidos como *query*, separadamente, para análise. Determinamos que a resposta do VESPA seria baseada nas cadeias de aminoácidos codificantes das sequências, facilitando a comparação entre os diferentes conjuntos.

4.5 SINGLE-LIKELIHOOD ANCESTOR COUNTING – SLAC

A pressão seletiva foi estimada utilizando o DataMonkey (WEAVER et al., 2018) com o algoritmo Single-Likelihood Ancestor Counting – SLAC (KOSAKOVSKY POND; FROST, 2005) o qual utiliza aproximações por máxima verossimilhança (*Maximum Likelihood* – ML) e métodos de inferência por contagem para calcular as taxas de mutações não-sinônimas (dN) e sinônimas (dS) em cada um dos sítios do conjunto de sequências analisados e a probabilidade ($P \left[\frac{dN}{dS} > 1 \right] > 0,05$) do seguimento estar sob pressão seletiva.

Figura 2 – Fluxo de Alinhamento e Experimentos Realizados



Legenda: MAFFT: Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences; Sequências do Brasil (BR-PRE: 1990-2008; BR-POS: 2009-2019), Estados Unidos (US-PRE: 1978-2005; US-POS: 2006-2019) e União Europeia (EURO-PRE: 1986-2007; EURO-POS: 2008-2019); HIValg: Sistema de identificação de mutações de resistência; VESPA: Viral Epidemiology Signature Pattern Analysis; SLAC: Single Likelihood Ancestor Counting. **Créditos:** Imagem por Cristyell Aranda (2023).

5 RESULTADOS

5.1 O HIV-1 B É SUSCEPTÍVEL AOS INSTI

Dentre as 1440 sequências analisadas apenas 1375 (95,5%) apresentaram perfil “Susceptível” para todos os quatro (4) INSTIs avaliados pelo HIValg. Apenas 65 (4,5%) das sequências apresentaram variação de susceptibilidade entre os perfis “Potencial-Baixo”, “Baixo”, “Intermediário” e “Alto”. Dentre as sequências com mutações de resistência identificadas pelo HIValg 12 (4,9%) eram provenientes do Brasil, 29 (3,9%) dos Estados Unidos e 24 (5,4%) da União Europeia. A quantidade de sequências com mutações de resistência aumentou em todos os locais avaliados se compararmos os recortes PRE e POS, tanto no Brasil (de 4 para 8), quanto nos Estados Unidos (de 6 para 24) e União Europeia (de 5 para 19). Identificamos que nas sequências coletadas anteriormente à introdução dos IIN na União Europeia já haviam sequências que abrigavam mutações de resistência de nível “Intermediário” para EVG e RAL.

No grupo BR-PRE, foram encontradas 4 (4,35%) sequências com mutações de resistência pelo HIValg, todas com grau de susceptibilidade “Potencial-Baixo” para EVG e RAL e “Susceptível” para BIC e DTG. Das quatro sequências, nenhuma mutação primária foi identificada, duas delas compartilhavam a mutação E157Q, e as outras duas compartilhavam a mutação T97A, ambas mutações acessórias polimórficas. Essas mesmas duas mutações estavam presentes em seis das oito sequências do grupo BR-POS, três que continham E157Q e duas com T97A todas com grau “Potencial-Baixo” de resistência para EVG e RAL, enquanto que uma outra sequência (que apresentou ambas as mutações) tinha nível “Baixo”. Nas outras duas sequências do grupo foram detectadas apenas mutações primárias, a sequência B.BR.2014.MK757410.VC06_INT59.V9 carregando a mutação N155H com nível de resistência “Alto” tanto para EVG e RAL, e “Potencial-Baixo” para BIC e DTG, e a B.BR.2011.JQ797733.BR10SP296 carregando três mutações primárias, sendo elas E138K, G140C e Q148R, com nível “Alto” de resistência a todos os IIN avaliados.

No grupo de sequências US-PRE foram encontradas seis sequências com mutações de resistência, em quatro delas a mutação E157Q, uma com a G163R, ambas acessórias e de grau “Baixo” para EVG e RAL. Uma única sequência desse grupo apresentou a mutação primária E138K, com perfil de susceptibilidade “Baixo” para EVG e RAL, e “Potencial-Baixo” para BIC e DTG. No grupo US-POS, foram detectadas 23 sequências com mutações de resistência

pelo HIValg, dez com a E157Q, duas com a T97A, todas com perfil de susceptibilidade “Susceptível” para BIC/DTG e “Potencial-baixo” para EVG/RAL; e duas com ambas mutações acessórias, modificando o perfil de resistência para “Baixo” para EVG/RAL. Dentre as outras nove sequências, duas continham a mutação S232N duas com a G163R e G163K, todas com perfil “Susceptível” para BIC/DTG e para EVG/RAL “Potencial-baixo” e “Baixo” para as alterações nas posições 232 e 163 respectivamente. As seis sequências restantes, abrigavam mutações primárias, duas delas com o conjunto de mutações G140S e Q148H e perfil de resistência “Alto” para EVG/RAL e “Intermediário” para BIC/DTG, outras duas continham a N155H, sendo uma delas em conjunto com a T97A, acessória, ambas com níveis de resistência “Alto” e “Potencial-baixo” para EVG/RAL e BIC/DTG, respectivamente. A sequência restante apresentou a mutação primária Y143C e duas acessórias, T97A e S230R, gerando um perfil de susceptibilidade “Baixo” para BIC, “Intermediário” para DTG/EVG e “Alto” para RAL.

O grupo EURO-PRE foram encontradas 5 sequências com mutações de resistência, sendo três delas com a alteração E157Q e níveis “Susceptível” para BIC/DTG e “Potencial-baixo” para EVG/RAL, uma com a G163R com níveis “Susceptível” para BIC/DTG e “Baixo” para EVG/RAL, ambas acessórias. Apenas uma sequência apresentou um conjunto de duas mutações primárias, E92D e N155S, com níveis “Susceptível” para BIC/DTG e “Intermediário” para EVG/RAL. No grupo EURO-POS, foram identificadas 19 sequências com mutações, dentre elas, 14 apenas com mutações acessórias, sete com E157Q, quatro com T97A e três com S232N, todas com níveis “Susceptível” para BIC/DTG e “Potencial-baixo” para EVG/RAL. As demais sequências apresentaram mutações primárias, uma com N155H e níveis “Potencial-baixo” (BIC/DTG) e “Alto” (EVG/RAL); uma com R263K sendo “Intermediário” (BIC/DTG/EVG) e “Alto” (RAL), uma com a combinação G140A e Q148R com perfis “Intermediário” (BIC/DTG) e “Alto” (EVG/RAL), e duas com Y143R, sendo uma delas em combinação com G163R com níveis “Baixo” (BIC/DTG), “Intermediário” (EVG) e “Alto” (RAL); e a outra sequência sem mutações adicionais e níveis “Potencial-baixo” (BIC/DTG) “Baixo” (EVG) e “Alto” (RAL)

Tabela 1 – Sequências do Brasil com mutações primárias e acessórias e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos INSTI

	Sequências	Mutações		Uso de IIN	Nível de Resistência			
		Primárias	Acessórias		BIC	DTG	EVG	RAL
PRE	B.BR.2002.DQ358809.02BR011		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2003.EF637054.BREPM1027		T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2006.JN692479.06BR1115		T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2008.GQ864181.EI032		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
POS	B.BR.2010.KJ849786.10BR_MG007		T97A, E157Q	NAIVE	S	S	B	B
	B.BR.2010.KT427702.10BR_PE083		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2010.KT427742.10BR_PE014		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2010.KT427829.10BR_SP004		T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2010.KT427854.10BR_PE111_1		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BR.2011.JQ797733.BR10SP296	E138K, G140C, Q148R		USED	A	A	A	A
	B.BR.2014.MK757410.VC06_INT59.V9	N155H		NAIVE	P-B	P-B	A	A
	B.BR.2016.MK041551.2HU-UFRJ-2016		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B

Legenda: Inibidores de Integrase (IIN): BIC – bictegravir; DTG – dolutegravir; EVG – elvitegravir; RAL – raltegravir. Níveis de resistência: S – Sensível; P-B – Potencial baixo; B – Baixo; I – Intermediário; A – Alto. NAIVE – Sem exposição aos IIN; USED – Expostos aos IIN. **Fonte:** O autor (2022).

Tabela 2 – Sequências dos Estados Unidos com mutações primárias e acessórias e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos INSTI

	Sequências	Mutações		Uso de IIN	Nível de Resistência			
		Primárias	Acessórias		BIC	DTG	EVG	RAL
PRE	B.US.1983.M17451.RF_HAT3		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.1997.KT124744.1051_11		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2002.FJ469748.L861P	E138K		NAIVE	P-B	P-B	B	B
	B.US.2002.FJ469757.PRLS08		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2004.EU547186.SAMI_WGA1		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2005.FJ469747.L827		G163R	NAIVE	S	S	B	B
POS	B.US.2007.GU076509.CA138765	G140S, Q148H		USED	I	I	A	A
	B.US.2007.GU076512.CA138768_4378		E157Q	USED	S	S	P-B	P-B
	B.US.2007.JF689886.07US_SAJ_C166_MS		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2008.GU076500.CA138761		T97A	USED	S	S	P-B	P-B
	B.US.2008.GU076504.CA138763_4736_2	N155H	T97A	USED	P-B	P-B	A	A
	B.US.2008.GU076508.CA138764_1556	Y143C	T97A, S230R	USED	B	I	I	A
	B.US.2008.JQ403069.HIV_US_BID-V3048_2008		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2010.KC473828.DEMB10US007		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2010.KC473829.DEMB10US009		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2011.KF384807.CP9-1 ^a		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.US.2012.KT124785.608647		T97A, E157Q	NAIVE	S	S	B	B

B.US.2012.MG196642.505_0012a.WG03		G163K	NAIVE	S	S	B	B
B.US.2012.MG196816.505_0772a.WG3		T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
B.US.2013.MG196963.505_1270a.WG14		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
B.US.2014.KU678049.Pt3_DNA_1	G140S, Q148H		ND	I	I	A	A
B.US.2015.KX505552.3693		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
B.US.2016.KY747405.case1.IN-2		T97A, E157Q	ND	S	S	B	B
B.US.2016.MK115138.9244_W0_10B13_S69		E157Q	ND	S	S	P-B	P-B
B.US.2016.MN467383.3632_TN_8	N155H		ND	P-B	P-B	A	A
B.US.2017.MK148086.2669.PBMC.CAD.06092017.INT-Seq65		G163R	USED	S	S	B	B
B.US.2018.MK169489.101-PB-12G22		D232N	ND	S	S	P-B	P-B
B.US.2018.MK169892.LFSA-PB-8K22		D232N	ND	S	S	P-B	P-B
B.US.2018.MN090368.9244_W12_10G7		E157Q	ND	S	S	P-B	P-B

Legenda: Inibidores de Integrase (IIN): BIC – bictegravir; DTG – dolutegravir; EVG – elvitegravir; RAL – raltegravir. Níveis de resistência: S – Sensível; P-B – Potencial baixo; B – Baixo; I – Intermediário; A – Alto. NAIVE – Sem exposição aos IIN; USED – Expostos aos IIN; ND – Sem dados sobre exposição. **Fonte:** O autor (2022).

Tabela 3 – Sequências da União Europeia com mutações primárias e acessórias e seus respectivos perfis de susceptibilidade aos INSTI

	Sequências	Mutações		USO DE IIN	Nível de Resistência			
		Primárias	Acessórias		BIC	DTG	EVG	RAL
PRE	B.ES.2006.KT200350.R14		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.BE.2007.EU882744.AR07_2127		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.CY.2007.JF683756.CY204	E92D, N155S		NAIVE	S	S	I	I
	B.EE.2007.GQ926741.R4		G163R	NAIVE	S	S	B	B
	B.ES.2007.KC238654.130		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
POS	B.FR.2008.JX425611.143_B_1_BICHQT		T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.CY.2009.JF683807.CY266		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.ES.2009.JQ716865.BAA295956	Y143R		USED	P-B	P-B	B	A
	B.ES.2009.JQ716866.BAA295958	G140A, Q148R		USED	I	I	A	A
	B.ES.2009.JQ716896.BAA295902	N155H		USED	P-B	P-B	A	A
	B.ES.2009.JQ716899.BAA295908	R263K		USED	I	I	I	B
	B.PL.2010.KC409213.916_1		E157Q	USED	S	S	P-B	P-B
	B.SE.2010.MF373151.040CA		E157Q	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.SE.2011.MF373161.058SE		T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
	B.SE.2012.KP411828.SE600057		E157Q	USED	S	S	P-B	P-B
	B.SE.2013.MF373191.089SE	Y143R	G163R	NAIVE	B	B	I	A
	B.GB.2014.MF109524.14535_1_27.3		T97A	ND	S	S	P-B	P-B
	B.GB.2014.MF109566.14592_1_72.3		D232N	ND	S	S	P-B	P-B

B.SI.2015.MN736706.Sample56_SI457	T97A	NAIVE	S	S	P-B	P-B
B.ES.2015.KY989954.100598	D232N	NAIVE	S	S	P-B	P-B
B.BE.2016.MN486010.BN	D232N	ND	S	S	P-B	P-B
B.BE.2016.MN486013.BQ	E157Q	ND	S	S	P-B	P-B
B.BE.2016.MN486038.CP	E157Q	ND	S	S	P-B	P-B
B.BE.2017.MN486024.CB	E157Q	ND	S	S	P-B	P-B

Legenda: Inibidores de Integrase (IIN): BIC – bictegravir; DTG – dolutegravir; EVG – elvitegravir; RAL – raltegravir. Níveis de resistência: S – Sensível; P-B – Potencial baixo; B – Baixo; I – Intermediário; A – Alto. NAIVE – Sem exposição aos IIN; USED – Expostos aos IIN; ND – Sem dados sobre exposição. **Fonte:** O autor (2022).

