

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARTA IGLIS DE OLIVEIRA

PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 NA PRIMEIRA
FALHA VIROLÓGICA À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EM
PACIENTES ATENDIDOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO
RECIFE ENTRE 2006 E 2016

Recife
2018

MARTA IGLIS DE OLIVEIRA

**PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 NA PRIMEIRA
FALHA VIROLÓGICA À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EM PACIENTES
ATENDIDOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE ENTRE 2006 E 2016**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Linha de pesquisa: Etiopatogenia, Diagnóstico e Tratamento de Doenças

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Coorientadora: Profa. Dra. Claudia Fernanda de Lacerda Vidal

Recife

2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

O48p

Oliveira, Marta Iglis de.

Perfil genotípico do HIV-1 na primeira falha virológica à terapia antirretroviral em pacientes atendidos na região metropolitana do Recife entre 2006 e 2016 / Marta Iglis de Oliveira.– 2018.

105 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Paulo Sérgio Ramos de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Diversidade genética. 2. Subtipos. 3. HIV. 4. Resistência. 5. Protease. I. Araújo, Paulo Sérgio Ramos de (Orientador). II. Título.

610 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2018-313)

MARTA IGLIS DE OLIVEIRA

**PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 NA PRIMEIRA
FALHA VIROLÓGICA À TERAPIA ANTIRRETROVIRAL EM PACIENTES
ATENDIDOS NA REGIÃO METROPOLITANA DO RECIFE ENTRE 2006 E 2016**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 02 de março de 2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Heloísa Ramos Lacerda de Melo (1º Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcelo Renato Guerino (2º Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Anchieta de Brito (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico a todas as pessoas que viveram e
vivem com HIV.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Iracema e Manoel, que me proporcionaram a oportunidade que eles não acessaram, estudar. São meu exemplo de superação, resiliência e humildade.

Aos meus irmãos, Myrtes e Marcelo, a amizade e o acolhimento, a compreensão nos momentos de ausência durante o processo de construção desta pesquisa.

À Rosana, o cuidado e o carinho diário, sempre trazendo incentivo e tranquilidade, agradeço todo o conhecimento compartilhado.

Aos amigos e amigas, em especial, àquelas que estiveram muito próximos nesta etapa da minha história: Katarina e Danielle. Aos colegas da turma 2016.1 do Programa de Pós-Graduação do CCS-UFPE, em especial a Íris e a Gustavo.

À equipe da Clínica Médica do CMH-PMPE, o apoio e a compreensão nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sérgio, a acessibilidade, disponibilidade, o carinho com que conduziu este trabalho.

À Dra Cláudia Vidal, a forma extremamente carinhosa com que me recebeu em todas as reuniões, e todas as críticas construtivas.

À Profa. Dra Heloísa Ramos, a contribuição essencial em todas as etapas desta caminhada.

À Dra. Vera Magalhães, a contribuição na construção da minha afinidade pela infectologia.

À Dra Aletheia, todas as sugestões para a pesquisa alcançar sua melhor forma.

A todo o grupo da enfermaria da DIP do Hospital das Clínicas, Dr. Carlos Eduardo, Dra. Luciana Cardoso e Dr. Evônio Campelo, agradeço o conhecimento e a experiência compartilhados diariamente.

À equipe ambulatorial da DIP do Hospital das Clínicas, Rosângela, Roque, Cleuma e Yane, sem os quais, não teria sido possível a coleta de parte dos dados utilizados para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos funcionários da Policlínica Lessa de Andrade e do Hospital Correia Picanço, a contribuição na coleta das informações e o acolhimento.

A todos os facilitadores do CEBB, que ajudaram a transformar minha visão de mundo, a sentar e silenciar no turbilhão da vida, e a aceitar acolhendo tudo que a vida nos oferece. Mostraram-me o poder da Gratidão e da Compaixão.

Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.

(DALAI LAMA, 2011)

RESUMO

Com o surgimento dos antirretrovirais (ARVs), ocorreu uma significativa diminuição na morbidade, mortalidade e risco de transmissão. Mais da metade das pessoas vivendo com HIV (PVHIV) estão em tratamento. No entanto, a relevância desse dado na saúde global tem sido ameaçada pelo aumento da prevalência de mutações associada à resistência (MAR). Considerando a diversidade genética e a necessidade de monitorar o movimento do vírus nas diferentes regiões do mundo, foi realizado este estudo para atualizar dados do perfil genotípico do HIV-1 em pacientes na primeira falha virológica (FV) e a resposta ao esquema de resgate após 48 semanas da troca na cidade do Recife, Pernambuco. Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo, analítico, elaborado por meio da coleta de dados em prontuários e em exames de genotipagem realizada entre 2006 e 2016. A amostra foi constituída por dados de pessoas vivendo com HIV (PVHIV) de três grandes centros de referência. Após a avaliação de 534 prontuários, foram incluídos 184 pacientes na análise dos dados. No tempo da coleta do teste de genotipagem, os esquemas mais frequentes foram baseados em Zidovudina/Lamivudina (68,5%) e em Efavirenz (87,1%). O subtipo viral B foi o mais comum (81,3%), bem como MAR M184V/I (85,3%) e mutações no códon K103 (65,8%). Após 48 semanas da troca para esquema resgate, alcançaram carga viral indetectável 67,3%. O número de MAR a inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleos(t)ídeos (ITRN(t)) não impactou na supressão virológica (9,3% para zero MAR ITRN(t) vs 48,6% para 1<3 MAR ITRN(t) vs 42,1% para 3 MAR ITRN(t) $p=0,179$). Após análise multivariada, constatou-se que estar com mais de 36 meses em ARV foi fator protetor para carga viral detectável (RP=0,6, IC 95%=0,39 – 0,92, $p=0,02$) e fator de risco para desenvolver ≥ 3 MAR ITRN(t) (RP=2,43, IC95% 1,38-4,28, $p=0,002$). A extensa resistência aos ITRN(t)s na primeira FV, não impactou na supressão virológica após 48 semanas da troca para esquema resgate baseado em ITRN(t)s com inibidores de protease.

Palavras-chave: Diversidade genética. Subtipos. HIV. Resistência. Protease. Integrase.

ABSTRACT

With the advent of Antiretroviral Therapy (ART), there was a significant decrease in morbidity, mortality, and risk of transmission. More than half of People Living with HIV (PLHIV) has been treated. Nevertheless, the relevance of this data in global health was threatened by the increased prevalence of Mutations Associated Resistance (MAR), which is an obstacle to viral suppression and disease control. Regarding the genetic diversity and the need to monitor the movement of the virus in the different regions of the world, this study was carried out to update data from the genotypic profile of HIV-1 in patients in the first Virological Failure (VF) and their response to the second line regimen after 48 weeks of the exchange in Recife, Brazil. The last work with patients experienced in this state was published in 2007. This is a cross-sectional, retrospective, analytical study based on the collection of data in medical records and genotype exams conducted between 2006 and 2016. It was developed in three large reference hospitals in the treatment of PLHIV. After the evaluation of 534 records, 184 patients were included in the data analysis. At the time of the genotyping test, the most frequent regimens were based on Zidovudine/lamivudine (68.5%), and on Efavirenz (87.1%). The viral subtype B was the most common (81.3%), as well as MAR M184V / I (85.3%) and mutations in the K103 codon (65.8%). After 48 weeks of the exchange for rescue scheme, 67.3% reached an undetectable viral load. The number of Nucleos(t)ide Reverse Transcriptase Inhibitor ((t)NRTI) MAR did not affect virological suppression (9.3% for zero MAR NRTI vs 48.6% for 1 <3 MAR (t)NRTI vs 42.1% for ≥ 3 MAR (t)NRTI $p = 0.179$). After multivariate analysis, the time in ARV >36 months to genotyping was a protector factor for the detectable viral load (RP 0,6, IC 95%=0,39 – 0,92, $p = 0,02$) and risk factor for developing ≥3 MAR ITRN(t) (RP=2,43, IC95% 1,38-4,28, $p=0,002$). Extensive resistance was found to NRTIs in the first VF. However, it did not affect the virological suppression after 48 weeks of the change to the rescue scheme based on (t)NRTI + protease inhibitor.

Keywords: Genetical diversity. Subtypes. Resistance to drugs. Reverse transcriptase. Protease. Integrases.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características genotípica, imunoviológica e de ARV no tempo da genotipagem em 184 indivíduos na primeira falha virológica	48
Tabela 2 –	Fatores associados ao número de MAR ITRN(t)s na primeira falha virológica.....	49
Tabela 3 –	Modelo de Poisson para ≥ 3 MAR ITRN(t).....	50
Tabela 4 –	Características genotípicas e imunoviológicas no momento da genotipagem associadas à supressão virológica após 48 semanas do início do esquema resgate	54
Tabela 5 –	Características relacionadas com o esquema regaste, tempo em ARV e tempo em falha virológica associadas à supressão virológica após 48 semanas do início do esquema de resgate	55
Tabela 6 –	Modelo de Poisson para carga viral detectável após 48 semanas do início do esquema resgate.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Prevalência de ITRN(t) em 184 testes de genotipagem.....	51
Gráfico 2 – Prevalência de MAR ITRNN em 184 testes de genotipagem.....	52
Gráfico 3 – Prevalência de MAR ETR em 184 testes de genotipagem.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Abacavir
ARV (s)	Antirretroviral (s)
AZT	Zidovudina
BNV	Baixo nível de viremia
CCR5	Correceptor 5 de quimiocina CC
CD4	Células T CD4
CPI	Complexo pré-integração
CRFs	Formas recombinantes circulantes
CV	Carga viral
DHHS	Department of Health and Human Services
DIP	Doença infecto-parasitária
DRV/r	Darunavir com ritonavir
DTG	Dolutegravir
EFda	4'-etnil-2-fluoro-2'-deoxiadenosine
EFV	Efavirenz
ETR	Etravirina
EUA	Estados Unidos da América
EVG	Elvitegravir
FDA	Food Drug Administration
FPV/r	Fosamprenavir com ritonavir
FTC	Emtricitabina
FV	Falha virológica
gp	Glicoproteína
GSS	Escore de sensibilidade genotípica
HC	Hospital das Clínicas
HCP	Hospital Correia Picanço
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
INI	Inibidor de integrase
IP/r	Inibidor de protease com ritonavir
ITRN(t)	Inibidor da transcriptase reversa análogo núcleos(t)ídeo
ITRNN	Inibidor da transcriptase reversa não análogo de núcleos(t)ídeo

LACEN-PE	Laboratório Central de Pernambuco
LPV/r	Lopinavir com ritonavir
MAR	Mutação associada à resistência
MRV	Maraviroc
NVP	Nevirapina
OMS	Organização Mundial da Saúde
PLA	Policlínica Lessa de Andrade
PR	Protease
PVHIV	Pessoas vivendo com HIV
RAL	Raltegravir
RENAGENO	Rede Nacional de Genotipagem
RPV	Rilpivirina
SISCEL	Sistema de Controle de Exames Laboratoriais
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia
TAM(s)	Mutação análoga timidínica(s)
TDF	Tenofovir
TDR	Resistência à droga transmitida
TPV/r	Tipranavir com ritonavir
TR	Transcriptase reversa
3TC	Lamivudina
UNAIDS	Joint United Nations Programme on HIV/AIDS/ Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Estrutura, organização genômica e replicação do HIV-1.....	18
2.2	Origem e diversidade genética do HIV.....	18
2.3	Terapia antirretroviral.....	20
2.4	Falha virológica (FV).....	21
2.5	Consequência da viremia persistente.....	22
2.6	Resistência viral.....	24
2.6.1	Bases biológicas da resistência à droga.....	24
2.6.2	Resistência transmitida.....	24
2.6.3	Resistência adquirida.....	25
2.6.3.1	<i>Resistência aos ITRN(t)s.....</i>	<i>25</i>
2.6.3.2	<i>Resistência aos ITRNNs.....</i>	<i>26</i>
2.6.3.3	<i>Resistência aos Ips.....</i>	<i>27</i>
2.6.3.4	<i>Resistência aos INIs.....</i>	<i>28</i>
2.6.3.5	<i>Resistência aos inibidores de entrada.....</i>	<i>29</i>
2.6.3.5.1	Resistência ao antagonista de CCR5.....	29
2.6.3.5.2	Resistência aos inibidores de fusão.....	30
2.7	Resgate terapêutico.....	30
2.7.1	Após primeira falha virológica à Terapia antirretroviral (TARV) baseada em ITRNN.....	30
2.7.2	Após primeira falha virológica da TARV baseada em IP/r.....	32
2.8	Testes de resistência viral.....	34
2.8.1	Testes de Fenotipagem para o HIV-1.....	34
2.8.2	Testes de Resistência Genotípica para HIV-1.....	35
2.9	Novas perspectivas.....	35
3	JUSTIFICATIVA.....	37
4	HIPÓTESE.....	38
4.1	Pergunta condutora.....	38
5	OBJETIVOS.....	39
5.1	Objetivo geral.....	39

5.2	Objetivos específicos	39
6	MATERIAIS E MÉTODO	40
6.1	Delineamento do estudo	40
6.2	Local do estudo	40
6.3	População do estudo	40
6.4	Definição e categorização das variáveis	41
6.4.1	Definição de variáveis.....	41
6.4.1.1	<i>Falha virológica</i>	41
6.4.1.2	<i>Vias mutacionais</i>	41
6.4.1.3	<i>Sensibilidade dos antirretrovirais</i>	42
6.4.1.4	<i>Subtipo viral</i>	42
6.4.1.5	<i>Escore de sensibilidade genotípica (GSS)</i>	42
6.4.2	Categorização das variáveis.....	42
6.5	Operacionalização da pesquisa	44
6.5.1	Coleta dos dados.....	44
6.5.2	O teste de genotipagem.....	45
6.6	Análise estatística	46
6.7	Considerações éticas	46
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7.1	Resultados	47
7.1.1	Fatores associados às características genotípicas, imunoviológicas e de ARV no tempo da genotipagem.....	47
7.1.2	Caraterísticas da terapia de resgate.....	52
7.1.3	Fatores preditores de carga viral indetectável e variação de CD4 após 48 semanas do início do esquema resgate.....	53
7.2	Discussão	56
8	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
8.1	Conclusões	62
8.2	Considerações finais	62
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE A – FICHA DE COLETA DOS DADOS	78
	APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL	80
	ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	104

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos trinta anos, mais de 35 milhões de mortes foram atribuídas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) até o fim de 2016 conforme a World Health Organization (WHO, 2017a). Com o surgimento dos antirretrovirais (ARVs), ocorreu uma significativa diminuição na morbidade, mortalidade e risco de transmissão (RODGER et al., 2016; SMART STUDY GROUP, 2006). Mais da metade das pessoas vivendo com HIV (PVHIV) estão em tratamento (WHO, 2017a). No entanto, a relevância desse dado na saúde global tem sido ameaçada pelo aumento da prevalência de resistência à droga, que subiu de 11% para 29% desde 2001 (WHO, 2017b). Dos indivíduos em tratamento, 20% precisarão trocar o esquema ARV devido à falha virológica (FV). Assim, resistência à droga é um obstáculo real à supressão viral e controle da doença (CAMPBELL; SMEATON; KUMARASAMY, 2012).

No Brasil, cerca de 60% das PVHIV recebem antirretrovirais (ARVs) pelo programa do Ministério da Saúde do Brasil conforme o Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS, 2016). De 2004 a 2017, os esquemas de primeira linha no país basearam-se em regimes com efavirenz (EFV), um inibidor da transcriptase reversa não análogo nucleosídeo (ITRNN). Em 2013, o tenofovir (TDF), passou a ser o inibidor da transcriptase reversa análogo de nucleos(t)ídeo (ITRN(t)) de preferência, em dose única combinado com lamivudina (3TC) e EFV (BRASIL, 2013). No início de 2017, o dolutegravir (DTG), inibidor de integrase (INI), administrado com TDF/3TC, passou a compor a primeira linha da terapia (BRASIL, 2017).

Dados genotípicos e imunoviológicos de pacientes na primeira FV são escassos no Brasil, limitados a determinadas regiões do país. Um estudo recente na cidade de São Paulo com pacientes falhando à primeira linha da terapia, entre 2013 e 2015, constatou maior prevalência da mutação associada à resistência (MAR) M184V/I (74,3%) e códon K103 (56,7%), semelhante ao encontrado em outros estados brasileiros (BRITES et al., 2016; MATSUDA et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que o maior número de MAR na Transcriptase reversa (TR) foi associado à menor contagem de células CD4 e ao uso de TDF na primeira linha. Entre os 205 que iniciaram segunda linha, 76,6% alcançaram supressão virológica (<200 cópias/ml), apesar de extensa resistência aos ITRN(t)s (MATSUDA et al., 2017).