5.2 A IN MANTÉM UMA PROPORÇÃO DE SÍTIOS CONSERVADOS

Ao analisarmos os padrões de assinaturas de aminoácidos na IN identificamos que 40 (13,8%) dos 288 sítios estavam conservados em todas as sequências, sendo cinco (10,2%) na porção N-terminal, 25 (15,3%) no Sítio catalítico, e 10 (13,3%) na porção C-terminal da proteína. No sentido inverso, outras 90 (31,2%) posições abrigavam pelo menos uma alteração de aminoácido em todos os grupos, 24 (48,9%) da porção N-terminal, 43 (26,3%) do Sítio Catalítico e 23 (30,6%) da posição C-terminal (Apêndice). Investigando separadamente cada um dos recortes encontramos que a quantidade de sítios conservados foi ainda maior, sendo a porção N-Terminal a que apresentou maior percentual de sítios conservados em todos os recortes (51,9%), seguido pela C-Terminal (44,5%) e por fim, o Sítio Catalítico (37,4%). Entre os recortes de cada região as proporções se mantiveram semelhantes entre os grupos PRE e POS (Tabela 4).

Tabela 4 – Sítios conservados da IN em relação à sequência HXB2 de referência

Grupo	N-Terminal N (%)	Sítio Catalítico N (%)	C-Terminal N (%)	Total N (%)
BR-PRE	21 (42,9%)	86 (52,8%)	46 (61,3%)	153 (53,1%)
BR-POS	20 (40,8%)	81 (49,7%)	45 (60,0%)	146 (50,7%)
US-PRE	15 (30,6%)	64 (39,3%)	28 (37,3%)	107 (37,2%)
US-POS	15 (30,6%)	65 (39,9%)	28 (37,3%)	108 (37,5%)
EURO-PRE	17 (34,7%)	75 (46,0%)	39 (52,0%)	131 (45,5%)
EURO-POS	18 (36,7%)	72 (44,2%)	35 (46,7%)	125 (43,4%)

Legenda: N: número de sítios conservados; %: percentual em relação ao total de sítios do domínio N-Terminal (49), Sítio Catalítico (163), C-Terminal (76) e Toda a cadeia (Total: 288) da Integrase. **Fonte:** O autor (2022).

Ao analisarmos os sítios de mutações primárias (T66, E92, G118, E138, G140, Y143, S147, Q148, N155 e R263) verificamos algumas diferenças nos padrões de assinaturas entre os grupos PRE e POS. O grupo BR-PRE apresentou dois sítios com as mutações T66V e E138D, com uma ocorrência cada. No grupo BR-POS as alterações atingiram as posições E138D com quatro (4) ocorrências, E138K, N155H, G140C e Q148R com uma ocorrência cada. No grupo US-PRE encontramos as alterações T66P, E138K e Q148P, com uma ocorrência cada, e no grupo US-POS identificamos cinco alterações, sendo uma E138D e uma Y143C; duas de G140S, Q148H e N155H. Ademais, a alteração E138K no grupo US-PRE e Y143C, G140S, Q148H e N155H no grupo US-POS. No grupo EURO-PRE identificamos uma ocorrência cada

das mutações E92D, G118S e N155H. No grupo EURO-POS verificamos sete posições distribuídas em uma ocorrência cada para E92D, G140A, Q148R, N155H e R263K; duas para a mutação Y143R e cinco para E138D; onde apenas E92D e E138D não eram primárias (Tabela 5).

Tabela 5 – Sítios com mutações de resistência com alterações de Aminoácidos em relação a sequência HXB2 de referência

AA HXB2	BR-PRE	BR-POS	US-PRE	US-POS	EURO- PRE	EURO- POS
T66	1 V	-	1 P	-	-	-
E92	-	-	-	-	1 D	1 D
G118	-	-	-	-	1 S	-
E138	1 D	4 D, 1 K	1 K	1 D	-	5 D
G140	-	1 C	-	2 S	-	1 A
Y143	-	-	-	1 C	-	2 R
S147	-	-	-	-	-	-
Q148	-	1 R	1 P	2 H	-	1 R
N155	-	1 H	-	2 H	1 S	1 H
R263	-	-	-	-	-	1 K

Legenda: Alterações de aminoácidos nos sítios de mutações nas sequências do Brasil (BR-PRE: 1990-2008; BR-POS: 2009-2019), Estados Unidos (US-PRE: 1978-2005; US-POS: 2006-2019) e União Europeia (EURO-PRE: 1986-2007; EURO-POS: 2008-2019). **Fonte:** O autor (2022).

Foram identificadas alterações em alguns pontos incomuns da IN do HIV, tais como os códons nas posições DDE do Sítio Ativo, que foram encontradas alterações nas três posições, em destaque para a mutação E152K que estava presente em 4 das sequências analisadas, além das mutações D64N em duas sequências, D64H e D116G uma cada. Foi também identificada uma (1) substituição completa de aminoácidos (swift) em relação a sequência de referência em todas as sequências analisadas com a mutação G123CS, onde a variante G123S se fixou como a mais prevalente.

5.3 OS SÍTIOS DE MUTAÇÕES PRIMÁRIAS DA IN NÃO ESTÃO SOB PRESSÃO SELETIVA POSITIVA

Ao testar a evidência de pressão seletiva positiva utilizando o DataMonkey pelo algoritmo do SLAC, definida por $P[dN/dS > 1] > 0,05$, as sequências apresentaram ao todo 24 sítios com evidência de pressão positiva, distribuídos pelos seis grupos analisados. Observamos que três códons, V72, V201 e T206, apareceram todos os grupos, enquanto que outros códons foram característicos de alguns grupos. Apenas quatro das 24 posições sob

pressão positiva não estavam presentes entre as mais polimórficas (91, 188, 195 e 284), enquanto que apenas duas (151 e 230) eram sítios de mutações de resistências acessórias. Nenhum sítio de mutação primária foi identificado com pressão seletiva positiva (Apêndice).

No tocante as sequências BR-PRE, além dos três códons V72, V201 e T206, elas continham evidência de pressão positiva nos sítios V151, sítios de mutação acessória, e T218. Todos eles sítios mostraram evidência de pressão positiva também no grupo BR-POS juntamente com mais seis sítios, T122, A124, I220, S230, A265 e S283; podemos destacar aqui o códon 230 por ser sítio de mutações acessórias não-polimórficas e o códon 122 característico desse grupo. Foram encontrados 11 códons com evidência de pressão seletiva positiva no grupo US-PRE, e 14 no grupo US-POS, ambos compartilharam os códons V72, T112, V201, T206, K211, T218 e S230, enquanto que os códons S119, A124, A265 e R284 estavam presentes apenas no grupo PRE; e os códons S24, K188, S195, Y227, L234, D279 e S283 apenas no grupo POS, em destaque as posições 188 e 195, características do grupo. Enquanto isso, o grupo EURO-PRE apresentou 10 códons sob pressão positiva, e o grupo EURO-POS 15 códons. Os códons V72, T112, V201, T206, S230, A265 e S283 apareceram em ambos, os códons V32, A124 e L234 apenas no grupo PRE; e os códons S24, A91, A119, T218, I220, D279, R284 e D286, apenas no POS. Destacamos as posições características 32 para EURO-PRE e 91, 286 para EURO-POS (Tabela 6).

Quando analisada a pressão seletiva negativa foram encontrados 107 (37,2%) códons no grupo BR-PRE e 153 (53,1%) no grupo BR-POS. Notou-se que a maior parte dos códons no grupo BR-PRE (176 - 61,1%) não exibiu evidência de pressão seletiva positiva ou negativa, o inverso do que ocorreu no grupo BR-POS (124 – 43,1%). Entre as sequências dos Estados Unidos sob pressão seletiva negativa foram encontrados 164 (56,9%) no grupo US-PRE e 189 (65,6%) no US-POS e mais 113 (39,2%) e 85 (29,5%), respectivamente, que demonstraram seguir o modelo de evolução neutra. Nas sequências da União Europeia, a quantidade de códons sob pressão negativa sem e indicativo de pressão seletiva, respectivas aos dois grupos, foram 147 (51%) e 131 (45,5%) no grupo EURO-PRE e 185 (64,2%) e 88 (30,6%) no grupo EURO-POS.

Tabela 6 – Códonos sob pressão seletiva positiva identificados pelo SLAC nas sequências do Brasil, Estados Unidos e União Europeia

Códon	BR-PRE	p-valor	BR-POS	p-valor	US-PRE	p-valor	US-POS	p-valor	EURO-PRE	p-valor	EURO-POS	p-valor
S24	1,359	0,127	-0,415	0,786	0,957	0,139	1,311	0,021	1,654	0,066	1,665	0,003
V32	0,450	0,477	-0,913	0,937	-0,471	0,925	0,171	0,434	1,370	0,021	0,572	0,176
V72	5,098	0,000	3,944	0,000	3,109	0,001	1,769	0,011	3,581	0,003	2,210	0,002
A91	-0,867	1,000	0,000	0,650	-0,373	0,878	-0,254	0,851	0,280	0,460	0,637	0,039
T112	0,802	0,348	0,429	0,394	2,099	0,010	2,027	0,003	2,264	0,018	2,112	0,003
S119	3,179	0,098	2,337	0,070	2,336	0,031	-0,293	0,680	0,303	0,495	2,281	0,013
T122	0,191	0,556	1,771	0,029	-0,974	0,897	0,536	0,267	0,674	0,330	-0,251	0,682
A124	0,592	0,456	3,838	0,006	4,039	0,001	0,289	0,429	3,438	0,019	1,049	0,169
V151	2,213	0,046	1,586	0,016	-1,237	0,996	-0,390	0,916	-1,716	0,992	-1,096	0,998
K188	0,400	0,557	0,879	0,100	0,520	0,167	0,643	0,041	0,000	1,000	0,118	0,564
S195	0,000	1,000	0,318	0,422	0,006	0,730	0,571	0,050	0,012	0,728	0,285	0,230
V201	4,004	0,008	4,432	0,000	3,957	0,000	2,880	0,000	4,171	0,000	3,053	0,000
T206	2,866	0,005	2,102	0,006	2,266	0,000	2,273	0,000	2,852	0,000	2,343	0,000
K211	1,237	0,225	1,109	0,132	2,004	0,001	1,716	0,001	-0,215	0,725	0,663	0,168
T218	2,577	0,009	2,240	0,001	1,763	0,001	2,196	0,000	1,096	0,083	1,761	0,000
I220	0,572	0,405	1,572	0,017	0,283	0,412	0,156	0,460	0,175	0,542	0,874	0,046
Y227	0,646	0,421	0,950	0,100	0,836	0,068	0,757	0,027	1,244	0,072	0,572	0,070
S230	1,118	0,218	1,434	0,029	1,298	0,014	1,544	0,001	1,811	0,020	1,767	0,000
L234	1,307	0,179	-0,564	0,844	0,744	0,170	0,952	0,027	1,948	0,010	0,841	0,083
A265	1,084	0,132	1,312	0,044	1,865	0,004	0,886	0,072	1,396	0,039	0,956	0,020
D279	0,388	0,554	0,318	0,422	0,334	0,308	0,856	0,011	0,125	0,744	0,627	0,040
S283	0,979	0,219	1,818	0,007	0,764	0,115	0,913	0,008	2,266	0,004	1,202	0,002
R284	0,651	0,325	0,597	0,157	0,933	0,024	0,429	0,134	0,000	1,000	0,638	0,025
D286	0,582	0,413	0,530	0,238	0,667	0,095	0,455	0,092	0,125	0,744	0,910	0,009

Legenda: Diferença entre mutações não-sinônimas (dN) e sinônimas (dS) nos códonos da integrase do HIV-1 das sequências do Brasil (BR-PRE: 1990-2008; BR-POS: 2009-2019), Estados Unidos (US-PRE: 1978-2005; US-POS: 2006-2019) e União Europeia (EURO-PRE: 1986-2007; EURO-POS: 2008-2019), com $p < 0,05$. **Fonte:** O autor (2022).

6 DISCUSSÃO

Os inibidores de integrase tem se tornado uma estratégia de primeira linha para tratamento das PVHIV ao redor do mundo, assim torna-se fundamental monitorar a ocorrência de mutações de resistência como nessa classe de drogas (FOURATI et al., 2015). Neste trabalho identificamos a presença de mutações de resistência primárias aos IINs presentes no subtipo B do HIV-1 em diferentes locais do globo (Brasil, Estados Unidos e União Europeia), mesmo antes da introdução desses inibidores nos Estados Unidos (1/268 – 0,3%) e na União Europeia (1/162 – 0,6%). Nas sequências coletadas após a introdução dos IIN, identificamos 12 sequências com mutações primárias, sendo duas do Brasil (2/153 – 1,3%), cinco dos Estados Unidos (5/481 – 1,0%) e outras cinco da União Europeia (5/284 – 1,7%).

Os perfis de resistência aos IINs de primeira geração RAL e EVG estavam presentes em maior número do que aos de segunda geração DTG e BIC em todos os países/regiões avaliadas, inclusive no Brasil. Considerando os perfis de resistência “Baixo”, “Intermediário” e “Alto”, podemos verificar que os INSTIs de primeira geração (RAL e EVG) apresentaram 50% (21/42) mais sequências dentro desses perfis em relação aos de segunda geração (BIC e DTG) e que todas as sequências deste segundo grupo apresentaram resistência cruzada à RAL e EVG, confirmando outros achados similares (DE SOUZA CAVALCANTI et al., 2015; FOURATI et al., 2015; MACHADO; GOMES; GUIMARÃES, 2019; PASSAES et al., 2012; UNGER et al., 2016).

A menor barreira genética e interações medicamentosas mais comuns dessa primeira geração de IIN devem ser outras possíveis razões para tais achados (revisado por RHEE et al., 2019). Por outro lado, é evidente a baixa frequência de mutações de resistência ao DTG em comparação às outras regiões estudadas, considerando que o medicamento tem sido disponibilizado no Brasil desde 2009 e que compõe desde 2017 o esquema preferencial de tratamento de primeira linha no país, mesmas diretrizes aplicadas nos Estados Unidos e União Europeia (BALLANTYNE; PERRY, 2013; BRASIL et al., 2018; KATLAMA; MURPHY, 2012). Considerando a população sob tratamento com INSTIs surpreende os valores de mais de 98% de sequências com perfil “Susceptível” nos países aqui estudados, mesmo considerando o período após a introdução dessa classe de medicamentos, fazendo um contra ponto com outros estudos (BRADLEY-STEWART et al., 2017; SCUTARI et al., 2020). Tais diferenças podem ser explicadas pela inclusão de sequências muito mais diversas neste estudo e pela análise ter

se restringido às sequências do subtipo B, não considerando os demais subtipos e formas recombinantes.

Dentre as mutações de resistência presentes a N155H (4/1440 – 0,2%) foi a mais prevalente, aparecendo em quatro sequências, uma do Brasil (0,4%), uma da União Europeia (0,2%), e duas dos Estados Unidos (0,5%). Em seguida estavam as mutações E138K, G140S, Q148H, Q148R (2/1440 – 0,1% cada), E92D, G140A, G140C e N155S (1/1440 – 0,06% cada), demonstrando a baixa frequência de mutações primárias, semelhantes às reportadas por Bradley-Stewart et al. (2017). Ao verificar as mutações acessórias, a mais prevalente foi a E157Q, presente em 30 das sequências analisadas (2%), seguida da T97A, em 10 sequências (0,6%), ambas acessórias polimórficas, essas mesmas mutações já haviam sido reportadas em outros trabalhos como frequentes em pacientes em falha terapêutica e em outros subtipos (EL BOUZIDI et al., 2020; NGUYEN et al., 2018).

Apesar da baixa quantidade de sequências que apresentaram mutações de resistência primárias, encontramos uma alta variabilidade nos padrões de aminoácidos, tanto no Brasil (49,1%), quanto nos Estados Unidos (62,7%) e União Europeia (55,6%) entre os sítios pesquisados. Sítios importantes para a proteína, como as posições DDE do sítio ativo foram conservadas em quase todas as sequências, porém encontramos três com alterações na posição D64, uma em cada um dos grupos BR-POS, EURO-PRE e EURO-POS; e seis na posição E152, duas nos grupo BR-POS (2/153 – 1,3%) e US-POS (2/481 – 0,4%) e uma nos grupos US-PRE (1/268 – 0,3%) e EURO-POS (1/284 – 0,3%), resultados relevante, considerando que outros estudos não haviam identificado alterações nessas posições (MANTOVANI et al., 2012; NGUYEN et al., 2018).

Ao mesmo tempo, quando investigamos a pressão seletiva, apenas 24 (8,3%) sítios estavam sob pressão seletiva positiva, resultados que se assemelha com outros já reportados (MEIXENBERGER et al., 2017). Em nossas análises, não identificamos nenhum dos sítios de mutações primárias sob pressão seletiva positiva, porém, identificamos dois sítios de mutações acessórias (V151 e S230). Ao analisarmos os padrões de aminoácidos verificamos que em todos os recortes foram encontradas sequências com a alteração V151I, uma mutação acessória ligada à efeitos defectivos quando associada a outra mutação (M50I) (YANG et al., 2021). Ainda encontramos alterações no códon S230 com várias alterações diferentes nos padrões de

aminoácidos, incluindo uma mutação acessória e S230R que confere um grau de resistência aos INSTIs e há evidências de que poderia levar à VF (PHAM et al., 2018).

Algumas limitações do estudo devem ser destacadas, tais como, a quantidade de indivíduos foi muito diferentes entre os locais (Brasil, Estados Unidos e União Europeia) e entre os grupos de cada local (PRE e POS), o que prejudicou a comparação estatística entre eles; a falta de informações no banco de dados de muitas sequência sobre quais ARVs eles já tinham sido expostos, e em alguns casos se eram ou não naives; a falta de informações básicas, como ano de coleta, local de origem e subtipo do HIV que descartou muitas sequências na análise prévia. Entretanto, nós conseguimos reunir informações sobre a variabilidade das sequências do subtipo B do HIV-1 de diferentes locais do globo que estão na vanguarda das pesquisas sobre resistência e na implementação de estratégias terapêuticas, sendo os primeiros a aprovar o uso de novas tecnologias e implementar estratégias de combate à disseminação do HIV.

7 CONCLUSÃO

Neste trabalho identificamos 12 sequências com mutações primárias antes e após a introdução dos inibidores de integrase distribuídas nos três locais pesquisados. Além disso, identificamos a mutação E157Q como a mais prevalente em nossas sequências em todos os grupos, BR-PRE/POS, US-PRE/POS e EURO-PRE/POS; ainda mais, reportamos 3 sequências com mutações na posição D64 e 6 com mutações na posição E152 do sítio ativo da integrase, algo incomum na literatura até então. Avaliamos a pressão seletiva nos sítios da integrase onde encontramos que mais de 54,6% dos sítios estavam sob pressão seletiva negativa, enquanto que apenas 8,3% sob pressão seletiva positiva, em destaque para os sítios V72, V201 e T206 que estavam presentes em todos os locais avaliados em ambos os recortes PRE e POS, porém, não conseguimos determinar quais os fatores que poderiam estar envolvidos nesse fenômeno e outros trabalhos são necessários para investigar os aspectos que podem levar ao aparecimento de mutações de resistência, a variabilidade genética e a pressão seletiva na integrase do HIV-1 nos subtipos B e para traçar estratégias terapêuticas que auxiliem na prática clínica e na qualidade de vida das PVHIV.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. F. et al. Lower Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Brazilian Subtype B Found in Northeastern Brazil with Slower Progression to AIDS. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 26, n. 11, p. 1249–1254, 17 nov. 2010.
- ARNS. **HIV French Resistance - HIV-1 genotypic drug resistance interpretation's algorithms**. Disponível em: <<http://www.hivfrenchresistance.org/>>. Acesso em: 17 jun. 2021.
- AVERT FOUNDATION. **HIV strains and types | Avert**. Disponível em: <<https://www.avert.org/professionals/hiv-science/types-strains>>. Acesso em: 26 mar. 2021.
- AVERT FOUNDATION. **Global HIV and AIDS Statistics**. Disponível em: <<https://www.avert.org/global-hiv-and-aids-statistics>>. Acesso em: 26 mar. 2021.
- BALLANTYNE, A. D.; PERRY, C. M. Dolutegravir: First global approval. **Drugs**, v. 73, n. 14, p. 1627–1637, 2013.
- BELOUKAS, A. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 infection in Europe: An overview. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 46, p. 180–189, 1 dez. 2016.
- BRADLEY-STEWART, A. et al. HIV-1 integrase inhibitor resistance among treatment naïve patients in the West of Scotland. **Journal of Clinical Virology**, v. 92, p. 7–10, 1 jul. 2017.
- BRASIL et al. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
- CECCHERINI-SILLBERSTEIN, F. et al. Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. **AIDS reviews**, 2009.
- CECCHINI, D. M. et al. Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors in Argentina: first interim survey. **Revista espanola de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, v. 32, n. 3, p. 263–267, jun. 2019.

CHANG, S. Y. et al. Prevalence of Integrase Strand Transfer Inhibitors (INSTI) Resistance Mutations in Taiwan. **Scientific Reports**, v. 6, 25 out. 2016.

DE SOUZA CAVALCANTI, J. et al. High frequency of dolutegravir resistance in patients failing a raltegravir-containing salvage regimen. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 926–929, 1 mar. 2015.

EL BOUZIDI, K. et al. High prevalence of integrase mutation L74I in West African HIV-1 subtypes prior to integrase inhibitor treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 27 fev. 2020.

FOURATI, S. et al. Cross-resistance to elvitegravir and dolutegravir in 502 patients failing on raltegravir: a French national study of raltegravir-experienced HIV-1-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1507–1512, 1 maio 2015.

ISO. **Online Browsing Platform (OBP)**. Disponível em: <<https://www.iso.org/obp/ui/#search>>. Acesso em: 23 set. 2021.

JUNQUEIRA, D. M.; DE MATOS ALMEIDA, S. E. HIV-1 subtype B: Traces of a pandemic. **Virology**, v. 495, p. 173–184, 1 ago. 2016.

KATLAMA, C.; MURPHY, R. Dolutegravir for the treatment of HIV. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 4, p. 523–530, abr. 2012.

KORBER, B.; MYERS, G. Signature Pattern Analysis: A Method for Assessing Viral Sequence Relatedness. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 8, n. 9, p. 1549–1560, set. 1992.

KOSAKOVSKY POND, S. L.; FROST, S. D. W. Not So Different After All: A Comparison of Methods for Detecting Amino Acid Sites Under Selection. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1208–1222, 1 maio 2005.

LANL. **Country Codes**. Disponível em:

<<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HelpDocs/databasecountrycode.html>>. Acesso em: 23 set. 2021.

LANL. **Distribution of All HIV-1 Sequences**. Disponível em:

<<https://www.hiv.lanl.gov/components/sequence/HIV/geo/geo.comp>>. Acesso em: 26 mar. 2021.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. **Bioinformatics**, v. 30, n. 22, p. 3276–3278, 15 nov. 2014.

LOPES, C. A. F. et al. The Evolving Genotypic Profile of HIV-1 Mutations Related to Antiretroviral Treatment in the North Region of Brazil. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–6, 2015.

MACHADO, L. DE A.; GOMES, M. F. DA C.; GUIMARÃES, A. C. R. Raltegravir-Induced Adaptations of the HIV-1 Integrase: Analysis of Structure, Variability, and Mutation Co-occurrence. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 3 set. 2019.

MACHADO, L. F. A. et al. Lower genetic variability of HIV-1 and antiretroviral drug resistance in pregnant women from the state of Pará, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 270, 12 abr. 2017.

MANTOVANI, N. P. et al. Analysis of transmitted resistance to raltegravir and selective pressure among HIV-1-infected patients on a failing HAART in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2122–2125, jun. 2012.

MARK PLANK. Dito & Feito. **Super Interessante**, p. 54, out. 1988.

MARKHAM, A. Cabotegravir Plus Rilpivirine: First Approval. **Drugs**, v. 80, n. 9, p. 915–922, 1 jun. 2020.

MEIXENBERGER, K. et al. Molecular evolution of HIV-1 integrase during the 20 years prior to the first approval of integrase inhibitors. **Virology Journal**, v. 14, n. 1, 14 nov. 2017.

MENZA, T. W. et al. Pre-treatment integrase strand transfer inhibitor resistance in North Carolina from 2010-2016 HHS Public Access. **AIDS**, v. 31, n. 16, p. 2235–2244, 2017.

NGUYEN, T. et al. Prevalence and clinical impact of minority resistant variants in patients failing an integrase inhibitor-based regimen by ultra-deep sequencing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 9, p. 2485–2492, 1 set. 2018.

PASSAES, C. P. B. et al. Monitoring the emergence of resistance mutations in patients infected with HIV-1 under salvage therapy with raltegravir in Rio de Janeiro, Brazil: A follow-up study. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 12, p. 1869–1875, 1 dez. 2012.

PHAM, H. T. et al. The S230R Integrase Substitution Associated With Virus Load Rebound During Dolutegravir Monotherapy Confers Low-Level Resistance to Integrase Strand-Transfer Inhibitors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 5, p. 698–706, 24 jul. 2018.

RHEE, S.-Y. et al. A systematic review of the genetic mechanisms of dolutegravir resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 11, p. 3135–3149, 1 nov. 2019.

RIEDEL, M.; RIBAS, J. L. C. Prevalência De Subtipos De Hiv-1 No Brasil: Uma Revisão. **Caderno Saúde e Desenvolvimento**, v. 7, n. 4, p. 91–103, 2015.

SCUTARI, R. et al. Evaluation of HIV-1 integrase resistance emergence and evolution in patients treated with integrase inhibitors. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 163–169, 1 mar. 2020.