Dados brasileiros de 2002 a 2012 de pacientes falhando à terapia antirretroviral mostraram um aumento da resistência a ITRNN, relacionada com MAR K103N, semelhante a estudos africanos e asiáticos (DUANI; ALEIXO; TUPINAMBÁS, 2017; HAMERS et al., 2012; SIVAMALAR et al., 2017;). Em contraste, relatos nos Estados Unidos e na França indicam diminuição da prevalência de resistência ao longo da última década (ASSOUMOU et al., 2017; MILLER et al., 2012). O impacto de MAR após FV com ITRN(t)s+ITRNN foi avaliado nos três estudos *SECOND-LINE*; *EARNEST*; *SELECT*, e recentemente reavaliado em metanálise, evidenciando o sucesso de esquemas de resgate baseado em ITRN(t)s associados a inibidores de protease combinado com ritonavir (IP/r) (AMIN et al., 2015; KANTERS et al., 2017; LA ROSA et al., 2016; PATON et al., 2014).

Não há dados recentes de MAR em PVHIV na cidade do Recife, Pernambuco. O trabalho mais recente com pacientes experimentados neste estado brasileiro foi publicado em 2007, cujos resultados apontaram para maior prevalência da M184V para ITRN(t), K103N para ITRNN, e mutações secundárias nos códons 90, 82 e 30 para Inibidores de protease (IPs), mas não avaliou o impacto no esquema resgate (CAVALCANTI et al., 2007). Esta pesquisa analisou o perfil genotípico do HIV-1 em pacientes na primeira falha virológica e a resposta ao esquema resgate após 48 semanas da troca.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura, organização genômica e replicação do HIV-1

O HIV pertence à família *Retroviridae* e ao Gênero *Lentivirus*. Apresenta em sua estrutura um envelope viral formado por uma bicamada lipídica e pelas glicoproteínas (gp) 120 e 41, uma matriz viral composta pela proteína (p) 17 e pelo ácido Mirístico, e um capsídeo viral composto por gp24. No interior do capsídeo viral, há a proteína (p)7 e a p9, o genoma e as enzimas virais envolvidas na replicação (Transcriptase reversa - TR, Protease - PR, Integrase - INI). Genes estruturais (gag, pol e env), acessórios (tat e rev) e reguladores (vif, vpr, vpu, nef) compõem o genoma do HIV-1 (BARRÉ-SINOUSSE, 1996).

O ciclo replicativo começa com a ligação das gp 120 do envelope viral (env) ao receptor CD4 e correceptor-5 de quimiocina-CC (CCR5) da célula do hospedeiro. Ocorre a fusão das membranas viral e celular, com consequente entrada da partícula viral na célula. Em seguida, há o desenrolamento do capsídeo viral e liberação do HIV-RNA e proteínas no citoplasma. A enzima TR faz a transcrição do HIV-RNA em DNA, formando o complexo pré-integração (CPI). O CPI migra para o interior do núcleo, onde o DNA viral é integrado ao DNA do hospedeiro. Em seguida, ocorre a transcrição de um novo RNA viral mediado pela RNA polimerase II do hospedeiro e pelo fator b de alongamento da transcrição (BARRÉ-SINOUSSE, 1996).

Esse novo RNA servirá de modelo para formação de proteínas virais e de cadeias de RNA mais longas (RNA genômico). Essas proteínas virais e RNA se deslocam até a superfície celular e originam novo vírus imaturo. Ao ser liberado da célula, sofre o processo de maturação, em que o vírus imaturo é submetido à ação da enzima protease que cliva a poliproteína estrutural para formar proteínas gag maduras, gerando a produção de novo vírus infeccioso. Cada etapa do ciclo replicativo é um potencial alvo de drogas antirretrovirais (DENG et al., 1996; DORANZ et al., 1996).

2.2 Origem e diversidade genética do HIV

A origem do HIV está nas múltiplas transmissões zoonóticas do Vírus da Imunodeficiência dos Símios (SIV) de primatas africanos não humanos com humanos

no oeste e centro da África (HAHN et al., 2000). As primeiras transmissões de HIV foram identificadas na República Democrática do Congo no início do século vinte (FARIA et al., 2014).

Existem duas principais categorias de HIV: HIV 1 (HIV-1) e HIV tipo 2 (HIV-2). HIV-2 é geneticamente diferente em mais 55% do HIV-1 e muito menos disseminado. Em 1981, os primeiros casos da AIDS foram relatados nos Estados Unidos. Em 1983, um novo retrovírus humano foi identificado (vírus associado a linfadenopatia) no Instituto Pasteur (França) mediante a cultura de biópsia de linfonodo de paciente com linfadenopatia generalizada. Depois passou a ser chamado de Vírus da Imunodeficiência Humana (BARRÉ-SINOUSI, 1983).

O HIV-1 caracteriza-se por enorme diversidade genética, decorrente da alta taxa de replicação viral, das mutações enzimáticas e do potencial de recombinação em células coinfectadas por diferentes cepas virais (KORBER et al., 2001). O impacto da alta variabilidade genética do HIV-1 pode ser observado na taxa de mutação, no tropismo celular, na aquisição de mutações de resistência, na progressão da doença e na resposta à vacina (BRITO et al., 2006; LEAL et al., 2008; RODRIGUES et al., 2006).

Classificam-se em quatro grupos: M (major), N (non-outlier), O (outlier) e P, identificado mais recentemente (VALLARI et al., 2011). Cada um corresponde à transmissão cruzada entre as espécies do SIV de chimpanzés da subespécie central (*Pan troglodytes troglodytes*) e em gorilas da planície ocidental (*Gorilla gorilla gorilla*) (GAO et al., 1999). Grupo N, O e P são restritos ao Centro-Oeste da África (AYOUBA et al., 2000; PEETERS et al., 1997; VALLARI et al., 2011).

O grupo M é o mais difundido no mundo, sendo dividido filogeneticamente em subtipos (A-D, F-H, J e K), sub-subtipos (A1, A2, F1 and F2) e várias formas recombinantes circulantes (CRFs) como CRF01_AE e CRF02_AG. Na distribuição mundial, o Subtipo C é o mais prevalente, sendo mais encontrado na África Subsaariana e Índia. O subtipo B predomina nas Américas, Europa, Austrália e Tailândia, enquanto o subtipo A e D, na África Central, e CRF01_AE no Sudeste Asiático (HOFSTRA et al., 2015; SUNGKANUPARPH et al., 2011).

No Brasil, o subtipo B é o mais frequente, ocorrendo em 90% na região Norte, no Rio de Janeiro 78% e no Nordeste 82,4%. Na região Sul, predomina o subtipo C com 56,3%. Estudos mostram um aumento na proporção de subtipo C no Sul e de CRFs no Rio de Janeiro (LOPES et al., 2015; SILVEIRA et al., 2012; VELASCO-DE-

CASTRO et al., 2014;). Em Pernambuco, Lima et al. (2016) encontraram subtipo B 61,3%, F 31,5%, CRF 6%, C 1,2% .

A maior frequência do subtipo C na região Sul do Brasil predomina nos estados do Rio Grande Sul, Santa Catarina e Paraná, onde esse subtipo é responsável por 20 a 80% das infecções por HIV-1 (GRÄF; PINTO, 2013). Delatorre et al. (2013) compararam sequências pol do subtipo C do HIV-1 das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste com as de origem africana. Seus resultados confirmam a hipótese de que a mais frequente desta linhagem circulante no Brasil (CBR-I) originou-se no leste da África, em Burundi. Introduzido no Paraná na década de 1970, sofreu rápida disseminação nos estados vizinhos.

2.3 Terapia antirretroviral

É consenso, entre guias nacionais e internacionais, a recomendação do início imediato do ARV para todas as PVHIV, independentemente do seu estágio clínico ou imunológico (BRASIL, 2017; EACS, 2017; WHO, 2017a). O início precoce da terapia está significativamente associado à diminuição da morbimortalidade, da frequência de tuberculose, sarcoma de Kaposi e linfoma (INSIGHT START STUDY GROUP, 2015). Além disso, manter carga viral indetectável diminui significativamente a transmissão da infecção (RODGER et al., 2016).

Assim como o manual britânico, europeu e norte-americano, o Ministério da Saúde do Brasil, em fevereiro de 2017, passou a contemplar como esquema antirretroviral de primeira linha 2 ITRN+1INI (DTG) (CHURCHILL et al., 2015; DHHS, 2017; EACS, 2017). Há estudos evidenciando superioridade do esquema ARV com DTG, devido à menor taxa de descontinuidade decorrente de efeitos adversos, à maior taxa de variação de CD4 em 48 semanas e à menor média de dias necessários para supressão viral quando comparado com o EFV (WALMSLEY et al., 2013; WALMSLEY et al., 2015). No Brasil, todos, exceto gestante, co-infecção tuberculose-HIV e situações especiais de intolerância receberão esquema de primeira linha baseado em DTG (BRASIL, 2017).

Por cerca de uma década, a primeira linha da terapia no Brasil foi baseada em ITRNN, preferencialmente EFV. Foi uma alternativa viável para iniciar a terapia, com posologia de dose única diária. Pode ser utilizado em doses habituais em coinfectados com tuberculose em tratamento com rifampicina, bem como em gestante, contudo,

devendo ser evitado em paciente com distúrbio do sono grave e condições psiquiátricas, como depressão. No entanto, a diminuição da mortalidade e o consequente aumento da expectativa de vida entre os pacientes infectados pelo HIV estimularam a busca por drogas mais seguras, com poucos efeitos adversos e maior barreira genética.

O Ministério da Saúde brasileiro disponibiliza 13 drogas para o tratamento da infecção pelo HIV-1:

- Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo/nucleotídeo - ITRN(t)s: tenofovir (TDF), Abacavir (ABC), AZT.
- Inibidores de integrase - INIs - Dolutegravir (DTG), Raltegravir (RAL).
- Inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos - ITRNNs - Efavirenz (EFV), Nevirapina (NVP), Etravirina (ETR).
- Inibidores de Protease combinado com Ritonavir - IP/r - Darunavir/ritonavir (DRVr), Atazanavir/ritonavir (ATV/r), Tipranavir/ritonavir (TPV/r).
- Antagonista de CCR5 - Maraviroc (MRV)
- Inibidores de fusão - enfuvirtida (T20)

2.4 Falha virológica (FV)

FV é definida pela presença de carga viral (CV) do detectável após seis meses do início ou da modificação do esquema ARV, ou em indivíduos que mantinham CV indetectável anteriormene (BRASIL, 2017). A principal causa de FV é a má adesão à terapia. Os principais fatores que influenciam a aderência aos ARVs são os psicossociais, como depressão, uso de substâncias psicoativas e dificuldade no acesso ao serviço de saúde. Características do esquema escolhido, como posologia, tolerabilidade e número de comprimidos também interferem com o tratamento (ACHAPPA et al., 2012). Falta de adesão acarreta diretamente resistência adquirida e contribui para resistência à droga transmitida (TDR), bem como a escolha do ARV inadequada aumentam o risco de falha virológica (BRASIL, 2017).

2.5 Consequência da viremia persistente

A meta do tratamento é alcançar e manter CV plasmática indetectável, atualmente entre 20 e 50 cópias/ml. Cerca de 20% dos pacientes que receberam ART apresentam rebotes transitórios de viremia e 4%-10% experimentam episódios persistentes de viremia detectável em baixos níveis, entre 50 e 500 cópias/ml. Não há guias para manejo de pacientes com baixo nível de viremia (BNV), < 500 cópias/ml, especialmente entre 50 e 200 cópias/ml (GARCÍA-GASCÓ et al., 2008; TAIWO et al., 2011). BNV pode aumentar o preenchimento do reservatório viral latente, além de ser uma causa de persistente ativação imune, o que poderia contribuir na morbimortalidade (CORBEAU; REYNES, 2011; HUNT, 2012; RAMRATNAM et al., 2000).

Assim, estudos foram elaborados de modo a avaliar o impacto de BNV em resultados clínicos e virológicos. The Antiretroviral Therapy Cohort Collaboration 9 (ART-CC) encontrou que BNV entre 200–499 cópias/ml foi fortemente associado à falha virológica, suportando a orientação do Department of Health and Human Services (DHHS), Estados Unidos, que define falha virológica como carga viral acima de 200 cópias/ml (VANDENHENDE et al., 2015).

Na ANRS-CO3 Aquitaine Cohort, FV foi considerada com dois valores consecutivos de carga viral maior que 200 cópias/ml ou um valor de carga viral maior ou igual a 200 cópias/ml após uma modificação de ART. BNV foi definida como 50-199 cópias/ml durante pelo menos um mês. Encontrou-se que entre 2.374 indivíduos com acompanhamento médio de 3 anos, 205 (8,6%) evoluíram para BNV, a qual foi associada com FV em pacientes experimentados sob ARV. No entanto, FV não foi associada ao esquema ARV (ITRNN ou IP/r) nem com a duração da BNV (VANDENHENDE et al., 2015).

Dados de uma coorte multicêntrica americana, que incluiu 8.000 pacientes iniciando ARV, avaliou a viremia seis meses após o início da terapia, seguindo-os até a morte ou até 31 de dezembro de 2014. Não encontraram um valor entre 30 e 500 cópias/ml que correspondesse a um aumento da mortalidade em dez anos. No entanto, o risco de morte foi marcadamente maior quando o valor de carga viral esteve acima de 999 cópias/ml. Sugerindo a importância de rápida supressão virológica após início do ARV (LEE et al., 2017).

A persistência da replicação viral e da ativação imunológica leva a uma inflamação crônica e ao aumento da homeostasia. A Elevação dos níveis de marcadores inflamatórios e de coagulação tem sido associada ao aumento da mortalidade em participantes infectados pelo HIV (TIEN et al., 2010). O estudo SMART também encontrou forte associação da IL-6 (interleucina 6-cytocina inflamatória), D-dímero (uma proteína inflamatória) e proteína C reativa (um marcador pró-inflamatório) com mortalidade (KULLER et al., 2008).

A avaliação de 1116 PVHIV do estudo Fat Redistribution and Metabolic Change in HIV infection, no qual a carga viral foi categorizada em indetectável ao método, 1–19, 20–339, 400–9999 e maior ou igual a 10.000 cópias/ml. Encontrou-se associação de maiores níveis de interleucina IL-6 e fibrinogênio com valores iguais ou acima de 10.000 cópias/ml, não havendo diferença entre níveis mais baixos de viremia. Neste estudo, a relação do valor da carga viral com a IL-6 foi fortemente afetada pela depleção de células CD4. Após o ajuste para a contagem de células CD4 e inflamação, a viremia não esteve significativamente associada ao risco de mortalidade ao longo de cinco anos (EASTBURN et al., 2011).

Dados recentes do estudo START, sobre associação de níveis de biomarcadores da inflamação sistêmica, coagulação e dano vascular com risco de eventos clínicos e efeito do início imediato e tardio do ARV, foram publicados. Foram acompanhados 4.299 participantes por 3,2 anos. O efeito prejudicial da inflamação e/ou da ativação da coagulação foram independentes do tempo de início do ARV. No entanto, o tratamento imediato levou a reduções significativas nos níveis de D-dímero, IL-6, da Amilóide A sérica, da molécula de adesão vascular-1 e da molécula de adesão intercelular solúvel-1. Tanto em termos absolutos quanto em relação ao grupo de início tardio do ARV, ao longo de oito meses (BAKER et al., 2017).

Os níveis de IL-6 e D-dímero permanecem cerca de 40% a 75% mais elevados no PVHIV sob ARV com supressão virológica comparado com o indivíduo não infectado pelo HIV (FREIBERG et al., 2010). Por isso, é prioridade o desenvolvimento de estratégias anti-inflamatórias sem comprometer a eficácia do ARV (BAKER et al., 2017).

2.6 Resistência viral

2.6.1 Bases biológicas da resistência à droga

O HIV-1 tem alta capacidade replicativa, que, por sua vez, gera elevada taxa de mutação, acumulando uma mutação na transcriptase reversa a cada ciclo replicativo. Esse processo resultará em inúmeros vírus variantes, conhecidos como *quasispecies* (ABRAM et al., 2010). Além disso, a grande capacidade de recombinação com outras variantes virais e a reativação de variantes virais latentes arquivadas em cromossomos do hospedeiro contribuem para a variabilidade genética do HIV-1 (DD et al., 1995). A habilidade de produzir rapidamente *quasispecies* permite que o HIV-1 escape ao sistema imunológico e viabilize a resistência ao ARV. Isso ocorre especialmente quando os níveis séricos das drogas estão baixos e incapazes para suprimir totalmente a replicação viral (TANG; SHAFER, 2012).

2.6.2 Resistência transmitida

A resistência transmitida é definida pela presença de MAR em pacientes virgens de tratamento, ou seja, o indivíduo já adquire um vírus mutante. Países desenvolvidos como Austrália, França, Estados Unidos e Espanha apresentam, respectivamente, prevalência de TDR de 17,5%, 16,7%, 12,6% e 12,6% (BAXTER et al., 2015).