SEPHA, M. et al. HIV-Integrase Gene and Resistance... Characterization of HIV-1 Integrase Gene and Resistance Associated Mutations Prior to Roll out of Integrase Inhibitors by

Kenyan National HIV-Treatment Program in Kenya Characterization of HIV-1 Integrase Gene and Resist. **Ethiop J Health Sci**, v. 30, n. 1, p. 37, 2020.

STANFORD UNIVERSITY. **Why are some DRMs called Major and others called Minor?** Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/pages/FAQ/FAQ.html>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

STANFORD UNIVERSITY. **Major HIV-1 Drug Resistance Mutations**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <hivdb.stanford.edu>. Acesso em: 29 jul. 2020a.

STANFORD UNIVERSITY. **INSTI Mutation Pattern Scores - HIV Drug Resistance Database**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/pattern-scores/INSTI/>>. Acesso em: 20 nov. 2019b.

STANFORD UNIVERSITY. **Major Integrase Inhibitor (INSTI) Resistance Mutations**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/dr-summary/resistance-notes/INSTI/>>. Acesso em: 14 nov. 2019c.

STANFORD UNIVERSITY. **Integrase inhibitors (INIs) associated Drug Resistance Mutations (DRMs)**. Disponível em: <https://hivdb.stanford.edu/pages/documentPage/INI_mutationClassification.html>. Acesso em: 14 nov. 2019d.

STANFORD UNIVERSITY. **HIValg Program: Mutation List Analysis - HIV Drug Resistance Database**. Disponível em: <<https://hivdb.stanford.edu/hivalg/by-mutations/>>. Acesso em: 17 jun. 2021.

SWINDELLS, S. et al. Long-Acting Cabotegravir and Rilpivirine for Maintenance of HIV-1 Suppression. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 12, p. 1112–1123, 19 mar. 2020.

TAYLOR, B. S. et al. The challenge of HIV-1 subtype diversity. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 15, p. 1590, 10 abr. 2008.

UNAIDS. **Resumo Informativo - Estatísticas Mundiais sobre o HIV**. [s.l: s.n.].

UNGER, N. R. et al. Elvitegravir for the treatment of HIV. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 17, n. 17, p. 2359–2370, 21 nov. 2016.

VERCAUTEREN, J. et al. Clinical Evaluation of Rega 8: An Updated Genotypic Interpretation System That Significantly Predicts HIV-Therapy Response. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

WEAVER, S. et al. Datamonkey 2.0: A Modern Web Application for Characterizing Selective and Other Evolutionary Processes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 773–777, 1 mar. 2018.

YAMAGUCHI, J. et al. Complete genome sequence of CG-0018a-01 establishes HIV-1 subtype L. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, 6 nov. 2019.

YANG, J. et al. A Combination of M50I and V151I Polymorphic Mutations in HIV-1 Subtype B Integrase Results in Defects in Autoprocessing. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 2331, 22 nov. 2021.

APÊNDICE A – ALTERAÇÕES NOS PADRÕES DE ASSINATURAS DE AMINOÁCIDOS DOS CÓDONS DA INTEGRASE DO HIV-1 DO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO EUROPEIA

Códon HXB2	BR-PRE	BR-POS	EURO-PRE	EURO-POS	US-PRE	US-POS
1 F	-	-	-	-	-	-
2 L	-	-	1 F	-	-	-
3 D	1 E, 2 N	2 E	-	2 E	2 E, 1 N	-
4 G	1 K, 1 R	-	-	1 R	1 E, 1 R	1 E, 1 K
5 I	-	-	-	1 K	1 M	1 N
6 D	1 A, 7 E, 8 N, 5 S, 9 T	14 E, 5 N, 5 S, 12 T	5 E, 1 H, 1 N, 1 S	19 E, 1 H, 3 T	16 E, 1 K, 2 N	19 E, 5 N, 1 R, 1 V
7 K	11 E, 1 N, 3 Q, 4 R	1 A, 17 E, 2 Q, 4 R	1 E, 1 Q, 1 R	3 E, 5 Q, 14 R	1 I, 1 Q, 16 R	4 Q, 11 R
8 A	-	-	-	-	-	1 T
9 Q	-	-	1 P	-	-	-
10 D	75 E	1 A, 128 E	1 A, 143 E, 1 G, 1 V	1 A, 251 E, 1 G, 1 H	3 A, 244 E	1 A, 458 E
11 E	29 D	42 D	55 D, 1 G, 1 H, 3 Q	116 D, 2 Q	82 D	255 D, 1 K, 1 Q
12 H	-	-	1 P	-	1 R	-
13 E	6 D	2 D, 1 K	3 D, 1 G, 1 K	11 D, 1 T	1 D, 1 T	4 D, 1 G
14 K	5 R, 1 T	16 R	14 R	31 R	1 N, 13 R	13 R
15 Y	-	1 F	1 F	-	1 N	-
16 H	-	-	1 P	1 L	-	-
17 S	1 C, 22 N, 3 T	2 C, 39 N, 10 T	1 C, 19 N, 1 R, 6 T	8 C, 46 N, 13 T	3 C, 54 N, 10 T	5 C, 88 N, 23 T
18 N	-	-	2 S	-	-	1 T
19 W	-	-	-	-	-	-
20 R	5 K	1 G, 11 K	10 K	1 E, 24 K	18 K, 1 T	69 K
21 A	1 S, 4 T	5 S, 2 T	5 T	1 S, 10 T	14 T	1 M, 2 S, 17 T, 1 V

22 M	1 I	3 L	1 I, 1 L	3 I, 1 V	3 I, 3 L	3 I
23 A	4 V	1 S, 2 T, 12 V	1 G, 1 T, 11 V	1 S, 3 T, 17 V	2 T, 10 V	1 S, 2 T, 30 V
24 S	2 G, 5 N	7 G, 6 N	1 A, 1 D, 4 G, 15 N, 1 R	3 A, 5 D, 5 G, 2 H, 25 N	1 A, 1 D, 13 G, 14 N	2 A, 1 D, 12 G, 1 H, 35 N
25 D	-	9 E	4 E	26 E, 2 N	17 E, 1 N	29 E, 1 N
26 F	-	1 Y	-	-	-	-
27 N	1 G	-	1 D, 1 G, 1 S	1 D, 1 G, 1 H, 1 S	1 G, 1 S	2 S, 1 T
28 L	17 I	26 I, 1 M	14 I, 2 M	29 I, 1 M	16 I	84 I, 2 M
29 P	1 T	-	-	-	-	-
30 P	3 A, 2 S	2 A, 3 S	5 A, 1 S	6 A, 2 H, 2 S	2 A, 1 S	38 A
31 V	29 I	38 I	1 E, 36 I	69 I, 1 L	58 I	164 I
32 V	12 I	11 I	12 I	31 I	5 I, 1 L	15 I
33 A	-	-	-	-	-	-
34 K	1 R	3 R	1 N, 1 R	3 R	6 R	7 R
35 E	2 Q	2 Q	2 Q, 1 Y	1 D, 1 K, 3 Q	1 K	36 Q
36 I	-	-	-	-	-	-
37 V	8 I	11 I	7 I, 1 Q	10 I	6 I	69 I
38 A	-	-	-	1 N, 1 P, 1 R, 1 S	1 S	1 N
39 S	9 C, 3 N	21 C, 4 M, 6 N	20 C, 1 G, 1 N, 1 R	38 C, 5 N, 1 Q, 2 R, 1 T	26 C, 1 M, 4 N	92 C, 39 N, 1 R
40 C	-	-	-	-	1 R	-
41 D	1 A, 2 N	3 N	1 N	7 N	2 A, 5 N	1 A, 1 G, 7 N
42 K	-	1 R	-	2 R	1 R	2 R
43 C	-	-	-	-	-	-
44 Q	-	-	1 H	-	-	-
45 L	2 I, 1 Q, 1 S, 8 V	4 I, 3 Q, 3 R, 7 V	4 I, 4 Q, 1 S, 7 V	4 I, 11 Q, 14 V	3 I, 10 Q, 2 R, 9 V	12 I, 30 Q, 1 R, 13 V
46 K	-	-	-	-	-	1 T
47 G	1 K	-	-	-	-	1 E
48 E	-	1 K	-	-	1 Q	1 G, 1 Q

49 A	1 P	3 P	1 P	1 P	2 P	3 P
50 M	10 I, 3 T	23 I, 2 L, 1 T	20 I, 3 L, 3 T	48 I, 1 L, 4 R, 4 T, 1 V	42 I, 4 T	57 I, 1 L, 2 R, 10 T, 1 V
51 H	-	-	-	1 Q	-	-
52 G	2 R	-	-	-	-	-
53 Q	1 R	2 K, 1 R	1 H	-	-	1 H, 1 K
54 V	-	4 I	1 I	1 I	-	3 I
55 D	-	1 G	1 N	-	2 N	1 A, 4 N
56 C	1 R	1 S	1 S, 2 Y	1 S	1 S, 1 V	6 S, 1 Y
57 S	2 N	-	2 N	1 G, 4 N	1 G	1 G
58 P	-	-	-	-	-	-
59 G	1 R	-	-	3 E	1 A, 1 E	1 E
60 I	2 M	2 M, 2 V	1 L, 3 M, 4 V	2 L, 4 M, 4 V	1 L, 4 V	4 M, 1 V
61 W	-	-	-	-	-	-
62 Q	-	-	-	-	-	-
63 L	1 V	-	-	2 I	1 M	2 I
64 D	-	1 N	1 H	1 N	-	-
65 C	-	-	-	-	-	-
66 T	1 V	-	-	-	1 P	-
67 H	-	-	-	-	-	-
68 L	-	1 S	-	2 E, 1 I, 1 M, 2 V	1 V	2 I, 13 S
69 E	-	-	-	-	-	2 K
70 G	1 K, 2 R	1 D, 1 E, 1 N, 1 S	3 E	4 E	1 E	7 E
71 K	1 Q	1 N, 2 Q	1 Q	1 Q	1 Q, 2 R	1 Q, 1 R
72 V	47 I	81 I	101 I, 1 T	183 I, 1 N, 1 S	132 I, 1 T	317 I, 1 P, 3 T
73 I	4 V	-	2 V	1 F, 3 V	1 V	41 V
74 L	5 I	9 I, 6 M	4 I, 1 V	12 I, 3 M	7 I, 1 M, 1 P, 1 V	8 I, 1 M, 2 V
75 V	-	-	-	1 M	-	1 I
76 A	-	-	-	-	-	-
77 V	1 A	2 A, 1 I	1 A	3 A	-	2 A, 2 I

78 H	-	-	-	-	2 R	-
79 V	1 A	1 I	1 A	1 A, 2 I	-	2 A, 1 I
80 A	-	-	1 S	1 S	2 S	2 V
81 S	-	-	-	-	1 G	-
82 G	3 R	-	-	-	2 R	-
83 Y	-	-	-	-	-	-
84 I	1 M	1 M, 1 V	1 M	1 L, 1 M, 2 V	1 L, 2 M, 6 V	1 L, 6 M, 5 V
85 E	-	-	-	-	-	-
86 A	-	-	-	-	-	-
87 E	-	-	-	-	1 A	1 K
88 V	-	-	1 I	-	1 I	2 I
89 I	-	1 V	-	1 L	1 V	-
90 P	1 Q, 1 S	3 A, 1 S	2 A, 4 S	2 S	1 A, 7 S, 1 T	3 A, 6 S
91 A	-	1 E, 4 S, 1 T	3 S, 1 V	6 E, 1 G, 4 S, 4 T	1 E, 5 T	2 E, 2 S, 4 T
92 E	-	-	1 D	1 D	-	-
93 T	-	1 N, 2 S	-	4 N	1 N	1 S
94 G	-	-	-	-	1 A	-
95 Q	-	1 R	1 E	1 S	1 P, 2 S	4 N
96 E	1 A, 2 D	3 D	3 D, 1 N	3 D	2 D, 1 G	1 D
97 T	2 A	2 A	-	4 A	-	6 A
98 A	-	4 G	-	1 G	1 G	-
99 Y	1 H	3 F	2 F	2 F	1 L	2 F
100 F	-	1 Y	1 Y	1 Y	2 Y	7 Y
101 L	23 I, 2 V	57 I, 1 T, 1 V	62 I	136 I, 1 T, 4 V	111 I, 4 V	262 I, 1 M, 1 V
102 L	-	-	-	-	-	-
103 K	1 R	1 R	-	3 R	1 R	4 R
104 L	-	1 S	-	-	-	-
105 A	-	-	-	-	-	-
106 G	-	4 A	1 A, 1 E	10 A	1 A, 1 E	4 A

107 R	-	-	-	-	1 K	-
108 W	-	-	-	-	-	-
109 P	-	-	-	-	-	-
110 V	-	-	-	1 K	-	-
111 K	1 A, 1 G, 3 R	1 A, 1 R, 5 T	1 A, 6 Q, 7 R, 7 T	2 A, 1 M, 6 N, 4 Q, 4 R, 34 T	1 G, 4 N, 3 Q, 9 R, 19 T	39 A, 1 E, 1 G, 2 Q, 7 R, 2 S, 28 T
112 T	2 A, 5 I, 1 M, 3 V	6 A, 4 I, 2 R, 1 S, 4 V	10 A, 18 I, 1 M, 4 V	9 A, 21 I, 3 M, 1 R, 17 V	23 A, 6 I, 1 R, 13 V	47 A, 38 I, 1 K, 1 L, 4 M, 1 R, 12 V
113 I	1 L, 13 V	1 L, 22 V	1 L, 22 V	1 L, 39 V	1 E, 31 V	1 L, 34 V
114 H	-	-	-	-	1 Q	-
115 T	-	-	-	-	1 A	-
116 D	-	-	-	-	1 G	-
117 N	-	-	-	-	-	-
118 G	-	-	1 S	-	-	-
119 S	4 G, 18 P, 1 R, 8 T	12 G, 26 P, 7 R, 9 T	3 A, 11 G, 27 P, 4 R, 6 T	1 A, 18 G, 68 P, 14 R, 6 T	1 A, 20 G, 32 P, 6 R, 10 T	18 G, 51 P, 12 R, 9 T
120 N	-	1 T	-	-	-	-
121 F	-	-	-	-	1 L	1 L
122 T	15 I	30 I, 1 V	26 I	74 I, 2 V	48 I, 1 V	78 I, 1 N
123 G	1 C, 91 S	153 S	1 C, 161 S	4 C, 280 S	2 C, 266 S	7 C, 474 S
124 A	18 N, 1 S, 53 T	1 G, 1 H, 46 N, 1 Q, 5 S, 59 T	2 G, 27 N, 4 Q, 1 S, 76 T	49 N, 1 Q, 8 S, 158 T	3 G, 30 N, 5 S, 165 T	11 G, 81 N, 6 S, 278 T
125 T	36 A, 1 P, 3 V	67 A, 1 M, 1 S, 7 V	43 A, 2 M, 1 N, 6 V	68 A, 1 P, 18 V	68 A, 1 I, 1 M, 6 V	144 A, 4 M, 14 V
126 V	4 L, 2 M	19 L, 3 M	3 L	1 D, 1 F, 7 L, 2 M, 1 T	2 L, 1 M	3 A, 1 F, 25 L, 6 M
127 R	90 K	153 K	162 K	283 K	267 K	478 K
128 A	1 T	-	1 T	-	1 T, 1 V	1 T, 1 V
129 A	-	-	1 T	-	-	-
130 C	-	-	-	-	-	-
131 W	-	-	-	-	-	-

132 W	-	-	1 R	-	-	-
133 A	-	-	1 T	-	2 T	-
134 G	2 E, 1 R	2 E	1 R	1 D, 1 R	2 E, 1 R	1 R
135 I	12 V	17 V	9 V	21 V	15 V	29 V
136 K	1 N, 4 Q	1 D, 1 E, 3 N, 2 Q, 1 R, 1 T	1 N, 1 T	2 N, 3 Q, 1 R	1 N, 2 Q	5 N, 1 Q, 2 R
137 Q	1 H	-	-	-	-	2 H, 1 P
138 E	1 D	4 D, 1 K	-	5 D	1 K	1 D
139 F	-	-	-	1 L	1 Y	1 C, 2 Y
140 G	-	1 C	-	1 A	-	2 S
141 I	2 V	-	3 V	-	1 T, 1 V	1 T, 3 V
142 P	-	-	-	-	-	-
143 Y	-	-	-	2 R	-	1 C
144 N	1 H	-	-	-	-	-
145 P	1 T	-	-	-	-	-
146 Q	1 E	-	-	1 K	-	-
147 S	-	-	-	-	-	-
148 Q	-	1 R	-	1 R	1 P	2 H
149 G	1 E, 1 R	-	1 A	-	1 R	-
150 V	1 A	1 A	1 I	-	1 A	4 A, 1 I, 1 S
151 V	19 I	24 I	6 I	7 I	7 I	11 I
152 E	2 K	-	-	1 K	1 K	2 K
153 S	1 A	-	-	-	-	1 A
154 M	3 I, 1 L	1 I	6 I, 7 L	5 I, 4 L	19 I, 7 L	15 I, 17 L
155 N	-	1 H	1 S	1 H	-	2 H
156 K	9 N, 1 R	16 N, 1 Q, 2 R	13 N	23 N, 1 R	26 N, 1 R	47 N
157 E	1 G, 1 K, 2 Q	1 K, 5 Q	1 K, 3 Q	7 Q	1 K, 1 N, 4 Q	2 K, 12 Q
158 L	-	-	1 F	-	-	-
159 K	-	-	-	-	-	-
160 K	1 N, 1 Q, 2 T	2 N, 3 Q, 2 R, 1 T	1 E, 2 N, 1 R, 1 T	1 H, 3 N, 6 Q, 3 T	3 N, 4 Q, 1 R, 2 T	1 E, 3 N, 1 P, 9 Q, 1 R, 1 T

161 I	-	1 V	-	-	1 L	2 V
162 I	2 V	-	-	-	2 V	2 V
163 G	1 A, 2 E, 1 H, 2 Q, 1 T	4 E, 1 H, 2 Q, 2 T, 2 V	1 A, 3 E, 1 Q, 1 R, 1 T	1 A, 16 E, 3 Q, 1 R	19 E, 1 N, 1 Q, 1 R, 1 S, 2 V	1 A, 1 D, 17 E, 1 I, 1 K, 23 Q, 1 R, 2 T, 5 V
164 Q	-	-	-	-	-	2 K
165 V	2 I	4 I	7 I	9 I	10 I	12 I
166 R	2 K	1 K	-	-	2 K	1 K
167 D	1 E	13 E	5 E	7 E	9 E	12 E, 2 N
168 Q	1 P	-	-	-	-	-
169 A	-	-	-	1 G	1 V	-
170 E	-	-	1 K	-	1 K	2 K
171 H	-	2 Q	1 L, 2 Q, 1 R	3 L, 5 Q	1 L, 6 Q	1 L, 2 Q
172 L	1 P	1 V	1 T	1 I	-	-
173 K	1 M, 3 R	5 R	5 R	1 E, 7 R	10 R	7 R, 1 T
174 T	-	-	-	-	1 R	-
175 A	1 T, 1 V	-	1 T	1 V	-	1 V
176 V	1 G, 1 L	1 L	1 I, 2 L	2 L	2 L	1 I, 25 L
177 Q	-	-	1 H	-	-	1 H, 1 L
178 M	1 I	-	1 V	-	1 L, 1 T	-
179 A	-	-	-	1 S	-	-
180 V	-	1 I	1 A	-	-	-
181 F	5 L	4 L	11 L, 1 Y	11 L	14 L, 2 Y	22 L
182 I	-	4 V	5 V	8 V	7 V	6 V
183 H	-	-	1 P	-	-	-
184 N	-	-	-	-	-	-
185 F	-	-	-	-	-	-
186 K	-	-	1 E, 1 R	-	-	-
187 R	-	1 K	7 K	1 K, 1 T	4 K	3 K
188 K	2 R	8 R	-	2 R	8 R	18 R
189 G	-	-	1 R	-	-	-

190 G	-	-	-	-	-	-
191 I	-	-	-	1 L	-	1 V
192 G	-	-	-	-	-	-
193 G	1 R	4 D, 3 E, 1 R	2 D, 15 E	2 D, 23 E, 1 N, 2 R	6 D, 13 E, 4 R	47 D, 18 E, 28 R
194 Y	-	2 H	-	-	1 C	3 C
195 S	-	1 C, 2 T	1 H, 2 T	1 C, 9 T	3 C, 1 T	55 C, 7 T
196 A	1 P	-	1 T	1 P	1 P, 1 T	-
197 G	-	-	-	-	-	-
198 E	1 D	2 D	-	5 D, 2 Q	1 D, 1 K	1 D, 1 K
199 R	-	-	-	-	-	-
200 I	-	1 M, 1 T	2 M	2 M	-	1 L, 1 M
201 V	40 I	77 I	65 I	130 I	100 I	196 I
202 D	-	-	1 V	-	1 G	-
203 I	4 M	9 M	11 M	20 M	12 M, 1 V	9 M
204 I	1 V	1 L	2 V	4 V	1 M, 2 V	39 V
205 A	7 S, 1 T	2 S, 1 T	2 S	6 S, 1 T	2 S	4 S, 1 T
206 T	16 S	39 S	28 S	51 S	1 A, 32 S	160 S
207 D	-	3 E, 2 N	1 E, 1 S	1 N	2 N	4 E, 3 N
208 I	5 L	19 L	13 L, 1 M	17 L, 5 M	16 L, 1 M	69 L, 3 M, 1 V
209 Q	1 R	-	-	-	-	-
210 T	-	1 I, 2 S	1 P	1 I, 1 N	1 A, 3 I	2 I
211 K	1 Q, 9 R, 1 T	3 Q, 11 R, 2 T	2 Q, 13 R	1 N, 1 P, 6 Q, 16 R, 1 S, 2 T	5 Q, 19 R, 3 T	9 Q, 74 R, 3 T
212 E	-	3 A, 1 L	1 A, 1 V	4 A, 1 G, 1 I, 3 Q, 1 T, 1 V	9 A, 1 K, 1 Q	1 A, 2 I, 2 L, 1 V
213 L	-	-	-	-	-	-
214 Q	-	-	-	-	-	1 E
215 K	3 N, 3 Q	6 N	1 H, 7 N, 1 S	19 N, 1 T	8 N	13 N, 1 R, 1 S
216 Q	4 H, 1 K	3 H, 1 K	4 H, 1 K	9 H, 1 K, 3 N, 2 R	5 H	2 H, 1 K, 1 N
217 I	-	-	-	-	2 V	4 V

218 T	8 I, 1 L, 4 S	15 I, 7 S	6 I, 7 S	21 I, 1 L, 20 S	10 I, 1 L, 10 S	48 I, 49 S
219 K	3 N, 1 Q, 1 R	5 N, 3 Q	4 N	1 I, 8 N, 3 Q, 2 T	6 N, 2 Q	6 E, 10 N, 1 R
220 I	1 F, 3 L, 1 M, 1 V	1 F, 13 L, 2 M, 1 V	18 L, 1 M, 1 V	2 F, 16 L, 1 M, 8 V	1 F, 12 L, 3 V	38 L, 1 M, 4 V
221 Q	-	1 R, 1 T	1 H	1 R	1 H, 4 K, 3 R	1 H, 1 K, 1 R, 1 S
222 N	2 H, 3 K	7 K, 1 R	2 H, 4 K, 1 Q	2 H, 16 K	1 H, 8 K	1 H, 17 K
223 F	-	1 L	-	-	-	-
224 R	1 Q	-	1 Q, 1 W	2 W	-	1 Q
225 V	-	-	-	-	-	1 F
226 Y	-	-	-	-	-	1 N
227 Y	4 F	8 F	15 F	9 F, 1 N	10 F	13 F
228 R	-	-	-	-	-	-
229 D	-	1 E	1 S	-	-	1 E
230 S	9 N	1 G, 15 N	15 N	2 G, 38 N	1 G, 22 N	2 G, 27 N, 1 R
231 R	2 K	3 K	2 K	3 K	10 K	3 K
232 N	88 D, 4 E	150 D, 3 E	150 D, 12 E	262 D, 19 E	256 D, 12 E	438 D, 41 E
233 P	-	-	-	1 Q	-	-
234 L	2 H, 8 I, 2 V	1 H, 8 I, 1 S, 2 V	2 F, 15 I, 6 V	2 F, 3 H, 27 I, 3 V	15 I, 1 T, 3 V	1 F, 1 H, 57 I, 1 P, 8 V
235 W	-	-	-	-	-	-
236 K	-	-	-	1 R	-	-
237 G	-	-	-	-	-	-
238 P	-	-	-	-	1 H	-
239 A	-	-	1 P	-	-	-
240 K	1 R	-	2 R	3 R	2 R	2 R
241 L	-	-	-	-	-	-
242 L	-	-	-	1 V	-	1 R
243 W	-	-	1 L	-	-	-
244 K	-	-	-	-	1 R	1 R
245 G	-	-	-	-	-	-
246 E	-	-	-	-	-	-

247 G	-	-	-	-	-	1 E
248 A	-	-	1 S	2 S	1 S	-
249 V	1 I	-	-	1 L	1 I	-
250 V	-	-	-	-	3 I, 1 L	-
251 I	-	-	1 L	2 L, 1 V	1 V	1 L
252 Q	-	-	-	1 K	1 K	-
253 D	3 E, 1 V	9 E, 1 Y	3 E	14 E, 5 H	7 E, 1 H	1 A, 60 E, 1 H, 2 N, 1 Y
254 N	1 D, 2 K, 1 Q, 1 S	2 Q	5 K, 2 Q, 1 S	1 H, 4 K, 1 Q, 1 R, 2 S	1 G, 1 H, 4 K, 2 Q	2 D, 1 H, 9 K, 4 Q, 1 S
255 S	2 G, 2 N, 1 R	1 K, 3 N, 3 R	4 G, 1 T	3 G, 1 N, 2 R, 1 T	3 G, 3 K, 2 N, 1 T	13 G, 2 K, 6 N, 2 R
256 D	20 E	41 E	33 E	82 E, 1 Y	43 E	75 E
257 I	-	-	-	-	1 V	-
258 K	-	-	-	-	1 R	-
259 V	1 I	-	-	3 I	-	3 I
260 V	-	-	1 I	1 I	-	1 I
261 P	-	-	-	-	-	-
262 R	-	-	-	-	1 P	-
263 R	-	-	-	1 K	-	-
264 K	-	-	-	-	-	-
265 A	6 V	20 V	21 V	26 V	53 V	109 V
266 K	-	-	-	-	1 Q	-
267 I	-	1 V	-	2 V	3 V	1 T
268 I	2 L	7 L	2 L	2 L	3 L	9 L
269 R	3 K	14 K	3 K	5 K	8 K	7 K
270 D	2 N	2 E, 1 G, 5 H, 1 N	1 N	-	4 H	3 E, 4 H, 3 N
271 Y	-	-	-	-	-	-
272 G	1 R	-	-	-	-	-
273 K	-	-	-	-	1 E	2 R
274 Q	-	-	-	-	1 P	1 P
275 M	1 V	1 V	1 V	1 V	1 I, 1 T, 2 V	24 V