Em recente estudo brasileiro, publicado na 9.^a IAS Conference on HIV Science (IAS, 2017), 1568 indivíduos com diagnósticos recente e virgens de ARV foram avaliados, e constatou-se uma prevalência de 9,5% de TDR. A prevalência de TDR por região foi 9,4% no Nordeste; no Sudeste 11,2%; na região Central 6,8%; no Norte 10,2% e no Sul 8,8%. A distribuição da TDR por classe do ARV foi 3,6% para ITRN, 5,8% ITRNN e 1,6% a IPs. A mutação mais prevalente foi a 103N (PIRES et al., 2017). Em Pernambuco, Cavalcanti et al. (2012) encontraram 6,1% de taxa de TDR, sendo as mutações associadas a ITRNN as mais prevalentes 3,8%, à semelhança do estudo nacional. Nesse contexto, a mudança da primeira linha da terapia baseada em EFV para DTG era necessária. No Brasil, a genotipagem pré-tratamento na busca de TDR é autorizada para gestantes, co-infecção tuberculose-HIV, criança e indivíduos que se infectaram com parceiro em uso de ARV (BRASIL, 2017).

2.6.3 Resistência adquirida

2.6.3.1 Resistência aos ITRN(t)s

O esquema ARV inicial tem como base os ITRN(t), cujo mecanismo de ação é a inibição por competição da TR. Há dois mecanismos genéticos de resistência a essas drogas. No primeiro, as mutações discriminatórias aumentam a capacidade da enzima TR de reconhecer o trifosfato derivado de ITRN(s) e os impedem de serem incorporados ao DNA viral (TANG; SHAFER, 2012).

A mutação discriminatória mais comum é a 184V/I, selecionada principalmente pelos análogos citosina, 3TC e emtricitabina (FTC), conferindo alto nível de resistência a essas drogas. É possível emergir também com o abacavir, proporcionando-lhe baixo nível de resistência (FROST et al., 2000). Sua presença aumenta sensibilidade do AZT e TDF, por diminuição da pirofosforólise induzida pelas mutações análogas timidínicas (TAMs). Além disso, diminui capacidade replicava do HIV-1. Por isso, sua manutenção é desejada em cenários de indivíduos multiexperimentados (MELIKIAN et al., 2012; MILLER et al., 2004).

A 65R, 70E/G/Q, 74V/I, 115F e a 151M complexo mutação são também mutações discriminatórias. A 65R é selecionada primariamente pelo TDF, oferecendo resistência cruzada a outros ITRN(t)s, exceto AZT. Nenhuma mutação de resistência relacionada pelo TDF compromete a suscetibilidade do AZT. A K70E/G/Q é outro caminho possível de resistência ao TDF e ABC. A 74V/I e 115F são selecionadas primariamente pelo ABC, mas também pelo TDF. 151M complexo mutação é raro e aparece em indivíduos sob falha virológica prolongada, imprime resistência a todos os ITRNs (GREGSON et al., 2016; MELIKIAN et al., 2012). Além da 151M, outras alterações envolvidas com multirresistência são a inserção de dois ou mais aminoácidos no códon 69 ou a deleção no códon 67 (IMAMICHI et al., 2000; LARDER et al., 1999). No segundo mecanismo de resistência, as TAMs promovem a remoção do análogo nucleotídeo já anexado à cadeia de DNA em polimerização. Evento mediado pela pirofosforólise da droga através do ATP, principal pirofosfato em condições fisiológicas, e consequente desprendimento da cadeia (ARION et al., 1998). As TAMs emergem, principalmente, sob o uso do AZT e D4T. Análises genéticas revelaram duas vias mutacionais: TAM 1 (41L, 210W e 215Y) e TAM 2 (67N, 70R, 215F ou 219QE). A TAM 1 proporciona altos níveis de resistência ao AZT, além de imprimir

resistência cruzada a outros ITRN(t)s (MELIKIAN et al., 2012; SHAFER; SCHAPIRO, 2008).

2.6.3.2 Resistência aos ITRNNs

Os ITRNNs são moléculas pequenas hidrofóbicas, cujo mecanismo de ação é por inibição alostérica da TR do HIV-1. Ao se ligarem próximo ao domínio catalítico da enzima, a TR tem sua flexibilidade alterada e fica incapaz de sintetizar DNA (ESNOUF et al., 1997). Têm baixa barreira genética para resistência. Alto nível de resistência é alcançado com uma mutação para nevirapina, uma ou duas para efavirenz e duas para etravirina. A rilpivirina (RPV), apesar de ser estruturalmente como a ETR, tem menor barreira genética (MELIKIAN et al., 2014).

Existe alto nível de resistência cruzada entre os ITRNNs. As MARs relacionadas com esta classe de ARV mais frequentes são L100I, K101E/P, K103N/S, V106A/M, Y181C/I/V, Y188C/H/L, G190A/S/E, and M230L. Com exceção da Y181C/I/V, cada uma delas impõe intermediário ou alto grau de redução da suscetibilidade ao EFV. L100I, K101E/P, Y181C/I/V, G190E e M230L reduzem suscetibilidade a ETR e RPV, e Y188L reduz suscetibilidade to RPV, mas não a ETR (HADDAD; NAPOLITANO; PAQUET, 2012; MELIKIAN et al., 2014; PICCHIO et al., 2014).

E138A/K/Q/G/R são comumente selecionadas pela RPV que impactam minimamente na suscetibilidade da ETR, mas não do EFV (RIMSKY et al., 2013). A E138A emerge em 1% a 6% em pacientes virgens de tratamento, especialmente nos vírus subtipos A e C (SLUIS-CREMER et al., 2014). Com amplo uso do EFV, tem sido identificado um aumento da V106M no subtipo C, e da G190S no subtipo A, em regiões específicas (KOLOMEETS et al., 2014; LAM et al., 2016).

A ETR é uma droga de segunda geração, tem a mais alta barreira genética entre os ITRNNs. Usualmente compõe esquema de resgate em indivíduos falhando a outros ITRNNs. Um algoritmo genotípico que atribui um peso às MAR ETR foi desenvolvido a fim de otimizar a interpretação de resistência à ETR e a decisão do tratamento de pacientes multiexperimentados (VINGERHOETS et al., 2010).

2.6.3.3 Resistência aos IPs

Os IPs foram introduzidos na década de 1990. Coadministrados com ITRN(t)s, inovaram o tratamento da infecção pelo HIV reduzindo a progressão da doença e mortalidade. O mecanismo de ação dos IPs é impedir a enzima protease, após se ligar ao seu sítio ativo, de clivar a proteína gag. Mutações relacionadas com IPs acontecem em qualquer ponto do gene da protease, incluindo local de sítio ativo onde os IPs se ligam, bem como áreas fora dele. São classificadas em mutações primárias (principais) ou secundárias – acessórias (MENDOZA; SORIANO, 2004).

A mutação primária, caracteristicamente, é selecionada precocemente e ocorre no sítio ativo da enzima PR. Promove uma alteração na conformação espacial, e interfere na ligação do IP à enzima por dificultar e diminuir o tempo de sua ligação no sítio ativo. Assim, pode reduzir, significativamente, a suscetibilidade dos IPs. As mutações secundárias, geralmente, surgem tardiamente e fora do sítio de ação da enzima. Podem acentuar a resistência aos IPs ou aumentar a capacidade replicativa do vírus ao restaurar a atividade da protease. Quando aparece isolada, é improvável que ocasione resistência e, habitualmente, envolve aminoácidos na posição 36 e 71 da protease (MENDOZA; SORIANO, 2004).

É possível outro mecanismo de resistência aos IPs, a partir de mutações que acontecem fora do gene da protease, no sítio de clivagem e não clivagem da protease (codificada pelo gene gag). Essas mutações promovem uma mudança no substrato das poliproteínas e facilitam sua ligação à enzima PR. Com isso, haverá a recuperação da atividade enzimática e da capacidade replicativa viral. Usualmente, não são identificadas pelos testes de genotipagem disponíveis (MAMMANO et al., 2000; MYINT et al., 2004; TAMIYA et al., 2004).

Os IPs, na maioria, são ARVs de barreira genética elevada e, por isso, comumente, demandam mais de uma mutação para se tornarem resistentes. São prescritos com um reforço de ritonavir ou cobicistat a fim aumentar níveis séricos, diminuindo o risco de desenvolver resistência, mesmo na ausência de completa adesão (BAXTER; CHASANOV, 2016). Apesar disso, a resistência cruzada entre os IPs é uma realidade e um desafio no manejo de pacientes multiexperimentados.

A seleção de mutações de resistência na protease não é aleatória, segue um caminho sequencial relacionado com a exposição a determinado IP. No entanto, o acúmulo dessas substituições de aminoácidos na protease afetará várias drogas

dentro dessa classe de ARVs. Por isso, é mandatória a realização da genotipagem e subsequente resgate terapêutico quando houver falha virológica sob uso de IP (KOZAL, 2004).

Por outro lado, há mutação que proporciona aumento da sensibilidade (hipersuscetibilidade) a um IP e resistência a outro IP. A hipersuscetibilidade está associada a um realce da atividade da droga. É uma alternativa na construção de um esquema de resgate de indivíduos multiexperimentados falhando à terapia, mas só é detectada por testes de fenotipagem. As mutações L24I, L76V, I50L/V e I54L aumentam a suscetibilidade ao TPV/r (BAXTER; KUMAR; RUANE, 2010). Algumas delas têm sido relacionadas com a resistência a outras drogas, como 50V, 54L, 76V ao darunavir e 50L ao atazanavir. Já a 82A, aumenta a suscetibilidade ao darunavir, mas é mutação primária para lopinair/ritonavir e indinavir/ritonavir (MEYER et al., 2009; WEINHEIMER et al., 2005).

2.6.3.4 Resistência aos INIs

Atualmente, há três INIs aprovados para o tratamento da infecção pelo HIV: RAL e EVG de primeira geração, e DTG de segunda geração. Os INIs se ligam ao núcleo catalítico da enzima e interrompem a integração do DNA proviral ao genoma do hospedeiro. As MAR INI estão dentro do núcleo catalítico e poucas mutações afetam a dissociação do elvitegravir (EVG) ao complexo DNA-integrase. Essa taxa de dissociação é ainda menor com DTG, o que pode contribuir para seu diferente perfil de resistência e maior barreira genética (HIGHTOWER et al., 2011).

O RAL, o primeiro INI comercializado é capaz de desenvolver três vias mutacionais: Q148H/R/K $\pm$ G140A/S/C $\pm$ E138A/K/T; N155H $\pm$ E92Q; Y143C/R (ANSTETT et al., 2017). As duas primeiras vias também ocorrem em pacientes usando EVG, conferindo resistência cruzada com o RAL. A via MAR Y143C/R é específica para RAL, não é selecionada por qualquer outro INI, no entanto, reduz a suscetibilidade do EVG quando ocorre em conjunto com mutações acessórias (HUANG et al., 2013).

A via N155H emerge com frequência moderada com o RAL. Tem um efeito menos deletério na replicação viral e, por isso, tem sido relacionada com uma ou eventualmente duas mutações secundárias (CB et al., 2014). É selecionada precocemente durante a terapia, e progressivamente é substituída por mutações na

posição 143 ou 148, que conferem maior nível de resistência comparada com N155H (FRANSEN et al., 2012).

Há inúmeros relatos do desenvolvimento de MAR na posição Q148 derivadas de pacientes sob pressão seletiva do RAL. A Q148 pode estar sozinha, no início do tratamento, mas, por gerar um severo impacto na capacidade replicativa viral, elas são rapidamente compensadas por várias MARs secundárias. Já a T66A/I/K, P145S, S147G e E92 emergem primariamente ao uso do EVG (WESENBEECK et al., 2011).

Paulatinamente, a T66 e a E92 são substituídas por Q148. (36, 49, 69). Esta, por sua vez, permanece como uma via dominante para a resistência à INI, independentemente do composto individual utilizado (METIFIOT et al., 2011).

O DTG é o INI mais recentemente aprovado pela Food Drug Administration (FDA), em 2013. Tem uma meia-vida de ligação a enzima integrase mais longa do que RAL ou EVG, o que pode explicar por que mantém atividade contra muitas variantes resistentes a INI de primeira geração. Por isso, tem sido utilizado para compor esquemas de resgate terapêuticos em pacientes falhando a terapia com RAL ou EVG. O DTG, dificilmente, seleciona MAR comuns ao INI de primeira geração (HIGHTOWER et al., 2011).

A resistência ao DTG habitualmente advém da substituição R263K particular a ele. R263K é uma rara não polimórfica mutação, associada à redução da replicação viral (QUASHIE et al., 2012). Tem sido identificada em pacientes multiexperimentados sob falha virológica com DTG monoterapia (BLANCO; OLDENBUETTEL; THOMAS, 2017; WESENBEECK et al., 2011).

2.6.3.5 Resistência aos inibidores de entrada

2.6.3.5.1 Resistência ao antagonista de CCR5

Gp120 de HIV-1 interage com a região N-terminal e com a segunda alça extracelular da quimiocina-CC Receptor 5 (CCR5) para entrar na célula do hospedeiro. O Maraviroc age inibindo alostericamente a gp 120 do envelope viral de cepas do HIV-1 trópico CCR5, impedindo sua ligação ao correceptor R5. Assim, esta droga é limitada para pacientes com vírus que usa apenas CCR5 para entrada na célula do hospedeiro – vírus R5 (TAN et al., 2013).

Sob o uso de Maraviroc, o mecanismo mais comum de FV é a expansão de vírus trópicos CXCR4 (vírus X4) preexistentes que são intrinsecamente resistentes aos inibidores de R5 (GULICK et al., 2008; WESTBY et al., 2006). No início da infecção, 80% dos pacientes são exclusivamente vírus R5. Nos estágios mais tardios da infecção, o vírus X4 emerge. Por isso, é orientado realizar o teste genotípico de tropismo antes de iniciar antagonista de CCR5 (BRUMME et al., 2005; HUNT et al., 2006).

É possível, no entanto, haver mutações de resistência no gene *env* que permitam que o gp120 do HIV-1 se ligue ao correceptor R5; porém, os relatos que retratam essa situação são, principalmente, registrados *in vitro* ou isolados virais clínicos (JIANG et al., 2015). Essas mutações, na maioria, são encontradas na alça V3 da gp 120 do HIV-1, mais freqüentemente nas posições 11 e 25. Os testes genotípicos de tropismo apresentam uma especificidade e sensibilidade próximo a 85% e 50%-70%, respectivamente, para detectar o vírus X4 (HARTLEY et al., 2005).

2.6.3.5.2 Resistência aos inibidores de fusão

A glicoproteína transmembrana gp 41 do HIV-1 media a fusão entre a membrana viral e a célula do hospedeiro. Enfuvirtida foi o primeiro fármaco que validou o processo de fusão como um alvo. A resistência à enfuvirtida está associada, sobretudo, a mutações na primeira região de repetição heptad (HR1) do gene da gp41 do envelope viral, nas posições 36-45, com relatos tanto *in vitro* como *in vivo* (RIMSKY; SHUGARS; MATTHEWS, 1998; WEI et al., 2002).

Contudo, mutações ou polimorfismos em outras regiões do envelope (por exemplo, a região HR2 ou as que ainda não foram identificadas) podem afetar a suscetibilidade à enfuvirtida (XU et al., 2005). As MARs relacionadas com a enfuvirtida são G36DS, I37V, V38AME, Q39R, Q40H, N42T, N43D (WENSING et al., 2016).

2.7 Resgate terapêutico

2.7.1 Após primeira falha virológica à terapia antirretroviral baseada em ITRNN

Com o aumento da expectativa de vida das PVHIV e o aperfeiçoamento no monitoramento e detecção de FV em cenários de recursos limitados, um número cada

vez maior de indivíduos tem precisado mudar para esquema ARV de resgate (BOYD; EMERY; COOPER, 2009). A FV à primeira linha da terapia preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 2 ITRN(t)+ITRNN, tem ocorrido em cerca de 20% dos indivíduos em tratamento (WHO, 2017b). A escolha adequada do esquema de resgate tem relevância clínica e repercussão na saúde pública, já que impacta na morbidade, mortalidade e transmissibilidade. A OMS orienta que o esquema ARV resgate seja composto por dois ITRN(t)s combinados com inibidor de protease/ritonavir, quando o esquema na primeira FV for dois ITRN(t)s combinado com ITRNN (WHO, 2016).

Países de baixa e média renda na África Subsaariana, onde estão 70% das PVHA, acessam a primeira linha recomendada pela OMS. Esse esquema é de baixa barreira genética e facilmente resulta em resistência cruzada. Assim, a sensibilidade dos ITRN(t)s poderá ser comprometida por múltiplas mutações que surgem na primeira FV. Além disso, os ITRN(t)s apresentam riscos bem reconhecidos de efeitos tóxicos. Esses fatores geram uma inquietação em manter ITRN(t)s na terapia de resgate e têm motivado o desenvolvimento de ensaios clínicos randomizados sem essa classe de antirretroviral, baseado em IP/r (Lopinavir/r) com INI (Raltegravir) (BOYD, 2013).