276 A	-	-	1 G	-	-	1 E
277 G	-	-	1 S	-	1 S	1 S
278 D	-	1 G, 1 N, 1 S	2 A, 2 E, 1 S	2 A, 1 G, 2 N	1 E, 1 G, 1 N	1 A, 1 E, 5 N
279 D	1 A, 1 G	3 G	1 G	8 G, 3 N	4 G	15 G, 3 N
280 C	-	-	-	3 S	1 S, 1 Y	-
281 V	2 M	1 M	7 M	8 M	6 M	6 M
282 A	-	-	-	-	-	1 E
283 S	10 G	20 G	18 G, 2 N	28 G	14 G, 1 R	23 G, 1 R
284 R	6 G	5 G	-	10 G	9 G, 2 T	9 G
285 Q	-	-	-	-	1 P, 2 R	1 P
286 D	3 N	5 N	1 N	17 N	9 N	8 N
287 E	-	-	-	-	1 K	-
288 D	-	2 N	6 N	2 G, 6 N	1 G, 4 N	54 N, 1 S

Legenda: Alterações de aminoácidos das sequências do Brasil (BR-PRE: 1990-2008; BR-POS: 2009-2019), Estados Unidos (US-PRE: 1978-2005; US-POS: 2006-2019) e União Europeia (EURO-PRE: 1986-2007; EURO-POS: 2008-2019); **Fonte:** O autor (2022).

APÊNDICE B – VALORES DE DN-DS DOS CÓDONS DA INTEGRASE DO HIV-1 DO BRASIL, ESTADOS UNIDOS E UNIÃO EUROPEIA

POSIÇÃO	BR-PRE	p-valor	BR-POS	p-valor	US-PRE	p-valor	US-POS	p-valor	EURO-PRE	p-valor	EURO-POS	p-valor
1	-2,274	1,000	-3,207	1,000	-2,696	1,000	-4,283	1,000	-2,190	1,000	-4,053	1,000
2	-3,152	1,000	-3,511	1,000	-5,225	1,000	-4,405	1,000	-5,092	1,000	-4,972	1,000
3	0,582	0,413	-0,746	0,985	-1,216	0,998	-0,820	1,000	-0,364	1,000	0,114	0,558
4	-2,157	0,997	-3,817	1,000	-2,611	1,000	-3,732	1,000	-2,234	1,000	-2,613	1,000
5	-	1,000	-	1,000	0,068	0,915	-1,074	0,999	-	1,000	-0,403	0,991
6	-0,064	0,602	0,473	0,406	-0,290	0,749	-2,131	0,999	-0,332	0,780	-0,872	0,958
7	-4,213	0,997	-5,414	1,000	-5,538	1,000	-5,439	1,000	-5,048	1,000	-5,283	1,000
8	-4,770	1,000	-3,101	1,000	-2,798	1,000	-2,342	1,000	-2,514	1,000	-2,550	1,000
9	-1,177	1,000	-2,620	1,000	-2,729	1,000	-3,618	1,000	-1,714	0,999	-2,470	1,000
10	-3,860	0,996	-3,179	0,999	-2,189	0,994	-1,955	0,999	-2,335	0,988	-1,468	0,987
11	-1,614	0,867	-1,628	0,918	-4,010	0,999	-2,454	0,997	-1,014	0,792	-2,983	0,998
12	-	1,000	-	1,000	-0,161	0,935	-0,656	1,000	-0,968	0,996	-0,505	1,000
13	-6,350	1,000	-7,351	1,000	-7,865	1,000	-6,795	1,000	-8,549	1,000	-7,780	1,000
14	0,620	0,431	-1,268	0,943	-0,781	0,931	-2,340	1,000	-1,087	0,914	-0,198	0,705
15	-2,272	1,000	-1,800	1,000	-1,864	1,000	-1,641	1,000	-1,320	0,998	-1,684	1,000
16	-3,209	1,000	-5,312	1,000	-3,191	1,000	-2,693	1,000	-3,122	1,000	-3,803	1,000
17	1,800	0,176	0,553	0,401	0,908	0,243	0,918	0,128	0,334	0,483	0,236	0,444
18	-2,272	1,000	-0,958	1,000	-1,713	1,000	-2,078	1,000	-1,574	0,998	-2,192	1,000
19	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
20	-0,353	0,784	-1,095	0,943	0,673	0,184	0,538	0,194	0,147	0,555	-0,592	0,905
21	-1,300	0,957	-1,668	0,998	0,187	0,478	-1,965	1,000	0,140	0,571	-0,191	0,797
22	0,145	0,997	-13,907	1,000	0,312	0,981	0,084	0,999	0,187	0,995	-22,520	1,000
23	-0,434	0,827	-1,670	0,984	-1,212	0,981	-1,393	0,999	-0,279	0,721	-1,275	0,993
24	1,359	0,127	-0,415	0,786	0,957	0,139	1,311	0,021	1,654	0,066	1,665	0,003
25	-4,566	1,000	-2,025	0,997	-2,574	1,000	-2,436	1,000	-2,428	1,000	-1,557	0,995

26	-3,437	1,000	-2,137	1,000	-1,223	1,000	-2,298	1,000	-1,462	1,000	-1,684	1,000
27	-4,749	1,000	-4,255	1,000	-3,210	1,000	-3,422	1,000	-2,755	1,000	-3,941	1,000
28	-1,119	0,845	-1,134	0,884	-1,657	0,982	-1,812	0,997	0,008	0,566	-1,534	0,992
29	-1,951	0,999	-3,340	1,000	-2,238	1,000	-2,532	1,000	-1,117	1,000	-2,550	1,000
30	-3,252	0,998	-2,744	1,000	-2,145	1,000	-1,646	1,000	-2,095	0,998	-3,063	1,000
31	-2,266	0,934	-3,982	0,999	-3,223	0,999	-4,012	1,000	-1,200	0,865	-2,414	0,997
32	0,450	0,477	-0,913	0,937	-0,471	0,925	0,171	0,434	1,370	0,021	0,572	0,176
33	-0,434	1,000	-1,193	1,000	-0,560	1,000	-0,633	1,000	-1,117	1,000	-0,893	1,000
34	-2,144	0,999	-1,100	0,995	-1,804	1,000	-1,034	0,998	-0,504	0,948	-1,235	1,000
35	-0,783	0,949	-3,079	1,000	-2,654	1,000	-2,420	1,000	-2,913	1,000	-2,407	1,000
36	-	1,000	-0,845	1,000	-	1,000	-0,921	1,000	-	1,000	-0,446	1,000
37	-0,082	0,684	-0,301	0,788	-1,039	0,992	-2,023	1,000	-1,036	0,950	-0,981	0,997
38	-3,469	1,000	-2,386	1,000	-1,772	1,000	-3,420	1,000	-1,955	1,000	-1,531	1,000
39	-0,950	0,832	-1,407	0,932	-1,473	0,969	-2,832	1,000	-0,874	0,857	-2,028	0,996
40	-	1,000	-0,958	1,000	-0,399	0,980	-0,820	1,000	-0,729	1,000	-0,168	1,000
41	-2,831	0,999	-1,935	1,000	-2,590	1,000	-1,516	1,000	-1,700	1,000	-1,791	1,000
42	-1,750	1,000	-0,882	0,996	-3,379	1,000	-0,924	1,000	-2,276	1,000	-1,814	1,000
43	-1,703	1,000	-3,214	1,000	-4,414	1,000	-3,950	1,000	-2,922	1,000	-4,225	1,000
44	-	1,000	-3,565	1,000	-3,776	1,000	-2,692	1,000	-2,047	1,000	-4,501	1,000
45	0,656	0,386	-0,961	0,861	1,067	0,126	0,429	0,325	0,347	0,438	-1,214	0,962
46	-0,587	1,000	-1,323	1,000	-2,493	1,000	-3,057	1,000	-1,905	1,000	-1,238	1,000
47	0,010	0,734	-1,431	1,000	-0,746	1,000	-1,201	1,000	-0,559	1,000	-1,148	1,000
48	-1,764	1,000	-2,192	1,000	-0,666	0,996	-2,131	1,000	-3,025	1,000	-2,467	1,000
49	-3,252	1,000	-1,551	0,999	-0,560	0,982	-2,026	1,000	-1,536	1,000	-1,466	1,000
50	-8,417	0,989	-0,981	0,834	0,163	0,739	0,009	0,734	-4,077	0,963	0,603	0,656
51	-	1,000	-	1,000	-0,244	1,000	-0,492	1,000	-1,461	1,000	-0,447	0,996
52	-1,517	0,996	-1,431	1,000	-2,611	1,000	-2,279	1,000	-1,676	1,000	-2,040	1,000
53	-1,487	0,990	-2,335	1,000	-2,489	1,000	-1,917	1,000	-3,233	1,000	-2,986	1,000
54	-0,867	1,000	-0,613	0,957	-0,560	1,000	-0,826	0,999	0,140	0,667	-1,086	1,000

55	-5,114	1,000	-2,726	1,000	-3,820	1,000	-2,994	1,000	-3,126	1,000	-2,028	1,000
56	-1,493	0,995	-0,524	0,981	-1,685	1,000	-3,657	1,000	-2,654	1,000	-2,971	1,000
57	-4,173	1,000	-2,888	1,000	-3,589	1,000	-3,731	1,000	-3,166	1,000	-2,472	1,000
58	-0,867	1,000	-0,954	1,000	-0,560	1,000	-0,380	1,000	-	1,000	-0,765	1,000
59	-0,645	0,961	-1,431	1,000	-2,982	1,000	-1,455	1,000	-0,279	1,000	-1,464	1,000
60	-1,464	0,992	0,351	0,671	0,024	0,741	-6,274	1,000	-0,348	0,859	-0,446	0,915
61	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
62	-5,637	1,000	-6,567	1,000	-4,189	1,000	-5,402	1,000	-2,613	1,000	-5,363	1,000
63	-2,279	0,998	-2,164	1,000	-2,495	1,000	-2,067	1,000	-3,162	1,000	-3,251	1,000
64	-4,587	1,000	-4,388	1,000	-4,165	1,000	-4,451	1,000	-2,068	1,000	-4,174	1,000
65	-3,416	1,000	-3,844	1,000	-2,692	1,000	-2,136	1,000	-1,459	1,000	-2,361	1,000
66	-1,304	0,982	-0,954	1,000	-1,026	1,000	-2,279	1,000	-0,838	1,000	-1,275	1,000
67	-4,380	1,000	-6,805	1,000	-4,168	1,000	-4,951	1,000	-1,826	1,000	-4,928	1,000
68	-2,578	1,000	-2,877	1,000	-3,033	1,000	-3,130	1,000	-3,874	1,000	-1,952	1,000
69	-2,932	1,000	-1,651	1,000	-1,995	1,000	-0,580	0,996	-1,142	1,000	-2,120	1,000
70	-0,204	0,783	-1,180	0,974	-1,771	1,000	-1,963	1,000	-1,530	0,996	-1,655	1,000
71	-2,724	1,000	-0,772	0,984	-1,563	1,000	-2,525	1,000	-1,016	0,996	-1,356	1,000
72	5,098	-	3,944	-	3,109	0,001	1,769	0,011	3,581	0,003	2,210	0,002
73	0,364	0,514	-1,819	1,000	-1,917	1,000	-1,653	1,000	-2,135	1,000	-1,401	1,000
74	0,017	0,600	-0,074	0,611	-0,109	0,636	-1,058	0,984	-1,200	0,972	-1,180	0,978
75	-2,168	1,000	-1,431	1,000	-2,798	1,000	-1,583	1,000	-1,676	1,000	-1,628	1,000
76	-	1,000	-0,477	1,000	-0,373	1,000	-0,506	1,000	-0,838	1,000	-0,383	1,000
77	-4,553	1,000	-6,817	1,000	-5,969	1,000	-6,712	1,000	-4,608	1,000	-4,526	1,000
78	-1,134	1,000	-0,958	1,000	-0,810	0,995	-0,164	1,000	-0,364	1,000	-	1,000
79	-1,518	0,996	-1,556	1,000	-1,119	1,000	-1,584	1,000	-2,095	1,000	-0,958	0,999
80	-0,867	1,000	-1,909	1,000	-1,492	1,000	-2,532	1,000	-0,978	0,996	-1,339	1,000
81	-	1,000	-0,638	1,000	-0,161	0,935	-0,656	1,000	-0,364	1,000	-0,673	1,000
82	-4,342	1,000	-1,193	1,000	-2,609	1,000	-4,685	1,000	-1,955	1,000	-3,315	1,000
83	-3,440	1,000	-3,527	1,000	-3,923	1,000	-4,617	1,000	-2,926	1,000	-4,914	1,000

84	0,158	0,912	-0,663	0,975	0,298	0,587	-0,145	0,771	0,102	0,910	-0,255	0,924
85	-1,763	1,000	-1,318	1,000	-1,747	1,000	-1,735	1,000	-0,382	1,000	-1,415	1,000
86	-	1,000	-	1,000	-0,746	1,000	-0,506	1,000	-	1,000	-0,510	1,000
87	-1,757	1,000	-0,988	1,000	-0,915	0,999	-1,158	1,000	-2,663	1,000	-0,355	1,000
88	-2,602	1,000	-3,101	1,000	-6,249	1,000	-3,040	1,000	-6,843	1,000	-4,335	1,000
89	-4,221	1,000	-4,296	1,000	-4,324	1,000	-4,326	1,000	-3,321	1,000	-6,222	1,000
90	0,435	0,444	0,119	0,592	-0,278	0,796	0,381	0,087	0,839	0,088	0,128	0,444
91	-0,867	1,000	-	0,650	-0,373	0,878	-0,254	0,851	0,280	0,460	0,637	0,039
92	-9,245	1,000	-9,729	1,000	-8,105	1,000	-7,645	1,000	-12,677	1,000	-7,919	1,000
93	-0,867	1,000	0,060	0,626	-0,887	0,996	-0,823	1,000	-0,279	1,000	-0,768	0,992
94	-3,903	1,000	-4,294	1,000	-6,622	1,000	-5,951	1,000	-4,748	1,000	-4,973	1,000
95	-4,577	1,000	-4,459	1,000	-3,584	1,000	-4,294	1,000	-3,998	1,000	-5,723	1,000
96	-1,171	0,962	-1,432	0,999	-0,995	0,995	-1,158	1,000	-0,135	0,761	-1,123	1,000
97	0,434	0,444	0,239	0,444	-0,187	1,000	-0,380	0,934	-0,559	1,000	0,128	0,461
98	-0,434	1,000	-0,954	0,993	-0,280	0,963	-1,013	1,000	-0,279	1,000	-0,956	1,000
99	-5,483	1,000	-4,929	1,000	-2,735	1,000	-5,315	1,000	-2,157	1,000	-3,541	1,000
100	-5,738	1,000	-6,364	1,000	-5,975	1,000	-5,171	1,000	-5,746	1,000	-4,344	1,000
101	1,698	0,206	0,125	0,526	-0,520	0,725	0,050	0,525	-1,522	0,884	-1,527	0,957
102	-1,153	1,000	-2,254	1,000	-0,987	1,000	-1,926	1,000	-1,302	1,000	-1,115	1,000
103	-2,728	1,000	-2,847	1,000	-2,892	1,000	-1,664	1,000	-1,900	1,000	-2,459	1,000
104	-0,866	1,000	-3,192	1,000	-2,334	1,000	-2,508	1,000	-2,220	1,000	-2,048	1,000
105	-0,867	1,000	-	1,000	-0,560	1,000	-0,127	1,000	-	1,000	-0,255	1,000
106	-2,602	1,000	-1,895	0,999	-2,609	1,000	-2,653	1,000	-1,390	0,997	-1,328	1,000
107	-0,958	1,000	-2,911	1,000	-2,175	1,000	-3,209	1,000	-2,776	1,000	-2,980	1,000
108	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
109	-0,434	1,000	-	1,000	-0,373	1,000	-0,253	1,000	-	1,000	-0,383	1,000
110	-2,168	1,000	-2,624	1,000	-0,933	1,000	-1,773	1,000	-1,396	1,000	-1,149	1,000
111	-0,346	0,762	-0,326	0,833	0,752	0,263	0,718	0,179	0,838	0,296	0,827	0,154
112	0,802	0,348	0,429	0,394	2,099	0,010	2,027	0,003	2,264	0,018	2,112	0,003

113	-0,076	0,698	-0,775	0,843	0,141	0,596	-0,022	0,641	0,159	0,627	-1,013	0,933
114	-3,431	1,000	-3,548	1,000	-2,609	1,000	-2,304	1,000	-2,923	1,000	-2,190	1,000
115	-0,434	1,000	-0,716	1,000	-0,280	0,963	-0,253	1,000	-	1,000	-0,510	1,000
116	-5,138	1,000	-3,890	1,000	-4,697	1,000	-3,771	1,000	-4,051	1,000	-2,390	1,000
117	-0,567	1,000	-0,319	1,000	-0,978	1,000	-0,164	1,000	-1,094	1,000	-0,336	1,000
118	-2,602	1,000	-1,909	1,000	-2,984	1,000	-2,659	1,000	-2,934	1,000	-3,315	1,000
119	3,179	0,098	2,337	0,070	2,336	0,031	-0,293	0,680	0,303	0,495	2,281	0,013
120	-2,842	1,000	-3,095	1,000	-3,187	1,000	-3,624	1,000	-2,563	1,000	-3,549	1,000
121	-3,211	1,000	-1,779	1,000	-3,108	1,000	-2,995	1,000	-3,648	1,000	-2,025	1,000
122	0,191	0,556	1,771	0,029	-0,974	0,897	0,536	0,267	0,674	0,330	-0,251	0,682
123	-3,817	1,000	-3,527	1,000	-4,500	1,000	-5,177	1,000	-8,355	1,000	-5,887	1,000
124	0,592	0,456	3,838	0,006	4,039	0,001	0,289	0,429	3,438	0,019	1,049	0,169
125	-4,817	0,991	-3,754	0,996	-6,381	1,000	-3,831	1,000	-5,795	0,999	-3,800	1,000
126	-3,931	0,999	-4,773	1,000	-5,194	1,000	-4,410	1,000	-3,631	1,000	-4,160	1,000
127	-3,546	1,000	-4,648	1,000	-1,993	1,000	-3,267	1,000	-2,848	1,000	-2,818	1,000
128	-1,518	0,996	-4,294	1,000	-3,544	1,000	-4,432	1,000	-4,050	1,000	-3,953	1,000
129	-1,301	1,000	-0,716	1,000	-1,119	1,000	-1,899	1,000	-0,978	0,996	-0,765	1,000
130	-2,273	1,000	-4,498	1,000	-3,183	1,000	-4,623	1,000	-2,927	1,000	-5,930	1,000
131	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
132	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	0,228	0,993	-	1,000
133	-8,673	1,000	-7,873	1,000	-9,326	1,000	-8,357	1,000	-9,636	1,000	-8,543	1,000
134	-1,088	0,955	-5,490	1,000	-3,266	1,000	-2,975	1,000	-4,887	1,000	-3,475	1,000
135	-1,147	0,895	-1,312	0,959	0,067	0,563	-1,382	0,992	-3,263	1,000	-1,389	0,997
136	-0,906	0,898	-3,527	1,000	-2,868	1,000	-4,203	1,000	-4,510	1,000	-3,554	1,000
137	-0,690	0,947	-2,177	1,000	-3,142	1,000	-2,988	1,000	-2,205	1,000	-3,620	1,000
138	-3,314	1,000	-1,442	0,993	-0,666	0,996	-1,158	1,000	-0,382	1,000	-0,600	0,983
139	-1,135	1,000	-1,277	1,000	-1,629	1,000	-0,378	0,983	-2,192	1,000	-1,627	1,000
140	-4,770	1,000	-7,285	1,000	-4,850	1,000	-5,450	1,000	-7,820	1,000	-5,929	1,000
141	-1,455	0,988	-1,295	1,000	-1,227	0,999	-1,651	1,000	-1,375	0,999	-1,501	1,000

142	-0,867	1,000	-0,239	1,000	-0,187	1,000	-0,380	1,000	-0,279	1,000	-0,255	1,000
143	-0,644	1,000	-1,778	1,000	-0,267	1,000	-0,838	1,000	-0,813	1,000	-0,483	0,969
144	-0,373	0,935	-0,638	1,000	-1,467	1,000	-1,477	1,000	-0,729	1,000	-1,346	1,000
145	-1,518	0,996	-2,863	1,000	-2,798	1,000	-2,532	1,000	-2,793	1,000	-2,550	1,000
146	0,272	0,685	-	1,000	-0,501	1,000	-1,041	1,000	-1,140	1,000	-1,158	1,000
147	-1,708	1,000	-1,918	1,000	-1,467	1,000	-1,148	1,000	-3,289	1,000	-1,009	1,000
148	-1,758	1,000	-1,497	0,999	-0,628	0,989	-1,054	0,999	-3,418	1,000	-1,856	1,000
149	-0,425	0,884	-2,147	1,000	-2,330	1,000	-1,646	1,000	-2,091	1,000	-2,168	1,000
150	-2,819	1,000	-2,028	1,000	-2,145	1,000	-2,089	1,000	-0,984	0,996	-2,933	1,000
151	2,213	0,046	1,586	0,016	-1,237	0,996	-0,390	0,916	-1,716	0,992	-1,096	0,998
152	-0,785	0,949	-1,652	1,000	-0,915	0,999	-1,276	1,000	-1,523	1,000	-2,061	1,000
153	-6,287	1,000	-5,010	1,000	-3,544	1,000	-4,368	1,000	-3,072	1,000	-4,845	1,000
154	0,581	0,980	0,080	1,000	-8,033	0,990	-13,435	1,000	-14,188	1,000	-16,385	1,000
155	-1,703	1,000	-0,852	0,996	-0,978	1,000	-0,870	1,000	-0,239	0,935	-2,131	1,000
156	-1,905	0,958	-0,540	0,801	-0,497	0,803	0,072	0,546	-1,998	0,985	-2,162	1,000
157	-2,714	0,996	-2,304	0,999	-1,900	0,999	-1,848	1,000	-0,639	0,930	-2,527	1,000
158	-1,154	1,000	-0,650	1,000	-1,111	1,000	-1,010	1,000	-0,343	0,916	-0,934	1,000
159	-0,493	1,000	-2,175	1,000	-1,251	1,000	-1,263	1,000	-1,575	1,000	-1,291	1,000
160	-1,539	0,970	-0,968	0,945	0,123	0,554	-0,500	0,896	-0,119	0,752	-1,460	0,997
161	-2,826	1,000	-2,229	1,000	-1,916	1,000	-2,649	1,000	-1,811	1,000	-2,334	1,000
162	-1,250	0,976	-	1,000	-1,302	0,998	-1,267	1,000	-	1,000	-0,902	1,000
163	0,043	0,604	-3,005	1,000	-1,556	0,970	-0,873	0,919	-1,794	0,985	-2,183	1,000
164	-5,480	1,000	-5,280	1,000	-7,671	1,000	-5,813	1,000	-7,740	1,000	-6,181	1,000
165	-3,069	1,000	-1,568	0,999	0,167	0,493	-1,942	1,000	-0,162	0,722	-0,783	0,987
166	-1,955	0,995	-1,468	1,000	-1,674	1,000	-1,344	1,000	-2,778	1,000	-2,985	1,000
167	-0,372	0,935	-0,841	0,919	-1,122	0,988	-1,773	1,000	-1,195	0,978	-1,619	1,000
168	-3,661	1,000	-3,286	1,000	-2,506	1,000	-3,403	1,000	-4,434	1,000	-3,940	1,000
169	-2,602	1,000	-1,193	1,000	-1,026	1,000	-2,026	1,000	-0,838	1,000	-1,594	1,000
170	-1,764	1,000	-3,938	1,000	-4,371	1,000	-4,154	1,000	-2,914	1,000	-3,867	1,000