Em revisão sistemática realizada pela Colaboração Cochrane em 2007 e atualizada em 2010, a fim de avaliar a conduta na FV à primeira linha (2 ITRN(t)+ITRNN), concluiu-se que havia pouca evidência para corroborar a recomendação da OMS para o resgate terapêutico após primeira FV (HUMPHREYS; CHANG; HARRIS, 2010; HUMPHREYS; HERNANDEZ; RUTHERFORD, 2007). Com isso, em 2013, surgiu o primeiro ensaio clínico, *SECOND-LINE*, que comparou lopinavir com ritonavir (LPV/r) mais ITRN(t)s com LPV/r mais o RAL, em países de média e alta renda, em relação à durabilidade de segurança e eficácia em 48 semanas. Dos 541 incluídos, a maioria realizou testes de resistência (BOYD, 2013).

Em seguida, foi publicado o estudo *EARNEST* com o mesmo objetivo, mas realizado em países de baixa renda, onde os indivíduos não fizeram testes de resistência. Tanto o *SECOND-LINE* quanto o estudo *EARNEST* concluíram que o grupo com LPV/r com RAL foi não inferior e não superior ao LPV/r com ITRN(t)s (BOYD, 2013; PATON et al., 2014). Em 2015, foi divulgado o seguimento do *SECOND-LINE* até 96 semanas, e foi demonstrada eficácia, acima de 75%, e perfis de segurança semelhantes entre os dois grupos (AMIN et al., 2015).

O estudo *SELECT*, realizado em condições de ampla resistência aos ITRN(t)s e sem exame de genotipagem, reforça a orientação da OMS de que LPV/r com ITRN(t)s é uma escolha adequada e LPV/r com RAL é uma alternativa equivalente (LA ROSA et al., 2016). Finalmente, em 2017, foi publicada uma revisão sistemática com metanálise que selecionou 12 artigos originais, a fim de revisar essa questão. Os achados da metanálise ratificam a segurança e eficácia do LPV/r com ITRN(t). LPV/r monoterapia foi inferior a todos os outros regimes na supressão virológica em 48 e 96 semanas (KANTERS et al., 2017).

É possível concluir que, apesar de pouca ou nenhuma atividade devido à resistência, os ITRN(t)s colaboram de forma significativa para a eficácia do ARV resgate. Acrescenta atividade aos IPs sozinho, correspondente a associar um ARV de uma nova classe. Não haver diferença entre 0 e 1 ITRNs ativos leva a se supor que esse achado não se deve à atividade direta da droga, pode refletir um efeito na aptidão viral (PATON et al., 2014).

Kanters et al. (2017) encontraram um aumento de linfócitos T CD4 mais significativo no grupo sem ITRN(t)s. Além disso, relatam a necessidade de novos trabalhos com outros IPs e INIs, como darunavir com ritonavir (DRV/r) com DTG, que teriam melhor posologia e menor número de comprimidos. Ressaltam que o DRV/r, ao ser comparado diretamente com LPV/r, pareceu ser insuficiente nos indivíduos com carga viral acima de 100.000 cópias/ml.

No entanto, a dose de DRV/r usada foi 800 mg/100 mg, o que pode ser inadequado nesses pacientes falhando à primeira linha da terapia com ITRNN+2 ITRN(t)s. O estudo *ODIN* encontrou o oposto, DRV/r 800 mg/100 mg teve um desempenho pior com carga viral menos que 100.000 cópias (CAHN et al., 2011; CAHN et al., 2013). Por fim, exceto para LPV/r com ITRN(t)s e LPV/r com RAL, falta evidência de alta qualidade para esquemas ARV resgate após primeira FV com ITRNN com 2 ITRN(t)s (KANTERS et al., 2017).

2.7.2 Após primeira falha virológica à terapia antirretroviral baseada em IP/r

Quando IP/r com ITRN(t) é utilizado como primeiro esquema, é fundamental que o esquema ARV resgate seja construído após avaliação da extensão de mutação principal na protease e na transcriptase reversa, após exame de genotipagem. O

POWER 1 e 2, estudos de fase 2, randomizados, avaliaram a segurança e eficácia do DRV/r em experimentados.

Após teste de resistência, estratificaram os indivíduos pelo número de mutação principal para IP (1, 2, 3), pelo uso ou não de enfuvirtida, e pela carga viral ($<$ ou $>$ 20 000 mil cópias/ml). O DRV/r foi significativamente superior ao IP comparador, tanto em relação ao desfecho de redução virológica 1 log 10 na 24.^a semana, quanto ao percentual de pacientes com CV $<$ 400 ou CV $<$ 50, especialmente na dose 600 mg/100 mg duas vezes ao dia (HAUBRICH et al., 2007; KATLAMA et al., 2007).

O POWER 3, estudo de fase 3, reavaliou a eficácia e a segurança do DRV/r em 327 indivíduos, com média de mutação principal para IP = 3 e média de mutação associada a IP/r = 9. Ratificou superioridade do DRV/r como um IP de resgate. Assim, DRV/r é uma opção no resgate terapêutico quando há MAR na protease. No entanto, a adição de uma droga de uma nova classe é necessária no paciente com mutação para as três classes de ARV (ITRN(t), ITRNN e IP) (MOLINA et al., 2007).

O DUET 1 e 2, ensaios clínicos multicêntricos, randomizados, que avaliou a eficácia e segurança da ETR para pacientes com resistência a ITRNN e pelo menos três mutações principais para IP. Todos os pacientes receberam DRV/r. Mais de 90% dos testes de genotipagem apresentaram quatro mutações para ITRN(t) e mais de 60% selecionaram quatro mutações principais para IP. Na intenção de tratar, os desfechos de CV $<$ 50, média de CV e CD4 foram melhores no grupo da ETR ($p < 0,005$) (LAZZARIN et al., 2007; MADRUGA et al., 2007).

O MOTIVATE 1 e 2 analisou a eficácia e segurança do maraviroc (MRV) em pacientes com resistência a três classes de ARVs, após teste de tropismo indicando a presença do correceptor CCR5. A supressão virológica e aumento de LT CD4 foram significativamente melhores no grupo com maraviroc (GULICK et al., 2008). Posteriormente, Fätkenheuer et al. (2008) encontraram que aqueles com falha terapêutica em uso de maraviroc mostravam maior percentual de vírus com tropismo para o correceptor CXCR4. Com isso, é possível questionar se a pressão seletiva do maraviroc influenciou na mudança do tropismo viral. Esse fato é relevante, uma vez que vírus CXCR4 é mais agressivo ao hospedeiro, por sua atividade citopática, indutora de sincício.

Esquema com RAL ou com DTG têm composto a terapia de resgate com sucesso quando há extenso comprometimento na protease. Grinsztejn et al. (2007) mostraram melhores resultados imunoviológicos com RAL comparativamente ao

grupo controle, em uma população com perfil de resistência desfavorável. O estudo *SAILING* (CAHN, P. et al., 2013), ensaio clínico randomizado e duplo cego, evidenciou que DTG 50 mg/dia associado a duas outras drogas foi mais bem tolerado e mais eficiente na supressão virológica comparado ao RAL 400 mg duas vezes ao dia.

2.8 Testes de resistência viral

As vantagens de testes de resistência, na prática clínica, estão em evitar trocas desnecessárias de antirretrovirais nos casos de falta de adesão e propiciar substituições direcionadas para drogas ativas, impedindo manutenção de ARVs inativos, diminuindo toxicidade desnecessária. Há duas formas de se testar a resistência viral: fenotipagem e genotipagem.

2.8.1 Testes de Fenotipagem para o HIV-1

Testes de fenotipagem *in vitro* (fenotipagem convencional) medem a suscetibilidade de antirretrovirais (ARV) a partir de cultura de vírus em células mononucleadas do sangue periférico, avaliando sua capacidade de crescimento em diferentes concentrações de drogas. A suscetibilidade geralmente é relatada como a concentração de ARV que inibe a replicação de HIV-1 em 50% (IC50). É um processo não automatizado, demorado e com alto custo. Por isso, é normalmente reservado para desenvolvimento de medicamentos, pesquisa de resistência aos ARVs ou casos clínicos complexos (JAPOUR et al., 1993).

A principal fragilidade do teste é a necessidade de ponto de corte (*cut off*) definido para cada uma das drogas. Além disso, não é possível transferir seu resultado, que se aplica a cada droga isoladamente, para um esquema de terapia combinada (VANDAMME et al., 2001). Como alternativa à fenotipagem convencional, surgiu a fenotipagem virtual. Esta consiste na realização de uma genotipagem e subsequente comparação da sequência de nucleotídeo do paciente com sequência referência do tipo selvagem, gerando um genótipo baseado em um perfil de mutações. Por um banco de dados, busca-se perfil semelhante de mutações, identificando o resultado da fenotipagem (FEHR et al., 2011).

2.8.2 Testes de Resistência Genotípica para HIV-1

O teste de genotipagem é realizado a partir do sequenciamento de genes de um segmento de DNA para detectar mutações, que representam 20% da população do vírus que confere resistência ao ARV. É o método laboratorial mais utilizado por razões de custo, acessibilidade e tempo de resposta, em relação aos testes fenotípicos (FEHR et al., 2011). No Brasil, testes de genotipagem são disponibilizados desde 2006.

O acesso ao exame no serviço público de saúde, contudo, tem melhorado nesta década. É recomendado para pacientes com carga viral acima de 500 cópias/ml após seis meses do início do ARV, com dois exames consecutivos com intervalo mínimo de quatro semanas (BRASIL, 2017).

Em países de renda média e elevada, testes genotípicos são recomendados e rotineiramente usados para guiar o tratamento em pacientes falhando à terapia (CHURCHILL et al., 2015; DHHS, 2017; EACS, 2017). No entanto, a OMS não recomenda teste de resistência na primeira falha virológica quando o primeiro esquema foi baseado em ITRNN (WHO, 2016). A maioria dos ensaios clínicos que avaliam o benefício do teste de genotipagem envolveu pacientes que falharam esquemas baseados em IP/r e multiexperimentados (CINGOLANI et al., 2002; DURANT et al., 2000; MEYNARD et al., 2002; TURAL et al., 2002).

Faltam ensaios clínicos que avaliem especificamente o custo-benefício do teste de resistência genotípica em pacientes virgens de IP/r na primeira falha virológica ao esquema de 2 ITRN(t)+ITRNN, cujo resgate terapêutico será feito com ITRN(t)s+IP/r. Nesse contexto de FV, dados de estudo recente sugerem que decisões baseadas no teste de resistência genotípica podem superestimar o efeito prejudicial da resistência cruzada na atividade dos NRTIs (PATON et al., 2017). Uma vez que, os ITRN(t)s, mesmo com extensa resistência na TR, parece ter ação na supressão viral (BOYD, 2013; LA ROSA et al., 2016; PATON et al., 2014).

2.9 Novas perspectivas

Os ARVs disponíveis não fornecem a cura, portanto, a infecção por HIV tornou-se uma doença crônica que exige um compromisso diário com o tratamento. Com a má adesão, comum entre pacientes de doença crônica, surgem as MAR e a

necessidade de novas drogas. Entre os ITRN(t)s, o 4'-etnil-2-fluoro-2'-deoxiadenosine (EFdA) tem-se destacado por ser eficaz contra o alongamento da cadeia mediada pela TR do HIV. Isso foi atribuído à sua capacidade de atuar como um inibidor de translocação, um novo mecanismo de ação para um nucleosídeo (MICHAILIDIS et al., 2009; NAKATA et al., 2007).

Resultados recentes mostraram que a EFdA tem potencial para ser uma opção segura e efetiva para bloquear a replicação do HIV. Foi altamente eficiente em cultura de tecidos e animais contra o HIV e o SIV (SALIE et al., 2016). Apresentou uma meia-vida muito longa em indivíduos infectados pelo HIV, além de pouca toxicidade mitocondrial, por ser um substrato pobre para a DNA polimerase γ (FRIEDMAN et al., 2016; MUFTUOGLU et al., 2014; SOHL et al., 2012).

Estudos de cultura de tecidos revelaram que a EFdA pode selecionar a M184I/V, mas não teria um impacto importante sobre sua suscetibilidade. No entanto, a emergência de mutação compensatória, como a E138K, pode ser um fator complicador (MAEDA et al., 2014). Em estudo recente, a suscetibilidade do EFdA foi preservada na presença de M184V/I e E138K, embora a E138K não tenha sido gerada sob pressão seletiva do EFdA (OLIVEIRA et al., 2017).

Outra nova perspectiva é a possibilidade da terapia injetável de ação prolongada. Essa proposta surge a fim de melhorar a adesão ao tratamento, evitando níveis subótimos das drogas e, conseqüentemente, menos mutação de resistência.

O Cabotegravir, um INI, e a Rilpivirine, um ITRNN, com atividade clínica contra o HIV conhecida, apresentam perfis farmacocinético e físico-químico que permitem que sejam formulados e usados como drogas injetáveis de ação prolongada (MARGOLIS et al., 2017). Assim, o estudo LATTE-2, fase 2, randomizou 286 PVHIV com supressão viral em uso de medicação oral. Avaliou a eficácia, segurança e tolerabilidade de cabotegravir com rilpivirine injetáveis a cada 4 ou 8 semanas comparadas com cabotegravir oral com abacavir e lamivudina.

Foi observado que o esquema injetável foi tão efetivo e tolerado quanto o oral na manutenção de supressão viral em 96 semanas (MARGOLIS et al., 2017). O tratamento de Cabotegravir com Rilpivirine injetável poderá ser uma alternativa do tratamento sem uso diário de medicação oral, sendo uma mudança de paradigma na história do tratamento do HIV.

3 JUSTIFICATIVA

A diversidade genética é uma característica importante do HIV-1. O estudo da variabilidade genética do HIV em regiões distintas do mundo é essencial para o entendimento da doença causada por esse vírus. Monitorar a diversidade estrutural do HIV-1 auxilia na compreensão da epidemiologia molecular e no rastreamento do movimento do vírus nos diferentes grupos de risco e eventualmente em novas populações suscetíveis (SUCUPIRA et al., 2007).

O inegável benefício da grande disponibilidade da terapia antirretroviral pode trazer um potencial prejuízo com o crescimento das mutações de resistência àqueles medicamentos (TEIXEIRA et al., 2004). O reconhecimento precoce da falha virológica e a escolha adequada e oportuna do novo tratamento são fundamentais para minimizar as consequências da supressão viral parcial. Brites et al. 2016 realizaram um estudo em cinco grandes cidades brasileiras (Fortaleza, Salvador, Rio de Janeiro, Porto Alegre e Campinas) em que constataram uma extensa variação do perfil de mutações de resistência relacionada com droga.

O trabalho mais recente com pacientes experimentados em Pernambuco, envolvendo outros estados do Nordeste (Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba), foi publicado por Cavalcanti et al. em 2007, cujos resultados apontaram para maior prevalência da 184V e 215E para ITRN, 103N e 190A para ITRNN, e mutações secundárias nos cólons 90, 82 e 30 para IPs. O subtipo B ocorreu em 82,4% das amostras e subtipo F em 11,8%, mas não informa o esquema usado antes da falha nem o escolhido como esquema de resgate.

Este estudo propõe atualizar dados sobre o perfil genotípico do HIV-1 na primeira falha virológica, na cidade do Recife, e seu impacto na supressão virológica.

4 HIPÓTESE

Há maior frequência do subtipo B do HIV-1 e das mutações M184V e K103N em pacientes na primeira falha virológica à terapia antirretroviral, além do predomínio de esquema de resgate baseado em IP/r e ITRN(t)s com supressão viral após 48 semanas do esquema resgate.

4.1 Pergunta condutora

Qual o perfil genotípico do HIV-1 em pacientes na primeira falha virológica à terapia antirretroviral e seu impacto na resposta virológica ao resgate terapêutico?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência das mutações de resistência do HIV-1 após primeira falha virológica de acordo com o subtipo viral e esquema antirretroviral usado.

5.2 Objetivos específicos

Em pacientes na primeira falha virológica:

- a) Descrever características imunoviológicas no tempo da genotipagem.
- b) Verificar frequência de subtipo B e não-B, bem como a prevalência de mutações de resistência.
- c) Identificar fatores associados ao número de TAMs, mutações relacionadas com ITRN(t) e com o número total de mutações.
- d) Calcular o escore de sensibilidade genotípica (GSS) do esquema resgate individualmente.
- e) Estabelecer a prevalência de mutações para etravirina e seu perfil de resistência, de acordo com uso prévio de efavirenz ou nevirapina.
- f) Verificar o perfil de resistência genotípica dos antirretrovirais usados como primeiro esquema.
- g) Detectar fatores associados à supressão viral e variação de células T CD4 após 48 semanas da troca para o esquema resgate.

6 MATERIAIS E MÉTODO

6.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de corte transversal, retrospectivo, analítico, realizado por meio da coleta de dados em prontuário e em exames de genotipagem realizadas entre 2006 e 2016.

Por se tratar de um estudo transversal, a amostra foi por conveniência.

6.2 Local do estudo

O estudo desenvolveu-se em três grandes centros de referência no atendimento especializado às PVHIV, na cidade do Recife: Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC) – UFPE/EBSERH, Hospital Correia Picango (HCP) e Policlínica Lessa de Andrade (PLA).

O HC é um hospital universitário federal que tem cerca de 1.800 usuários cadastrados no ambulatório de doenças infecto-parasitárias (DIP). O HCP é uma importante referência estadual no acompanhamento da infecção pelo HIV-1 com 7.000 clientes registrados. A PLA é a principal sede do sistema de saúde ambulatorial da Prefeitura do Recife na prestação desse serviço com 2.300 mil pacientes com HIV/AIDS matriculados.

6.3 População do estudo

A população são usuários dos três centros acima descritos com diagnóstico de infecção pelo HIV-1 sob terapia antirretroviral, que evoluíram para primeira falha virológica, e realizaram genotipagem no período de 2006-2016.

Critérios de inclusão:

- Pacientes vivendo com HIV/AIDS.
- Idade maior ou igual a 18 anos.
- Ocorrência da primeira falha virológica, definida como em uso de ARVs há mais de seis meses e com duas cargas virais consecutivas, com intervalo de pelo menos trinta dias, com valores maiores que 1.000 cópias/ml.

Critérios de exclusão:

- Exposição prévia a qualquer droga antirretroviral antes de iniciar o primeiro esquema do tratamento.
- Ausência do exame de genotipagem antes da troca para esquema resgate.
- Dados insuficientes ou ilegíveis na genotipagem ou no prontuário.

6.4 Definição e categorização das variáveis

6.4.1 Definição de variáveis

6.4.1.1 Falha virológica

Foi definida pela presença da CV detectável acima de 1.000 cópias/ml após seis meses do início do ARV, em pelo menos dois exames consecutivos, com no mínimo 30 dias de intervalo.

6.4.1.2 Vias mutacionais

As vias mutacionais na TR selecionadas por ITRN(t) foram definidas com base em Shafer e Schapiro (2008) e da lista do International AIDS Society (IAS) 2017 (WENSING et al., 2016):

- TAM 1 (Via 1 das mutações aos análogos da timidina): 41L, 210W e 215Y.
- TAM 2 (Via 1 das mutações aos análogos da timidina): 67N, 70R, 215F ou 219QE.
- Não TAM (Mutações não relacionadas com os análogos da timidina): 65REN, 70E, 74V, 62V, 75I, 77L, 115F, 116Y, 184VI, 151M.

As mutações na TR relacionada com o ITRNN foram estabelecidas baseadas no IAS-2017 e no Stanford HIVdb Program versão 8.4: 90I 100I 98G 100I 101PEH 103NS 106AMI 108I 138AGKQ 179DFT 181CIV 188CLH 190SA 225P 230L.

As mutações na PR foram descritas como principais e acessórias segundo o Stanford HIVdb Program versão 8.4:

- Mutação Principal para IP: 30N, 32I, 46I, 47VA, 48VMASTQL, 50LV, 54VTALMS, 76V, 82ATFSLMC, 84VAC, 88STG, 90M.

- Mutação acessória para IP: 11IL, 10FIV, 20TIR, 23I, 24FMI, 33F, 43T, 46V, 53L, 58E, 71ILTV, 74PS, 83D, 88D, 89VT.

6.4.1.3 Sensibilidade dos antirretrovirais

Foram avaliados pelo Stanford HIVdb Program versão 8.4 (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations>).

6.4.1.4 Subtipo viral

Estabelecido pela comparação com uma sequência referência utilizando o Stanford University (<http://hivdb.stanford.edu>) ou o site da Rede Nacional de Genotipagem (Renageno) com arquivo cuja extensão é do tipo fasta (<http://algoritmo.aids.gov.br/resistencia.html>). Os subtipos foram relacionados com o grupo M do HIV-1 (A, B, C, D, F, G, H, J e K) e possíveis recombinantes.

6.4.1.5 Escore de sensibilidade genotípica (GSS)

Calculado individualmente somente para as drogas usadas pelo paciente no esquema de resgate. Foi atribuído o valor 1 para droga com atividade plena, 0,75 para potencial baixo nível de resistência, 0,5 para baixo nível de resistência, 0,25 para resistência intermediária e zero se droga com ausência de atividade.

6.4.2 Categorização das variáveis

Segue abaixo o Quadro 1 com as variáveis utilizadas no estudo, seus indicadores e a classificação teórica.

Quadro 1 – Variáveis, indicador e classificação teórica
(continua)

Variáveis	Indicadores	Classificação teórica
Idade na genotipagem	18-30 anos 31-50 anos > 50 anos	Quantificativa Independente
Sexo	Masculino Feminino	Dicotômica Independente
Mutações de resistência	Relacionada com ITRN(t)s • TAM 1 • TAM 2 • Não-TAM Relacionada com ITRNN Relacionada com IP • Mutações principais • Mutações acessórias	Qualitativa Dependente
Número de mutações	Relacionada com: ITRN(t) TAMs ITRNN IP	Quantitativa Dependente
Subtipo	B Não-B	Dicotômica Independente
CD4 pré-ARV (cell/ mm ³)	<200 ≥200	Quantitativa Independente
CD4 na genotipagem (cell/ mm ³)	< 200 200 – 350 mm ³ > 350	Quantitativa Dependente
CV pré-ARV (cópias/ml)	≤ 10.000 >10.000– 100.000 > 100.000	Quantitativa Independente
CV na genotipagem (cópias/ml)	≤ 10.000 >10.000– 100.000 > 100.000	Quantitativa Dependente
CV após 48 semanas do esquema resgate	Indetectável 50-400 > 400	Quantitativa Dependente
Δt em ARV ate genotipagem (em meses)	≤ 36 > 36	Quantitativa Independente
Δt em FV (em meses)	<12 ≥12-24 >24	Quantitativa Independente

Quadro 1 – Variáveis, indicador e classificação teórica (conclusão)

Variáveis	Indicadores	Classificação teórica
1.º Esquema ARV ITRN(t)	AZT/3TC TDF/3TC Outros	Qualitativa Independente
1.º Esquema ARV ITRNN	EFV NVP	Qualitativa Independente
1.º Esquema ARV IP	LPV/r ATV/r ou ATV 400 mg Outros	Qualitativa Independente
Esquema ARV resgate ITRN(t)	TDF/3TC AZT/3TC TDF/AZT/3TC DDI/3TC ABC/3TC SEM ITRN(t)	Qualitativa Dependente
Esquema ARV resgate ITRN(t)	LPV/r ATV/r DRV/r FPV/r	Qualitativa Dependente
Esquema ARV resgate com Raltegravir	SIM NÃO	Dicotômica Dependente

Fonte: Autoria própria.

6.5 Operacionalização da pesquisa

6.5.1 Coleta dos dados

A identificação dos prontuários e do nome dos pacientes que realizaram genotipagem, entre 2006 e 2016, nos centros HCP e PLA, feita mediante registro em livros de protocolos, e no HC-UFPE/EBSERH, foi em arquivo de exames de genotipagem.

Uma vez identificado o prontuário, procedeu-se à coleta dos dados em um formulário (APÊNDICE A). Alguns valores de carga viral e contagem de LT CD4 foram obtidos pelo Sistema de Controle de Exames Laboratoriais (Siscel) – plataforma *on-line* – com nome e data de nascimento do paciente. A sequência das mutações associada resistência (MAR), o perfil de sensibilidade dos ARVs, bem como os

subtipos do HIV-1, foram reavaliados pelo Stanford HIVdb Program versão 8.4 (<http://hivdb.stanford.edu>).

6.5.2 O teste de genotipagem

Nos três centros selecionados para a pesquisa, o teste de genotipagem foi solicitado pelo médico assistente do paciente, sendo coletado e enviado para o Laboratório Central de Pernambuco (Lacen-PE) entre 2001 e 2015. A partir de janeiro de 2016, os exames de genotipagem passaram a ser realizados no Laboratório Centro de Genomas, de acordo com a orientação da Renageno.

Para identificar as MARs aos principais antirretrovirais na TR e na PR do gene pol do HIV-1, foi utilizado o Kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System da Celera Diagnostics (Alameda, CA, EUA) no período de 2006-2008 e o Sistema Trugene (Siemens, Munique, Alemanha) de 2009 a 2016, pelos laboratórios que prestam serviço Renageno. A CV foi realizada até julho de 2013 pelo ensaio Versant HIV-1 RNA 3.0 (bDNA, Siemens, EUA). Depois dessa data, tem sido usado o qPCR em tempo real (Abbott, EUA). A contagem de células T CD4 (CD4) foi gerada por citometria de fluxo (BD, EUA).

As etapas desse processo incluem:

- a) Extração e purificação do RNA viral plasmático por ultracentrifugação
- b) Reação de transcrição reversa, ou seja, síntese do DNA complementar (cDNA)
- c) Amplificação por PCR do gene pol do HIV-1 (transcriptase reversa e protease)
- d) Reação do sequenciamento automático
- e) Eletroforese em poliacrilamida
- f) Análises das sequências.

No sequenciamento, foi utilizado o Big Dye Terminator chemistry e, a seguir, o produto foi analisado em sequenciador automático ABI Prisma 3100 (Applied Biosystems), o qual faz a resolução eletroforética das amostras e gera um cromatograma para cada sequência. O software da ViroSeq™ HIV-1 importa a sequência construída e compara com uma sequência referência do vírus selvagem do HIV-1 (wyld) HXB-2 (GeneBank K03455).

6.6 Análise estatística

Na análise estatística, utilizamos os Softwares SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows e o Excel 2010. Os resultados estão apresentados em forma de tabela com as respectivas frequências absoluta e relativa. Foi calculada média ou mediana para as variáveis quantitativas, de acordo com a normalidade. A normalidade das variáveis quantitativas foi feita pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Verificamos a existência de associação pelo Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher para as variáveis categóricas. Para identificar os fatores preditores que independentemente influenciaram na supressão virológica e no número de MAR ITRN(t), foram utilizados os Softwares STATA/SE 12.0. Na análise multivariada, foi utilizado o Modelo de Regressão de Poisson, levando em consideração as variáveis que obtiveram significância $< 0,20$ na análise bivariada. Foi calculada a razão de prevalência com intervalo de confiança de 95%. Todas as conclusões foram tiradas considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significante.

6.7 Considerações éticas

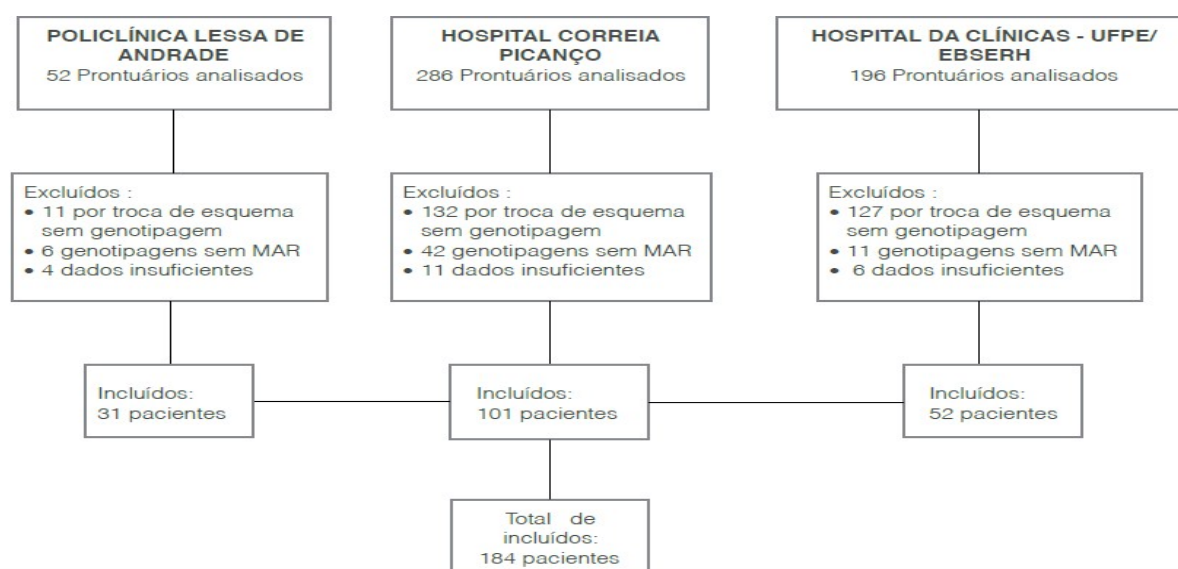
De acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos contempladas na Resolução n.º 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Número do Parecer: 1.985.922 (ANEXO A). Foram obtidas cartas de anuência dos três centros de coleta: HCP, PLA e HCUFPE/EBSERH.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Resultados

Foram avaliados 534 prontuários, dos quais 270 foram excluídos por troca de ARVs após a primeira FV sem testes de genotipagem, 59 por genotipagem com ausência de MAR e 21 por dados insuficientes ou ilegíveis (Figura 1). Foram incluídos 184 pacientes na primeira falha virológica para análise. Os participantes, na maioria, são do sexo masculino (73,4%), e a média da idade na FV foi de 41 ($\pm 9,4$) anos. A mediana de CD4 (n=155) e CV (n=141) pré-ARV foi, respectivamente, 176 células/mm³(cells/mm³) e 130.000 cópias/ml.

Figura 1 – Seleção da amostra



Fonte: Autoria própria por meio dos dados da pesquisa.

7.1.1 Fatores associados às características imunoviológicas e de ARV no tempo da genotipagem

As características genotípicas, imunoviológicas e de ARV no tempo da genotipagem estão descritas na Tabela 1. A MAR ITRN(t)s M184V/I emergiu em 78,4% das sequências do subtipo B (78,4% vs 21,6% para subtipo não-B, $p=0,009$).

Os indivíduos, na maioria (89,7%), selecionaram pelo menos uma mutação para ITRN(t).

Tabela 1 – Características imunoviológica e de ARV no tempo da genotipagem em 184 indivíduos na primeira falha virológica

Variáveis	n	%
Idade (anos) (media ± DP)	41,1 ± 9,4	
Sexo		
Masculino	135	73,4
Feminino	49	26,6
CD4, mediana (Q1; Q3)	234,0 (118,0; 361,0)	
CD4		
< 200	78	42,4
200 a 350	50	27,2
> 350	47	25,5
Perdas	9	4,9
CV (cópias/ml), mediana (Q1; Q3)	19.812,5 (7.036,0; 78.674,2)	
CV (cópias/ml)		
≤10.000	59	32,1
>10.000 a 100.000	75	40,7
>100.000	37	20,1
Perdas	13	7,1
Δt em ARV (meses), mediana (Q1;Q3)	54,5 (29,0; 90,0)	
Δt em FV (meses), mediana (Q1;Q3)	17,0 (10,0; 34,0)	
ARV baseado em ITRN(t)	184	100,0
AZT/3TC	126	68,5
TDF/3TC	48	26,1
Outros	10	5,4
ARV baseado em ITRNN	155	84,2
EFV	135	87,1
NVP	20	12,9
ARV baseado em IP	29	15,8
LPV/r	16	55,2
ATV/r ou ATV 400 mg	12	41,4
Outros	1	3,4
Subtipo Viral	171	92,9
B	139	81,3
F	31	18,1
BF	1	0,4

Fonte: Dados da pesquisa.

CD4- contagem células T CD4; CV- carga viral; Δt em ARV- tempo em antirretroviral até realização de genotipagem; Δt em FV- tempo em falha virológica; ITRN(t)- inibidor da transcriptase reversa análogo nucleos(t)ídeo; AZT- zidovudina; 3TC- lamivudina; TDF- tenofovir; ITRNN-inibidor da transcriptase reversa não-análogo nucleosídeo; EFV-efavirenz; NVP- nevirapina; IP - inibidor de protease; LPV/r- lopinavir/ritonavir; ATV/r- atazanavir/ritonavir; MAR- mutação associada à resistência.