171	-1,135	1,000	-1,703	1,000	-1,289	0,997	-1,468	1,000	-1,438	0,995	-2,738	1,000
172	-2,806	1,000	-0,827	0,996	-2,037	1,000	-1,506	1,000	-3,031	1,000	-2,342	1,000
173	-2,645	0,996	-1,849	0,998	-4,424	1,000	-3,474	1,000	-3,624	1,000	-2,960	1,000
174	-	1,000	-0,239	1,000	0,093	0,667	-0,633	1,000	-	1,000	-0,255	1,000
175	0,434	0,444	-0,477	1,000	-0,560	1,000	-0,317	0,988	-0,698	0,988	-0,191	0,963
176	-0,429	0,888	-1,310	1,000	-0,931	0,997	-0,941	0,999	-0,141	0,791	-1,909	1,000
177	-0,589	1,000	-1,645	1,000	-1,000	1,000	-1,224	1,000	-1,348	0,997	-1,942	1,000
178	0,145	1,000	-	1,000	0,125	0,997	-	1,000	0,093	0,998	-	1,000
179	-	1,000	-0,239	1,000	-0,187	1,000	-0,253	1,000	-0,838	1,000	-0,191	0,963
180	-2,168	1,000	-1,555	1,000	-2,798	1,000	-1,266	1,000	-1,115	0,993	-1,275	1,000
181	-1,612	0,967	-1,004	0,983	-1,553	0,990	-0,823	0,971	-0,787	0,887	-0,594	0,960
182	-8,047	1,000	-6,791	1,000	-8,138	1,000	-7,152	1,000	-6,804	1,000	-7,565	1,000
183	-0,645	1,000	-0,712	1,000	-0,267	1,000	-0,360	1,000	0,121	0,770	-	1,000
184	-	1,000	-	1,000	-0,244	1,000	-	1,000	-	1,000	-0,168	1,000
185	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
186	-5,240	1,000	-3,284	1,000	-4,224	1,000	-2,924	1,000	-5,040	1,000	-1,942	1,000
187	-	1,000	0,119	0,691	0,373	0,227	-0,015	0,772	-0,373	0,860	0,127	0,480
188	0,400	0,557	0,879	0,100	0,520	0,167	0,643	0,041	-	1,000	0,118	0,564
189	-	1,000	-0,239	1,000	-	1,000	-	1,000	0,140	0,667	-	1,000
190	-0,434	1,000	-	1,000	-	1,000	-0,253	1,000	-0,279	1,000	-0,128	1,000
191	-	1,000	-0,259	1,000	-	1,000	-0,074	0,903	-	1,000	0,062	0,688
192	-0,434	1,000	-0,954	1,000	-1,119	1,000	-1,519	1,000	-0,559	1,000	-1,913	1,000
193	-3,684	1,000	-3,606	1,000	-4,577	1,000	-3,160	1,000	-3,670	0,999	-3,424	1,000
194	-	1,000	-1,541	0,999	-2,835	1,000	-1,251	1,000	-1,623	1,000	-1,475	1,000
195	-	1,000	0,318	0,422	0,006	0,730	0,571	0,050	0,012	0,728	0,285	0,230
196	-0,217	0,889	-0,239	1,000	0,187	0,444	-	1,000	0,140	0,667	0,064	0,667
197	-3,469	1,000	-1,670	1,000	-1,865	1,000	-2,152	1,000	-1,955	1,000	-3,188	1,000
198	-0,393	0,938	-0,448	0,952	-1,081	0,999	-0,755	0,999	-1,145	1,000	-0,890	0,999
199	-0,958	1,000	-0,267	1,000	-0,622	1,000	-1,394	1,000	-1,237	1,000	-0,859	1,000

200	-	1,000	-0,665	0,975	-	1,000	0,093	0,826	0,204	0,829	0,094	0,822
201	4,004	0,008	4,432	-	3,957	-	2,880	-	4,171	-	3,053	-
202	-1,289	1,000	-3,544	1,000	-1,782	1,000	-1,440	1,000	-3,523	1,000	-2,026	1,000
203	-1,020	0,936	-2,622	0,995	0,745	0,388	-0,144	0,842	1,019	0,404	-1,148	0,975
204	0,159	0,911	0,088	0,905	0,204	0,765	0,327	0,487	0,103	0,907	0,188	0,671
205	0,881	0,259	0,120	0,592	0,187	0,444	-0,190	0,855	-	0,740	0,319	0,195
206	2,866	0,005	2,102	0,006	2,266	-	2,273	-	2,852	-	2,343	-
207	-0,644	1,000	-0,909	0,969	-0,904	0,997	-0,930	0,996	-2,067	0,999	-1,970	1,000
208	0,805	0,587	-0,637	0,860	-0,784	0,895	1,180	0,084	1,262	0,234	-0,652	0,896
209	-0,312	0,899	-0,992	1,000	-1,748	1,000	-1,216	1,000	-1,525	1,000	-1,237	1,000
210	-1,301	1,000	-1,909	1,000	-2,612	1,000	-0,886	1,000	-1,815	1,000	-0,893	1,000
211	1,237	0,225	1,109	0,132	2,004	0,001	1,716	0,001	-0,215	0,725	0,663	0,168
212	-0,589	1,000	-0,118	0,762	0,515	0,234	0,226	0,373	-0,511	0,950	-0,195	0,761
213	-5,622	1,000	-5,084	1,000	-6,063	1,000	-4,678	1,000	-5,533	1,000	-5,132	1,000
214	-2,350	1,000	-0,331	1,000	-2,246	1,000	-2,169	1,000	-1,146	1,000	-2,288	1,000
215	-0,375	0,824	-1,646	0,994	-1,232	0,993	-0,516	0,920	-1,385	0,958	-1,239	0,992
216	1,351	0,152	-0,073	0,730	0,346	0,372	-0,293	0,880	0,319	0,499	0,419	0,317
217	-0,938	1,000	-1,809	1,000	-0,622	0,987	-0,627	0,994	-0,905	1,000	-0,136	1,000
218	2,577	0,009	2,240	0,001	1,763	0,001	2,196	-	1,096	0,083	1,761	-
219	1,000	0,232	0,108	0,602	-0,643	0,938	-0,396	0,889	-0,248	0,827	-0,001	0,619
220	0,572	0,405	1,572	0,017	0,283	0,412	0,156	0,460	0,175	0,542	0,874	0,046
221	-0,589	1,000	0,444	0,329	0,716	0,096	0,402	0,149	0,176	0,685	0,080	0,688
222	0,403	0,522	0,529	0,302	-0,149	0,765	-0,035	0,666	0,146	0,585	-0,494	0,899
223	-	1,000	-0,532	0,985	-0,733	1,000	-0,656	1,000	-0,729	1,000	-0,336	1,000
224	0,248	0,585	-	1,000	-	1,000	0,072	0,585	0,319	0,342	0,145	0,344
225	-1,735	1,000	-1,193	1,000	-0,560	1,000	-1,203	1,000	-1,117	1,000	-0,893	1,000
226	-	1,000	-	1,000	-	1,000	0,063	0,721	-	1,000	-	1,000
227	0,646	0,421	0,950	0,100	0,836	0,068	0,757	0,027	1,244	0,072	0,572	0,070
228	-1,658	1,000	-1,133	1,000	-1,601	1,000	-1,301	1,000	-2,117	1,000	-2,435	1,000

229	-	1,000	0,102	0,777	-	1,000	0,055	0,766	0,241	0,595	-	1,000
230	1,118	0,218	1,434	0,029	1,298	0,014	1,544	0,001	1,811	0,020	1,767	-
231	0,433	0,475	-0,296	0,910	0,559	0,109	0,190	0,329	0,279	0,476	0,191	0,333
232	-2,814	0,998	-3,531	1,000	-2,762	1,000	-2,412	1,000	-2,054	0,990	-3,370	1,000
233	-2,602	1,000	-2,624	1,000	-2,425	1,000	-2,912	1,000	-3,910	1,000	-3,126	1,000
234	1,307	0,179	-0,564	0,844	0,744	0,170	0,952	0,027	1,948	0,010	0,841	0,083
235	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
236	-1,178	1,000	-0,331	1,000	-0,500	1,000	-0,867	1,000	-0,382	1,000	-0,648	0,999
237	-	1,000	-	1,000	-0,187	1,000	-0,127	1,000	-	1,000	-	1,000
238	-	1,000	-	1,000	0,047	0,667	-0,506	1,000	-	1,000	-0,128	1,000
239	-1,735	1,000	-	1,000	-	1,000	-0,760	1,000	0,140	0,667	-0,510	1,000
240	-4,774	1,000	-3,283	1,000	-3,812	1,000	-8,430	1,000	-6,555	1,000	-6,578	1,000
241	-11,492	1,000	-9,389	1,000	-9,155	1,000	-8,123	1,000	-9,748	1,000	-8,865	1,000
242	-4,297	1,000	-4,013	1,000	-4,807	1,000	-4,797	1,000	-5,541	1,000	-3,581	1,000
243	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	0,229	0,996	-	1,000
244	-	1,000	-	1,000	0,087	0,743	0,058	0,749	-	1,000	-	1,000
245	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-0,127	1,000	-	1,000	-	1,000
246	-	1,000	-	1,000	-0,250	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
247	-	1,000	-0,477	1,000	-1,306	1,000	-0,443	0,996	-1,676	1,000	-1,658	1,000
248	-	1,000	-0,716	1,000	-0,093	0,889	-0,886	1,000	-0,698	0,988	-0,574	0,999
249	-0,219	0,890	-0,239	1,000	-0,280	0,963	-0,506	1,000	-0,559	1,000	-0,446	0,996
250	-1,735	1,000	-1,909	1,000	-0,374	0,912	-2,786	1,000	-1,676	1,000	-1,785	1,000
251	-	1,000	-	1,000	-0,656	0,993	-0,410	0,991	0,102	0,908	-1,599	1,000
252	-3,521	1,000	-2,300	1,000	-1,877	1,000	-4,299	1,000	-2,280	1,000	-3,775	1,000
253	-2,070	0,989	-1,382	0,983	-2,845	1,000	-3,080	1,000	-2,942	1,000	-3,241	1,000
254	-0,162	0,745	-1,491	0,997	-2,341	1,000	-3,528	1,000	-1,910	0,991	-2,743	1,000
255	0,972	0,227	0,638	0,175	0,759	0,118	0,365	0,276	0,508	0,342	0,064	0,590
256	-1,994	0,935	-1,365	0,917	-0,894	0,863	-1,652	0,982	-0,673	0,774	-1,647	0,980
257	-3,142	1,000	-1,660	1,000	-0,656	0,993	-5,774	1,000	-1,026	1,000	-	1,000

258	-1,173	1,000	-0,331	1,000	-1,412	1,000	-1,389	1,000	-0,382	1,000	-1,062	1,000
259	-0,217	0,889	-1,431	1,000	-0,560	1,000	-0,446	0,981	-0,838	1,000	-0,577	0,992
260	-2,168	1,000	-2,624	1,000	-2,238	1,000	-2,504	1,000	-2,100	1,000	-2,361	1,000
261	-	1,000	-0,716	1,000	-0,373	1,000	-0,127	1,000	-0,559	1,000	-0,383	1,000
262	-3,336	1,000	-1,845	1,000	-3,054	1,000	-2,924	1,000	-2,466	1,000	-1,571	1,000
263	-1,905	1,000	-2,914	1,000	-2,884	1,000	-2,786	1,000	-1,235	1,000	-3,198	1,000
264	-1,177	1,000	-1,653	1,000	-0,501	1,000	-0,522	1,000	-2,288	1,000	-2,463	1,000
265	1,084	0,132	1,312	0,044	1,865	0,004	0,886	0,072	1,396	0,039	0,956	0,020
266	-7,581	1,000	-5,360	1,000	-6,055	1,000	-5,739	1,000	-5,762	1,000	-6,819	1,000
267	-2,829	1,000	-3,524	1,000	-1,740	1,000	-3,029	1,000	-3,319	1,000	-3,173	1,000
268	-0,993	0,966	0,174	0,531	-0,731	0,986	-0,111	0,761	-0,031	0,772	-0,422	0,987
269	-0,998	0,946	-0,714	0,881	-2,213	1,000	-1,918	1,000	-1,164	0,989	-2,581	1,000
270	-1,896	0,995	-0,650	0,891	-2,935	1,000	-1,732	1,000	-1,335	0,999	-3,036	1,000
271	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-	1,000
272	-0,645	0,961	-0,716	1,000	-0,933	1,000	-0,380	1,000	-0,838	1,000	-0,383	1,000
273	-	1,000	-	1,000	-0,164	0,934	-0,057	0,842	-	1,000	-0,177	1,000
274	-0,493	1,000	-0,813	1,000	-0,491	0,977	-0,329	0,976	-1,259	1,000	-0,573	1,000
275	0,145	0,998	0,080	1,000	0,249	0,993	0,127	0,990	0,093	0,999	0,043	0,999
276	-	1,000	-	1,000	-	1,000	-0,063	0,889	-0,140	0,889	-	1,000
277	-0,434	1,000	-1,193	1,000	-0,653	0,996	-0,190	0,963	-1,258	0,999	-1,913	1,000
278	-	1,000	0,105	0,634	-0,238	0,891	0,341	0,167	0,751	0,169	0,117	0,526
279	0,388	0,554	0,318	0,422	0,334	0,308	0,856	0,011	0,125	0,744	0,627	0,040
280	-	1,000	-	1,000	0,180	0,534	-	1,000	-	1,000	0,185	0,391
281	0,431	0,449	0,119	0,667	0,371	0,202	0,378	0,090	0,413	0,309	0,443	0,061
282	-	1,000	-	1,000	-0,373	1,000	-0,190	0,963	-	1,000	-0,255	1,000
283	0,979	0,219	1,818	0,007	0,764	0,115	0,913	0,008	2,266	0,004	1,202	0,002
284	0,651	0,325	0,597	0,157	0,933	0,024	0,429	0,134	-	1,000	0,638	0,025
285	-	1,000	-	1,000	0,398	0,227	0,091	0,606	-	1,000	-	1,000
286	0,582	0,413	0,530	0,238	0,667	0,095	0,455	0,092	0,125	0,744	0,910	0,009

287	-2,474	1,000	-0,813	1,000	-0,741	0,997	-0,981	1,000	-1,260	1,000	-1,582	1,000
288	-	1,000	0,212	0,563	0,173	0,523	0,512	0,069	0,500	0,307	0,287	0,293

Legenda: Diferença entre mutações não-sinônimas (dN) e sinônimas (dS) nos códons da integrase do HIV-1 das sequências do Brasil (BR-PRE: 1990-2008; BR-POS: 2009-2019), Estados Unidos (US-PRE: 1978-2005; US-POS: 2006-2019) e União Europeia (EURO-PRE: 1986-2007; EURO-POS: 2008-2019), com $p < 0,05$. **Fonte:** O autor (2022).