Foi significativa a associação da presença de ≥ 3 MAR ITRN(t) com CD4 pré-ARVs menor que 200 cell/mm³ (66,7% vs 33,3% para CD4 pré-ARVs ≥ 200 , RP=1,52, IC=1,00-2,31, p=0,041), com CD4 no momento da genotipagem menor que 200cell/mm³ (RP= 2,04, IC95%= 1,18–3,55, p=0,011), com carga viral entre 10 000 e 100 000 cópias/ml (RP= 1,79, IC95%= 1,10–2,92, p=0,042) e com o tempo em ARV maior que 36 meses (81,2% vs 18,8% para $\Delta t \leq 36m$, p=0,003), conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Fatores associados ao número de MAR ITRN(t)s na primeira falha virológica

Fatores	N.º MAR ITRN(t)		RP	RP IC95%	p-valor
	≥ 3 n (%)	< 3 n (%)			
Idade (anos)					0,806 *
18-30	7 (10,1)	11(11,5)	0,90	0,49 – 1,66	
31-50	52 (75,4)	68(70,8)	1,00	–	
>50	10 (14,5)	17(17,7)	0,85	0,50 – 1,46	
Sexo					0,476 *
Masculino	53 (76,8)	69(71,9)	1,17	0,75 – 1,81	
Feminino	16 (23,2)	27(28,1)	1,00	–	
Subtipo					0,771 *
B	50 (80,6)	74(78,7)	1,00	–	
Não-B	12 (19,4)	20(21,3)	0,93	0,57 – 1,53	
CV pré-ARVs (cópias/ml)					0,570 **
≤ 10.000	4 (7,5)	3(4,3)	1,00	–	
>10.000 a 100.000	17 (32,1)	27(38,6)	0,68	0,32 – 1,42	
>100.000	32 (60,4)	40(57,1)	0,78	0,39 – 1,55	
CD4 Pré-ARVs					0,041 *
<200	40 (66,7)	39(49,4)	1,52	1,00 – 2,31	
≥ 200	20 (33,3)	40(50,6)	1,00	–	
CV na genotipagem (copias/ml)					0,042 *
≤ 10.000	15 (24,6)	38(71,7)	1,00	–	
>10.000 a 100.000	34 (55,7)	33(36,3)	1,79	1,10 – 2,92	
>100.000	12 (19,7)	20(22,0)	1,33	0,71 – 2,46	
CD4 na genotipagem					0,011 *
<200	38 (59,4)	33(35,9)	2,04	1,18 – 3,55	
200-350	15 (23,4)	28(30,4)	1,33	0,69 – 2,56	
>350	11 (17,2)	31(33,7)	1,00	–	
ARV baseado em ITRN(t)					0,189 *
TDF	12 (17,4)	25(26,0)	1,00	–	
Não-TDF	57 (82,6)	71(74,0)	1,37	0,83 – 2,27	
Δt sob FV (meses)					0,221 *
<12	13 (19,4)	28(30,4)	1,00	–	
12-24	25 (37,3)	34(37,0)	1,34	0,78 – 2,29	
>24	29 (43,3)	30(32,6)	1,55	0,92 – 2,60	
Δt em ARV (meses)					0,003 *
≤ 36	13 (18,8)	39(40,6)	1,00	–	
>36	56 (81,2)	57(59,4)	1,98	1,19 – 3,29	

*Teste de Qui-Quadrado **Teste de Exato de Fisher RP: razão de prevalência; IC: intervalo de confiança; N° MAR ITRN(t): número de mutação associada à resistência ao inibidor da transcriptase reversa nucleos(t)ídeo; CV: carga viral; CD4- contagem de células T CD4; TDF - tenofovir; Δt em FV: tempo sob falha virológica; Δt em ARV- tempo em antirretroviral até realização de genotipagem.

Após a análise com Modelo de Regressão de Poisson (Tabela 3), constatou-se que quem esteve com > 36 meses em ARV até genotipagem apresentou maior risco para o selecionar ≥ 3 MAR ITRN(t) (RP= 2,43, IC95%= 1,38–4,28, p=0,002). Além disso, quem desenvolveu CV no tempo da genotipagem >10.000 -100.000 cópias/ml (RP= 2,09, IC95%=1,25 –3,50, p= 0,005) e > 100.000 cópias/ml (RP= 2,20, IC 95%= 1,14 –4,27, p= 0,005) teve maior risco para selecionar ≥ 3 MAR ITRN(t).

Tabela 3 – Modelo de Poisson para ≥ 3 MAR ITRN(t)*

Variáveis	RP	RP IC95%	p-valor
CD4 pré-ARVs (cells/mm³)			
< 200	1,46	0,95 – 2,24	0,084
≥ 200	1,00	–	
CV na genotipagem (cópias/ml)			
≥ 10.000	1,00	–	
> 10.000 a 100.000	2,09	1,25 – 3,50	0,005
> 100.000	2,20	1,14 – 4,27	0,018
Δt em ARV (meses)			
≤ 36	1,00	–	0,002
> 36	2,43	1,38 – 4,28	

*MAR ITRN(t): mutações de resistência; RP: razão de prevalência; IC: intervalo de confiança; CD4: contagem de células T CD4; CV: carga viral; Δt em ARV: tempo em antirretroviral até genotipagem.

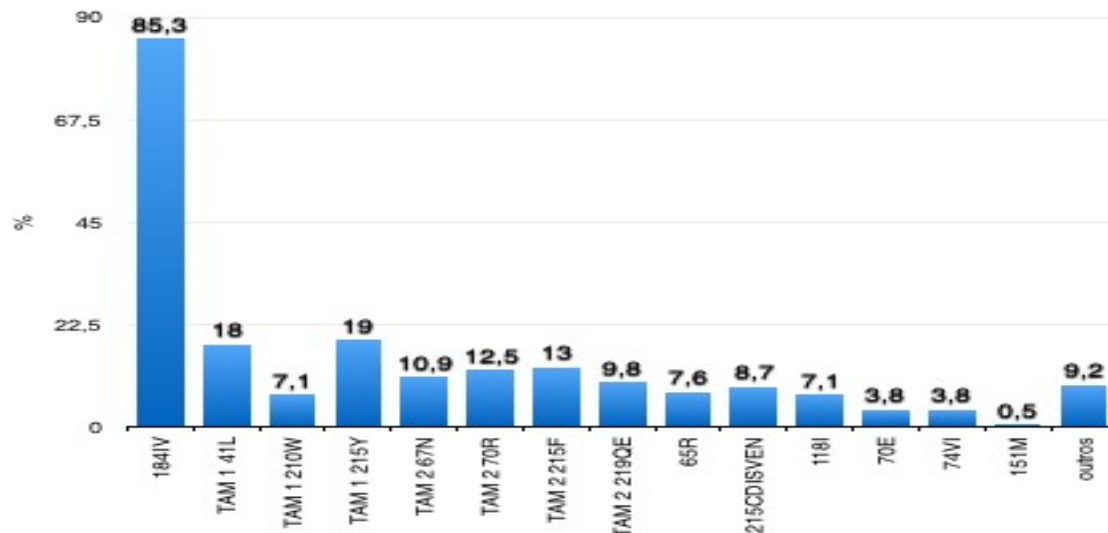
Houve uma tendência do surgimento de três ou mais MAR TAMs quando o tempo em ARV foi maior que 36 meses (92% vs 8% para Δt em ARV $\leq 36m$, p=0,051). A K65R emergiu em 7,6% dos 184 testes de genotipagem (Gráfico 1), e foi observada em 27,1% dos pacientes expostos a TDF/3TC. Mutações no códon K103 foram selecionadas em 65,8% (n=121/184) dos exames de genotipagem (Gráfico 2). Dentre os que usaram ITRNN, essa mutação ocorreu em 78,0% (n=121/155). A MAR ITRNN 90IV foi mais frequente no subtipo não-B (57,1% vs 42,9% para subtipo B, p=0,024) e a 190AS a mais prevalente para Etravirina (Gráfico 3).

Considerando os 29 pacientes que usaram IP, 55,2% (n=16) eram Lopinavir e 41,4% (n=12) eram atazanavir (Tabela 1). Mutações principais e acessórias para IP mais frequentes foram a 82AF (51,7%) e 10IFV (62%) respectivamente. A MAR principal IP 54VL emergiu com frequência em sequências de subtipo B (58,3% vs 41,7% para subtipo não-B, p=0,05), assim como a MAR acessória IP 10IFV (69% vs 31% para subtipo não-B, p=0,019) e 20RT (60% vs 40% para subtipo não-B, p=0,010).

O número total de mutações foi significativamente igual ou maior que sete entre os usuários que evidenciaram contagem de CD4 no momento da genotipagem menor

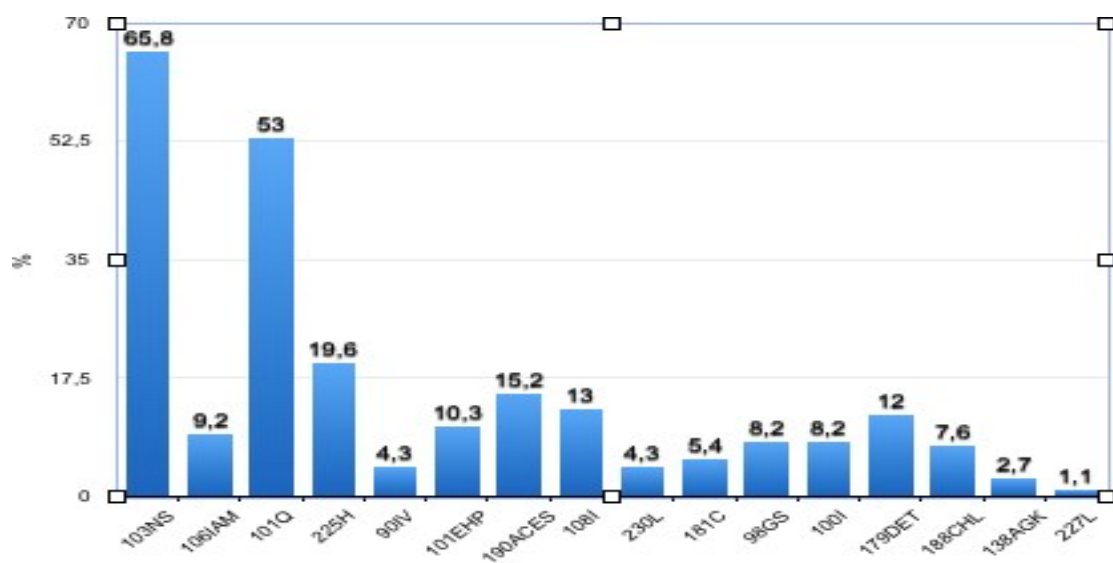
que 200 cells/mm³ (52,9% vs 27,6% para CD4 200-350 vs 19,5% para CD>350 cells/mm³, p=0,045).

Gráfico 1 – Prevalência de ITRN(t) em 184 testes de genotipagem



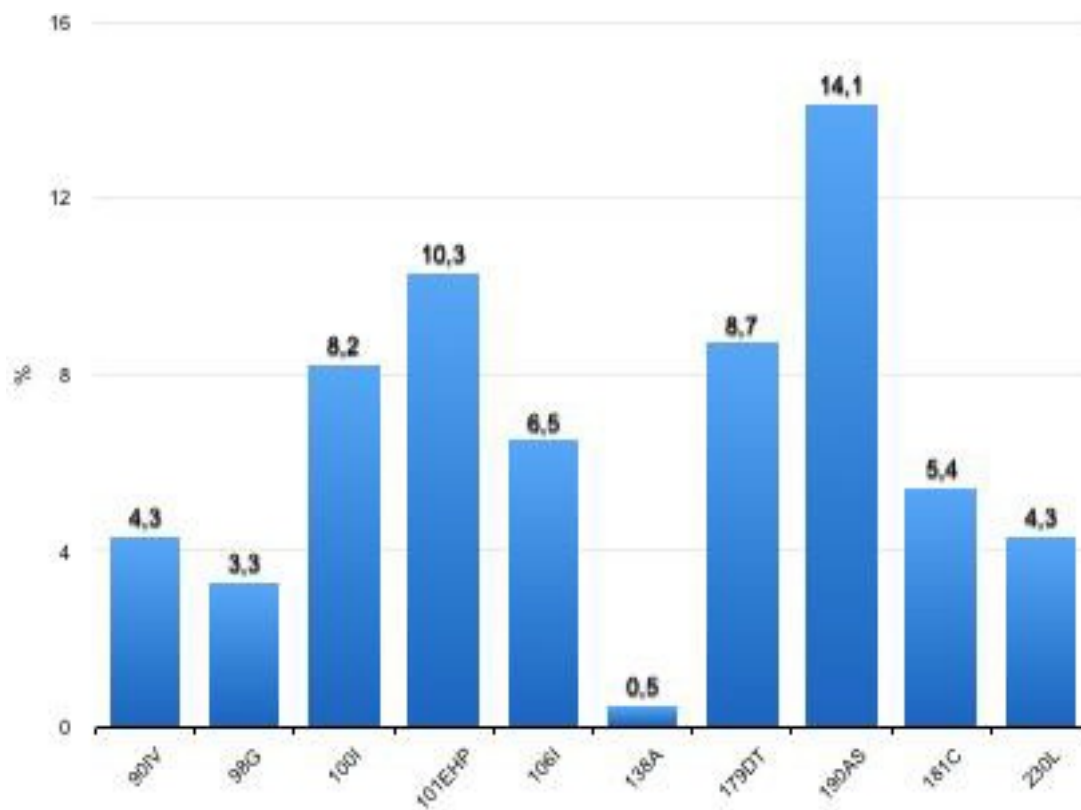
*MAR ITRN(t) - mutações associadas à resistência a inibidores da transcriptase reversa nucleos(t)ídeo

Gráfico 2 – Prevalência de MAR ITRNN em 184 testes de genotipagem



*Mutações associada a resistência a Inibidores da transcriptase reversa não nucleosídeo

Gráfico 3 – Prevalência de MAR ETR em 184 testes de genotipagem



*Mutações associada a resistência à Etravirina

7.1.2 Características da terapia de resgate

Houve uma perda de seguimento de oito (4,3%) pacientes após realizar teste de genotipagem. Assim, apenas 176 (95,7%) realizaram troca para esquema de resgate. Desses, usaram TDF/3TC como ITRN(t) basal 109 (61,9%), seguindo-se 28 (15,9%) pacientes com TDF/AZT/3TC e 27 (15,3%) com AZT/3TC. Apenas 9 indivíduos (5,1%) não tinham ITRN(t)s no resgate terapêutico.

Os IPs estiveram presente no esquema de resgate em 99,4% dos indivíduos, apenas um paciente não fez uso de IP. Lopinavir/ritonavir (LPV/r) foi o mais prescrito (48,5%) seguido de atazanavir/ritonavir (ATV/r)(33,1%). Os INIs compuseram o esquema resgate em 35 (19,9%) indivíduos. Raltegravir (RAL) foi o mais usado (n=32). Quando o esquema resgate foi composto por duas drogas ativas (GSS=2), 79,5% dessa população mostravam genotipagem com menos de três MAR ITRN(t) (79,5% vs 20,5% para ≥ 3 MAR ITRN(t), $p < 0,000$).

A suscetibilidade da etravirina (ETR) não esteve associada ao uso do EFV ou da Nevirapina (NVP) nem ao número de MAR ITRNN. Manteve-se completamente ativa em 63,2% das sequências, entres os pacientes falhando ao uso de ITRNN. Encontramos suscetibilidade semelhante de AZT e TDF (64,2% vs 65,9%). Entre os usuários de IP/r, DRV/r apresentou o maior percentual de sensibilidade (69%), e ATV/r com maior percentual de resistência (79,3%).

A maioria dos esquemas de resgate tinha GSS igual a dois (42,6%) ou maior que dois (44,3%). Encontramos que, na maior parte dos esquemas com GSS maior que dois, o paciente esteve em FV por mais de 24 meses (46% vs 30,8% para Δt em FV 12-24 meses vs 23,2% para Δt FV < 12 meses, $p=0,013$) e em ARV por mais de 36 meses (76,9% vs 23,1% para Δt em ARV 36 meses, $p=0,004$).

Quando a FV ocorreu na vigência de LPV/r, o GSS da segunda linha da terapia foi significativamente maior que dois (85,7% vs 14,3% para GSS=2 vs 0% para GSS<2, $p=0,001$). A maior parte dos usuários de TDF na FV foi significativamente resgatada com esquema ARV com GSS igual a dois. (62,2% vs 27,0% para GSS>2 vs 10,8% para GSS<2, $p=0,023$).

7.1.3 Fatores preditores de carga viral indetectável e variação de CD4 após 48 semanas do início do esquema resgate

Dos 176 pacientes com prescrição da terapia de resgate documentada, conseguimos registro do valor de carga viral após 48 semanas da troca de ARV de 159 (90,3%). Desses, 67,3% ($n=107$) atingiram supressão virológica e 11,3% não alcançaram carga viral indetectável, mas ficaram abaixo de 400 cópias/ml.

A maior parte dessa população esteve com mais de 36 meses em uso de ARVs até genotipagem (73,8% vs 26,2% para 36m, $p=0,022$) e 42,0% estiveram de 12 a 24 meses em FV (42,0% vs 34,6 % para > 24m vs 23,4% para <12m, $p=0,029$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Características relacionadas com o esquema resgate, tempo em ARV e tempo em falha virológica associadas à supressão virológica após 48 semanas do início do esquema de resgate

Carga Viral (CV)					
Características	Detectável	Indetectável	RP	RP IC95%	p-valor
	n (%)	n (%)			
Δt em FV (meses)					0,029 *
<12	22 (42,3)	25 (23,4)	1,00	–	
12-24	13 (25,0)	45 (42,0)	0,48	0,27 – 0,84	
>24	17 (32,7)	37 (34,6)	0,67	0,41 – 1,11	
Δt em ARV (meses)					0,022 *
≤36	23 (44,2)	28 (26,2)	1,00	–	
>36	29 (55,8)	79 (73,8)	0,60	0,39 – 0,92	
ARV resgate ITRN(t)					0,711 **
TDF/3TC	36 (69,2)	62 (57,9)	1,00	–	
AZT/3TC	7 (13,5)	18 (16,8)	0,76	0,39 – 1,50	
TDF/AZT/3TC	7 (13,5)	19 (17,8)	0,73	0,37 – 1,45	
DDI/3TC	0 (0,0)	1 (0,9)	–	–	
ABC/3TC	1 (1,9)	1 (0,9)	1,36	0,33 – 5,58	
SEM ITRN(t)	1 (1,9)	6 (5,6)	0,39	0,00 – 2,43	
ARV resgate IP					0,013 **
LPV/r	24 (46,1)	55 (51,5)	2,13	0,71 – 6,39	
ATV/r	20 (38,5)	33 (30,8)	2,64	0,88 – 7,96	
DRV/r	3 (5,8)	18 (16,8)	1,00	–	
FPV/r	5 (9,6)	1 (0,9)	5,83	1,93 – 17,65	
ARV resgate com RAL					0,050 *
Sim	5 (9,6)	24 (22,4)	1,00	–	
não	47 (90,4)	83 (77,6)	2,10	0,91 – 4,81	
GSS					0,947 *
<2	8 (15,4)	15 (14,0)	1,11	0,57 – 2,14	
2	22 (42,3)	44 (41,1)	1,06	0,65 – 1,72	
>2	22 (42,3)	48 (44,9)	1,00	–	

*Teste Qui-Quadrado **Teste Exato de Fisher; RP: razão de prevalência; IC: Intervalo de confiança; Δt em ARV- tempo em antirretroviral até realização de genotipagem; ITRN(t): inibidor da transcriptase reversa Nucleos(t)ídeo; AZT: zidovudina; TAM: mutação análoga timidina; 3TC: lamivudina; TDF: tenofovir; ITRNN: inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídeo; IP: inibidor de protease; LPV/r: lopinavir/ritonavir; ATV/r- atazanavir/ritonavir; DRV/r: Darunavir/ritonavir; FPV/r: fosamprenavir/ritonavir; GSS: escore de sensibilidade genotípica.

O número de MAR ITRN(t) não impactou na supressão virológica (9,3% para zero MAR ITRN(t) vs 48,6% para 1<3 MAR ITRN(t) vs 42,1% para 3 MAR ITRN(t)) (Tabela 5).

Tabela 5 – Características genótípicas e imunoviroológicas no momento da genotipagem associadas à supressão virológica após 48 semanas do início do esquema resgate

Carga Viral (CV)					
Características	Detectável	Indetectável	RP	RP IC95%	p-valor
	n (%)	n (%)			
Idade (anos)					0,662 *
18-30	6 (11,5)	13 (12,2)	0,92	0,45 – 1,86	
31-50	40 (76,9)	76 (71,0)	1,00	–	
>50	6 (11,5)	18 (16,8)	0,73	0,35 – 1,52	
Sexo					0,385 *
Masculino	36 (69,2)	81 (75,7)	0,81	0,50 – 1,29	
Feminino	16 (30,8)	26 (24,3)	1,00	–	
CV na genotipagem (cópias/ml)					0,752 *
≤10.000	18 (35,3)	36 (34,3)	1,00	–	
>10.000 a 100.000	20 (39,2)	47 (44,7)	0,90	0,53 – 1,52	
>100.000	13 (25,5)	22 (21,0)	1,11	0,63 – 1,98	
CD4 na genotipagem (cells/mm³)					0,796 *
<200	20 (38,5)	45 (42,9)	0,95	0,54 – 1,66	
200-350	18 (34,6)	31 (29,5)	1,13	0,64 – 1,99	
>350	14 (26,9)	29 (27,6)	1,00	–	
Nº de MAR ITRN(t)					0,179 *
Zero	6 (11,6)	10 (9,3)	1,00	–	
<3	32 (61,5)	52 (48,6)	1,02	0,51 – 2,02	
≥3	14 (26,9)	45 (42,1)	0,63	0,29 – 1,38	
Nº de MAR ITRN(t) TAM					0,058 *
Zero	35 (67,3)	54 (50,4)	1,00	–	
<3	14 (26,9)	34 (31,8)	0,74	0,45 – 1,24	
≥3	3 (5,8)	19 (17,8)	0,35	0,12 – 1,02	
Nº de MAR ITRNN					0,113 *
≤2	32 (61,5)	79 (73,8)	1,00	–	
>2	20 (38,5)	28 (26,2)	1,45	0,93 – 2,25	
Nº MAR principal IP					1,000 **
≤2	4 (80,0)	14 (77,8)	1,00	---	
>2	1 (20,0)	4 (22,2)	0,90	0,13 – 6,35	
MAR M184V/I					0,693 *
Sim	44 (84,6)	93 (86,9)	1,00	---	
Não	8 (15,4)	14 (13,1)	1,13	0,62 – 2,07	

*Teste Qui-Quadrado **Teste Exato de Fisher; RP: razão de prevalência; IC: Intervalo de confiança; CD4- células T CD4; CV: carga viral; MAR: mutação associada à resistência; ITRN(t): inibidor da transcriptase reversa Nucleos(t)ídeo; TAM: mutação análoga de timidina; ITRNN: inibidor da transcriptase reversa não-nucleosídeo; IP - inibidor de protease.

Após a análise com o Modelo de Regressão de Poisson, estar com mais de 36 meses em ARV até genotipagem protegeu para carga viral detectável (RP= 0,6, IC 95%=0,39 – 0,92, p=0,02) (Tabela 6).

Tabela 6 – Modelo de Poisson para carga viral detectável após 48 semanas do início do esquema resgate

Variáveis	RP*	RP IC95%**	p-valor
*** Δt em ARV (meses)			
≤ 36	1,00	–	0,020
> 36	0,60	0,39 – 0,92	

* RP: razão de prevalência. ** Intervalo de confiança. *** Δt em ARV: tempo em terapia antirretroviral até genotipagem.

Para os 153 pacientes com CD4 após 48 semanas documentado, a mediana foi 376 cells/mm³ (Q1 246; Q3 553) e a mediana do ganho de CD4 foi 125 cells/mm³ (Q1 47; Q3 243). Na população com sucesso virológico, a variação acima de 100 cells/mm³ (CD4) foi significativa quando a CV no tempo da genotipagem esteve entre 10.000 a 100.000 c/ml (69,8% vs 30,2% para variação < 100 cells/mm³, p=0,047) e quando o CD4 no tempo da genotipagem abaixo de 200 cells/mm³ (81,4% vs 18,6% para CD4 < 100 cells/mm³ **p=0,010**).

7.2 Discussão

Após a avaliação de 184 testes de genotipagem de pacientes na primeira FV, foi encontrado maior prevalência do subtipo B, da MAR M184VI e K103NS, além de alta frequência do número de MAR para ITRN(t), TAMs e ITRNN, sem impacto na supressão virológica. Observamos que, predominantemente, o esquema de resgate foi composto por IP/r e ITRN(t)s com sucesso virológico na maioria dos casos.

O subtipo B permanece o mais comum em Pernambuco e no Brasil, exceto na região Sul, onde predomina o subtipo C (BRITES et al., 2016; CAVALCANTI et al., 2007; GRÄF et al., 2015; LACERDA et al., 2007; LIMA et al., 2016). Tem sido registrado um aumento na proporção de formas recombinantes no Rio de Janeiro e do subtipo F em Minas Gerais (DUANI; ALEIXO; TUPINAMBÁS, 2017; VELASCO-DE-CASTRO et al., 2014).

A elevada presença de mutação no códon M184 é esperada e surge em consequência do uso da lamivudina (3TC) no primeiro esquema de todos os participantes do estudo. Confere alto nível de resistência aos análogos citosina (lamivudina e emtricitabine), baixo nível de resistência ao abacavir (ABC) e aumenta suscetibilidade à zidovudina (AZT) e TDF. Além disso, diminui a capacidade replicativa

do HIV-1 (MELIKIAN et al., 2012; MILLER et al., 2004). Sua presença tem sido associada ao sucesso virológico (MATSUDA et al., 2017), porém esse dado não se reproduziu nesta pesquisa.

A alta prevalência da M184V/I também foi relatada em várias regiões do Brasil, na África Subsaariana e na Ásia, mas em menor proporção no oeste europeu (BRITES et al., 2016; DUANI; ALEIXO; TUPINAMBÁS, 2017; GREGSON et al., 2016; HAMERS et al., 2011; LOPES et al., 2015; SIVAMALAR et al., 2017). Essa diferença pode ser explicada pelo uso da emtricitabina em países europeus, e por lamivudina em nossos pacientes, e em cenários de baixa e média renda. No entanto, em recente metanálise, lamivudina e emtricitabina foram clinicamente equivalentes. Todas as sequências genotípicas do subtipo não-B (F e BF) tinham a MAR M184V/I, provavelmente pela alta prevalência dessa mutação e baixíssima frequência de subtipos não-B nesta amostra (FORD et al., 2013).

Foi elevada a prevalência de MAR TAMs, especialmente, a via mutacional TAM 1. Essa distribuição das TAMs é semelhante às apresentadas em outros estados brasileiros. Porém, foi menor do que o encontrado no estudo EuroSIDA, realizado em cenário de recursos limitados (BRITES et al., 2016; COZZI-LEPRI et al., 2009). É decorrente do predomínio de AZT no momento da genotipagem, já que TAMs emergem, principalmente, sob o uso do AZT e D4T, e imprimem resistência cruzada a outros ITRN(t)s (MELIKIAN et al., 2012; SHAFER; SCHAPIRO, 2008). Isso justifica a proximidade da taxa de sensibilidade do TDF e do AZT na genotipagem deste estudo.

No Brasil, a intensificação da prescrição do TDF ocorreu a partir de 2013, quando a dose fixada de TDF/3TC/EFV foi disponibilizada. O TDF compôs apenas 26,1% dos esquemas no momento da genotipagem, e a 65R emergiu em 27,1% dos usuários dessa droga. Esse achado é próximo ao observado pelo estudo TenoRes em cenário de alta renda, o qual ocorreu em 25% dos expostos a TDF. Quando o cenário foi a África Subsaariana, o estudo TenoRes encontrou uma prevalência que variou de 28% a 50% (GREGSON et al., 2016). É uma mutação discriminatória, selecionada primariamente pelo TDF, oferecendo resistência cruzada a outros ITRN(ts), exceto AZT. Nenhuma mutação de resistência relacionada pelo TDF compromete a suscetibilidade do AZT, fundamentando o uso do TDF como primeira linha da terapia. Foi rara a presença de mutações associadas à multirresistência, como o complexo 151M e a inserção 69. Certamente, características da amostra desta

pesquisa, contemplando genotipagem que correspondesse apenas à primeira FV, bem como a ausência de pacientes em uso de terapia dupla, explicam a ausência dessas MARs. A literatura admite que o complexo 151M pode ser encontrado em 5% dos casos expostos à combinação de DDI com AZT ou D4T (SHAFFER; SCHAPIRO, 2008), esquemas ARVs raramente vistos nos participantes do estudo.

Não ocorreu associação entre o número de MAR ITRN(t) e os ARVs usados no tempo da genotipagem, incluindo esquema ARV com ou sem TDF. Há estudos que mostram maior número de MAR entre os usuários de AZT e outros entre os de TDF (MATSUDA et al., 2017; VAN-ZYL et al., 2013; VON WYL et al., 2012). No entanto, são pesquisas com populações de características diferentes, especialmente na prevalência de subtipo.

Não está definida na literatura se esquemas com AZT ou com TDF influenciam o número de MAR. A associação entre elevado número de MAR ITRN(t) com CD4 pré-ARV e no tempo de genotipagem menores que 200 cells/mm³ sugere diagnóstico tardio de PVHIV em nossa população e baixa adesão ao tratamento, com impacto no perfil genotípico. Esses fatores não se mantiveram significantes após análise com Modelo de Poisson. No entanto, a carga viral no momento da genotipagem acima de 10.000 cópias/ml foi independentemente associada a três ou mais MAR ITRN(t). Nesse contexto, o elevado número de mutação é decorrente da alta taxa de replicação viral, facilitando os erros que naturalmente ocorrem na TR. É possível acumular uma mutação na transcriptase reversa a cada ciclo replicativo (ABRAM et al., 2010).

A K103NS foi documentada na maior parte das sequências genotípicas, decorrente do uso frequente do EFV como principal ITRNN na primeira linha por mais de uma década no Brasil. Esses achados são semelhantes a dados nacionais e de países de baixa e média renda (BRITES et al., 2016; HAMERS et al., 2011; MATSUDA et al., 2017; LA ROSA et al., 2016; PATON et al., 2014; SIVAMALAR et al., 2017). A suscetibilidade da ETR, um ITRNN de segunda geração, não foi influenciada pelo longo tempo sob FV em uso de EFV ou NVP, nem pelo número de MAR ITRNN. Essa análise foi prejudicada pelo pequeno número de usuários de NVP no momento da FV. Entretanto, alguns estudos mostraram que esquemas ARVs contendo NVP tem repercutido na resposta da ETR, por selecionar a Y181C and G190A, enquanto a K103 associado ao EFV não interfere na suscetibilidade da ETR (KIERTIBURANAKUL et al., 2010; STEVENS et al., 2009; TAIWO et al., 2010).

Observou-se que a presença de MAR ITRN(t)s ou MAR TAMs na primeira falha virológica não interferiu na supressão virológica após 48 semanas da troca para esquema resgate com ITRN(t)s associado a IP/r. Esse achado não se deve apenas à alta potência do IP/r e nem à atividade direta dos ITRN(t)s, podendo refletir um efeito dos ITRN(t)s na aptidão viral (PATON et al., 2015). Esse dado vai ao encontro de resultados de três grandes ensaios clínicos randomizados, nos quais pacientes com extensa resistência na transcriptase reversa evoluíram com sucesso virológico após resgate baseado em ITRN(t) com IP/r (BOYD, 2013; LA ROSA et al., 2016; PATON et al., 2014).

A mediana do tempo em ARVs até genotipagem foi semelhante a estudos recentes no Brasil, África e Europa (LAM et al., 2016; MATSUDA et al., 2017). Após a análise com Modelo de Regressão de Poisson permanecer em ARV por mais de 36 meses até genotipagem, foi o único fator que impactou na resposta virológica após 48 semanas do resgate terapêutico, surgindo como proteção para carga viral detectável. Para compreender melhor o impacto do tempo em ARV no sucesso virológico, fatores que poderiam influenciar na adesão ao tratamento necessitariam ser identificados e controlados, já que a principal causa de falha virológica adquirida é a má adesão ao ARV (HORIZONS, 2004).

O menor tempo em ARV é usado como melhor cenário para aderência no cálculo da razão de chances em estudos que buscam entender os fatores de risco para adesão ao tratamento. No entanto, após testes de associação, nem sempre se confirma seu impacto na aderência (SHIGDEL et al., 2014). Esse fato ocorre provavelmente porque a aderência é um comportamento dinâmico e oscila ao longo do tempo para um mesmo indivíduo, sofrendo interferência de fatores diversos como os psicossociais, dos ARVs e do cenário clínico. Isso justifica por que o tempo em ARV pode ser fator de risco ou protetor para má adesão com impacto no sucesso virológico (HORIZONS, 2004).

Em contrapartida, mais de 36 meses em ARV aumentou o risco para seleção de três ou mais MAR ITRN(t), embora o maior tempo em FV não tenha gerado o mesmo desfecho. Pelo critério de FV deste estudo, indivíduos com baixo nível de viremia (menor que 1.000 cópias/mL) não foi considerado em FV, uma vez que os testes de genotipagem disponíveis no Brasil no período de coleta dos dados não eram capazes de ampliar o material genético. Porém, há evidência de que carga viral acima de 200 cópias/mL aumenta risco para FV e pode acumular mutações

(VANDENHENDE et al., 2015). Então, é possível que muitos indivíduos sob longo tempo em ARV (mais de 36 meses) tivessem baixo nível de viremia, mas não foram diagnosticados com falha virológica, acumulando mutações.

Não ocorreu diferença na resposta virológica entre esquemas com GSS individual menor que dois e maior ou igual a dois, ratificando a hipótese que não há diferença entre ITRN(t)s ativos, parcialmente ativos ou inativos na composição do esquema de resgate para o sucesso virológico (PATON et al., 2015). No estudo *EARNEST*, no grupo sem ITRN(t)s ativos, a supressão da carga viral foi pelo menos tão boa quanto a de um regime contendo um fármaco totalmente ativo de uma nova classe (raltegravir) e foi superior ao obtido com o inibidor de protease usado sozinho (PATON et al., 2014).

É possível que características farmacocinéticas otimizem os benefícios de ITRN(t)s mesmo inativos. Assim, ARVs, como TDF e lamivudina, com meia-vida longa intracelular, possam ajudar o IP/r a manter supressão viral. Esse efeito é independente de atividade da droga (PATON et al., 2017).

Foi definido o tempo em FV até a troca para esquema resgate. Surpreendentemente, a maioria dos que indetectaram carga viral esteve por mais de doze meses em FV. Como o tempo em FV não interferiu no número de MAR ITRN(t) e de MAR TAM neste estudo, é possível sugerir que as MAR emergiram nos primeiros meses de FV. No estudo EuroSIDA, um elevado número de MAR TAM 1 foi observado em um ano de falha, com uma taxa de acumulação inferior à prevista entre aqueles que mantiveram o esquema de falha por mais de um ano (COZZI-LEPRI et al., 2009).

A ausência total de pressão seletiva dos ARVs durante parte do período em FV é outra possibilidade para justificar que o maior tempo em FV não tenha influenciado no número de MAR ITRN(t) e TAMs. A retirada completa dos ARVs gera menos MAR do que a manutenção de doses subterapêuticas (BAXTER; CHASANOV, 2016). Não foi possível conferir se os participantes desta pesquisa mantiveram-se em doses subterapêuticas ou se abandonaram completamente o tratamento quando em FV.

Os IPs apareceram pouco no primeiro esquema, já que foram utilizados como terapia alternativa aos ITRNNs no período do estudo. Após a primeira FV, o DRV/r foi o IP com maior suscetibilidade e o ATV/r o com maior resistência; seguramente, por ter caminhos mutacionais diferentes. O ATV/r seleciona primariamente a 50L que não compromete o DRV/r. Este é o IP mais novo e tem alta barreira genética, além de menos efeitos adversos comparados com o LPV/r, tendo atividade mesmo com

mutação na protease (MOLINA et al., 2007). Entretanto, quando a protease não está íntegra, é fundamental a adição de uma nova classe de ARV. Essa classe com frequência tem sido o INI (GRINSZTEJN et al., 2007).

Ao analisar resposta virológica e os ARVs usados no esquema resgate, notamos que não houve diferença entre quem usou AZT ou TDF ou ambos. O uso do LPV/r foi significativo entre os que alcançaram sucesso virológico, provavelmente por ser o IP mais prescrito no período do estudo, por orientação do MS. A maioria dos usuários de DRV/r ou de RAL atingiu sucesso virológico, apesar de serem em pequeno número absoluto. É importante salientar que este estudo não foi desenhado para avaliar o poder individual de cada esquema.

Entre aqueles que conseguiram CV indetectável, foi significativo o aumento de CD4 acima de 100 cells/mm³ nos indivíduos com CD4 no momento da genotipagem abaixo de 200 cells/mm³, sugerindo que o fator de adesão à ARV pode ter sido fundamental para o ganho imunológico, mesmo naqueles pacientes com baixa reserva imunológica e extensa resistência na TR. Além disso, a presença de comorbidades, no momento do resgate terapêutico, não relatadas nesta pesquisa, pode ter interferido no ganho imunológico.

A principal limitação da pesquisa foi a dificuldade em estabelecer associações de causa e efeito, por ser um estudo transversal. Os resultados podem ter sido afetados por dados que não foram coletados, especialmente relacionados com a aderência aos ARVs, e por perdas de informações em algumas variáveis. No entanto, há pontos relevantes, uma vez que atualiza dados genotípicos de uma importante região do Brasil. Além disso, conseguimos estabelecer o tempo em FV, o esquema ARV antes e depois da genotipagem na primeira FV, bem como os fatores associados ao número de MAR ITRN(t) e ao sucesso virológico.

8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

8.1 Conclusões

Na primeira falha virológica, observamos:

- Maior prevalência de mutação M184VI e K103NS, bem como do subtipo B.
- No momento da genotipagem, a carga viral acima de 10.000 cópias/ml foi o fator que ofereceu maior chance de desenvolver três ou mais MAR ITRN(t).
- Foi elevada a prevalência de MAR TAMs, especialmente, a via mutacional TAM 1, porém sem impacto no sucesso terapêutico após esquema de resgate.
- Foi predominante esquemas de resgate com GSS igual a dois ou maior que dois. No entanto, o valor do GSS não impactou na supressão virológica 48 semanas após resgate terapêutico.
- Mutações mais prevalentes para ETR ocorreram no códon 101 e 190. O uso prévio de EFV ou NVP não influenciou a sensibilidade da ETR, que foi comparável à da literatura, apesar de elevados índices de resistência ao EFV e a NVP.
- A sensibilidade do TDF e AZT foram semelhantes.
- Tempo em ARV maior que 36 meses foi fator protetor independente para desenvolvimento de carga viral detectável após 48 semanas do início do esquema resgate, apesar de ter aumentado risco para selecionar três ou mais MAR ITRN(t).

8.2 Considerações finais

Este estudo analisou testes de genotipagem realizados entre 2006 e 2016. Durante mais da metade desse período de coleta, o acesso ao teste genotípico era difícil e, portanto, muitas trocas sem genotipagem foram realizadas, levando a uma perda grande na amostra. Apesar dessa dificuldade, foi possível analisar um número significativo de sequências, demonstrando um perfil genotípico na primeira falha virológica com extensa resistência na TR. Entretanto, o elevado número de mutação associada à ITRN(t) não impactou no sucesso virológico após resgate terapêutico

com IP/r e ITRN(t)s, sugerindo que esta classe de ARV possa apresentar atividade na aptidão viral, e não uma ação direta da droga. É possível concluir que, mesmo o ITRN(t) inativo ou parcialmente ativo, funciona comparável com um ARV de nova classe completamente ativo.

Além disso, foi encontrado que estar em ARV por mais de 36 meses até genotipagem funcionou como fator protetor independente para carga viral detectável.

Para compreensão adequada deste achado, seria importante identificar e controlar variáveis relacionadas com a adesão, já que este é o principal fator de risco para falha virológica. Quando o tempo em ARV é associado à má adesão, impacta indiretamente no sucesso virológico. No entanto, o desenho retrospectivo desta pesquisa não possibilitou que se identificassem fatores relacionados com a aderência.

Diante dos principais resultados desta análise, duas questões surgiram. A primeira: há necessidade de realização de teste de genotipagem após primeira falha virológica à ITRN(t)s e ITRNN com resgate baseado em IP/r e ITRN(t)? Os estudos que demonstram evidência de custo-benefício do teste genotipagem foram realizados após falha virológica aos IPs. É necessária uma pesquisa direcionada a avaliar o custo-benefício desse exame após falha virológica à ITRN(t)s+ITRNN.

A segunda questão é a necessidade de realizar estudos utilizando ponto de corte para falha virológica abaixo de 1.000 cópias/ml, já que atualmente há tecnologia disponível para esta finalidade, bem como controlar os fatores relacionados com a adesão, que agem como confundidores na compreensão dos fatores associados ao sucesso terapêutico.

REFERÊNCIAS

- ABRAM, M. E. et al. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 9864-9878, Oct. 2010.
- ACHAPPA, B. et al. Immunological response after initiation of second line anti-retroviral therapy in HIV patients. **Retrovirology**, v. 9, n. Suppl 1, Mayo 2012.
- AMIN, J. et al. Raltegravir non-inferior to nucleoside based regimens in second-line therapy with lopinavir/ritonavir over 96 weeks: A randomised open label study for the treatment of HIV-1 infection. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1-13, Feb. 2015.
- ANSTETT, K. et al. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. **Retrovirology**, v. 14, n. 1, p. 36, Jun. 2017.
- ARION, D. et al. Phenotypic mechanism of HIV-1 resistance to 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): increased polymerization processivity and enhanced sensitivity to pyrophosphate of the mutant viral reverse transcriptase. **Biochemistry**, v. 37, n. 45, p. 15908-15917, 1998.
- ASSOUMOU, L. et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in treated patients with viral load >50 copies/mL: a 2014 French nationwide study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 6, p. 1769-1773, Jun. 2017.
- AYOUBA, A. et al. HIV-1 group N among HIV-1 seropositive individuals in Cameroon. **AIDS**, v. 14, n. 16, p. 2623-2625, Nov. 2000.
- BAKER, H. C. L. J. V. et al. Systemic inflammation, coagulation, and clinical risk in the START trial. INSIGHT START STUDY GROUP. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 5-8, Nov. 2017.
- BARRÉ-SINOUSSE, F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patients at risk for acquired immune deficiency syndrome. **Science**, v. 220, n. 4599, p. 868-871, May 1983.
- _____. HIV as the cause of AIDS. **The Lancet**, v. 348, n. 9019, p. 31-35, Jul. 1996. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/article/S0140673696090587/fulltext>>. Acesso em: 11 ago. 2016.
- BAXTER, J. et al. Global HIV-1 transmitted drug resistance in the INSIGHT Strategic Timing of AntiRetroviral Treatment trial. **HIV Medicine**, v. 16, n. 1, Supl. 1, p. 77-87, Apr. 2015.
- BAXTER, J. D.; CHASANOV, W. M. An Update on HIV-1 protease inhibitor resistance. **Journal of AIDS and Clinical Research**, v. 7, n. 6, p. 1-7, Mayo 2016.
- BAXTER, J. D.; KUMAR, P.; RUANE, P. M. Enhanced susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to tipranavir in treatment-experienced patients. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 18, n. 6, p. 359-366, Nov. 2010.

BLANCO, J. L.; OLDENBUETTEL, C.; THOMAS, R. Pathways of resistance in subjects failing dolutegravir monotherapy. In: CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS, 2017, Seattle, WA. **Abstract**, n. 42, Feb. 2017. Disponível em: <<http://www.croiwebcasts.org/p/2017croi/croi33379>>. Acesso em: 13 dez. 2017.

BOYD, M. Ritonavir-boosted lopinavir plus nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors versus ritonavir-boosted lopinavir plus raltegravir for treatment of HIV-1 infection in adults with virological failure of a standard first-line ART regimen (SECOND-LINE): a randomised, open-label, non-inferiority study. **Lancet**, v. 381, n. 9883, p. 2091-2099, Jun. 2013.

BOYD, M.; EMERY, S.; COOPER, D. A. Antiretroviral roll-out: the problem of second-line therapy. **Lancet**, v. 374, n. 9685, p. 185-186, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, 2013. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_manejo_hiv_adultos.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2017.

_____. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos**. Brasília, 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/tags/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas>>. Acesso em: 2 dez. 2017.

BRITES, C. et al. Extensive variation in drug-resistance mutational profile of Brazilian patients failing antiretroviral therapy in five large Brazilian cities. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 4, p. 323-329, Jul. 2016.

BRITO, A. et al. Women infected with HIV type 1 Brazilian variant, subtype B (B'-GWGR motif) have slower progression to AIDS, compared with patients infected with subtype B (B-GPGR motif). **Clinical Infectious Disease Journal**, v. 43, n. 11, p. 1476-1481, Dic. 2006.

BRUMME, Z. L. et al. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 3, p. 466-474, Ago. 2005.

CAHN, P. et al. Week 48 analysis of once-daily vs. twice-daily darunavir/ritonavir in treatment-experienced HIV-1-infected patients. **AIDS Patient Care and STDs**, v. 25, n. 7, p. 929-939, Apr. 2011.

CAHN, P. et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integraseinhibitor-naïve adults with HIV: Week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. **Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 700-708, Ago. 2013.

CAMPBELL, T. B.; SMEATON, L. M.; KUMARASAMY, N. Efficacy and safety of three antiretroviral regimens for initial treatment of HIV-1: a randomized clinical trial in diverse multinational settings. **PLoS Med**, v. 9, n. 8, p. e1001290, Ago. 2012.

CAVALCANTI, A. M. S. et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the Northeast Region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 785-792, Nov. 2007.

CAVALCANTI, A. M. S. et al. Primary resistance of HIV to antiretrovirals among individuals recently diagnosed at voluntary counselling and testing centres in the metropolitan region of Recife, Pernambuco. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 450-457, Jun. 2012.

CB, H. et al. Resistance to HIV integrase strand transfer inhibitors among clinical specimens in the United States, 2009-2012. **Clinical Infectious Disease Journal**, v. 58, n. 3, p. 424-431, Feb. 2014.

CHURCHILL, D. et al. **BHIVA guidelines for the treatment of HIV-1- positive adults with antiretroviral therapy**. British HIV Association, 2015. 1-114 p.
Disponível em: <<http://www.bhiva.org/documents/Guidelines/Treatment/2015/2015-treatment-guidelines.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

CINGOLANI, A. et al. Usefulness of monitoring HIV drug resistance and adherence in individuals failing highly active antiretroviral therapy: a randomized study (ARGENTA). **AIDS Patient Care and STDs**, v. 16, n. 3, p. 369-379, Feb. 2002.

CORBEAU, P.; REYNES. Review article Immune reconstitution under antiretroviral therapy: the new challenge in HIV-1 infection. **Therapy**, v. 117, n. 21, p. 5582-5590, 2011.

COZZI-LEPRI, A. et al. Rate of accumulation of thymidine analogue mutations in patients continuing to receive virologically failing regimens containing zidovudine or stavudine: implications for antiretroviral therapy programs in resource-limited settings. EuroSIDA Study Group. **Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 5, p. 687-697, Sept. 2009.

DD, H. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123-126, Jan. 1995.

DELATORRE, E. et al. Tracing the origin and northward dissemination dynamics of HIV-1 subtype C in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2013.

DENG, H. et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. **Nature**, v. 381, p. 661-665, Jun. 1996.

DHHS. Department of Health and Human Services. **Guidelines for the use of antiretroviral agents in adults and adolescents living with HIV**. New York, 2017.
Disponível em: <<http://www.aidsinfo.nih.gov/ContentFiles/AdultandAdolescentGL.pdf>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

DORANZ, B. J. et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the b-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. **Cell**, v. 85, n. 7, p. 1149-1158, 1996.

DUANI, H.; ALEIXO, A. W.; TUPINAMBÁS, U. Trends and predictors of HIV-1 acquired drug resistance in Minas Gerais, Brazil: 2002–2012. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 148-154, Mar. 2017.

DURANT, J. et al. Importance of protease inhibitor plasma levels in HIV-infected patients treated with genotypic-guided therapy: pharmacological data from the Viradapt Study. **AIDS**, v. 14, n. 10, p. 1333-1339, Jul. 2000.

EACS. European AIDS Clinical Society. **Guideline 8.2 January 2017**: english. Brussels, Belgium, 2017. 96 p. Disponível em: <http://www.eacsociety.org/files/guidelines_8.2-english.pdf>. Acesso em: 2 out. 2017.

EASTBURN, A. et al. Association of low level viremia with inflammation and mortality in HIV-infected adults. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, e26320, 2011.

ESNOUF, R. M. et al. Unique features in the structure of the complex between HIV-1 reverse transcriptase and the bis(heteroaryl)piperazine (BHAP) U-90152 explain resistance mutations for this nonnucleoside inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 3984-3989, Apr. 1997.

FARIA, N. R. et al. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 56-61, Oct. 2014.

FÄTKENHEUER, G. et al. Subgroup analyses of maraviroc in previously treated R5 HIV-1 infection. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 14, p. 1442-1455, Oct. 2008.

FEHR, J. et al. Replicative phenotyping adds value to genotypic resistance testing in heavily pre-treated HIV-infected individuals - the Swiss HIV Cohort Study. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 14, p. 1-9, Jan. 2011.

FORD, N. et al. Comparative efficacy of lamivudine and emtricitabine: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1-7, Nov. 2013.

FRANSEN, S. et al. Substitutions at amino acid positions 143, 148, and 155 of HIV-1 integrase define distinct genetic barriers to raltegravir resistance in vivo. **Journal of Virology**, v. 86, n. 13, p. 7249-7255, Jul. 2012.

FREIBERG, M.S. et al. Infectious Disease Clinical Research Program HIV Working Group. D-dimer levels before HIV seroconversion remain elevated even after viral suppression and are associated with an increased risk of non-AIDS events. **PLoS One**, v. 11, e0152588, Apr. 2016.

FRIEDMAN, E. et al. **A single monotherapy dose of MK-8591, a novel NRTI, suppresses HIV for 10 days**. In: CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS (CROI), 2016, Boston, Massachusetts. Disponível em: <http://natap.org/2016/CROI/croi_09.htm>. Acesso em: 6 jan. 2018.

FROST, S. D. W. et al. Evolution of Lamivudine resistance in human immunodeficiency virus type 1-Infected Individuals: the relative roles of drift and selection. **Journal of Virology**, v. 71, n. 14, p. 6262-6268, Jul. 2000.

GAO, F. et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. **Nature**, v. 397, p. 436-441, Feb. 1999.

GARCÍA-GASCÓ, P. et al. Episodes of low-level viral rebound in HIV-infected patients on antiretroviral therapy: frequency, predictors and outcome. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 699-704, Mar. 2008.

GRÄF, T.; PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 170-178, Jan. 2013.

GRÄF, T. et al. Contribution of epidemiological predictors in unraveling the phylogeographic history of HIV-1 Subtype C in Brazil. **Journal of Virology**, v. 89, n. 24, p. 12341-2348, Dez. 2015.

GREGSON, J. et al. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 565-575, Mayo 2016.

GRINSZTEJN, B. et al. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9569, p. 1261-1269, Apr. 2007.

GULICK, R. M. et al. Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. **New England Journal Medicine**, v. 359, n. 19, p. 1429-1441, Oct. 2008.

HADDAD, M.; NAPOLITANO, L.; PAQUET, A. **Mutation Y188L of HIV-1 reverse transcriptase is strongly associated with reduced susceptibility to rilpivirine.** In: CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS, 19, 2012, Seattle, WA, Mar. 2012.

HAHN, B. H. et al. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 607-614, Jan. 2000.

HAMERS, R. L. et al. HIV-1 drug resistance in antiretroviral-naïve individuals in sub-Saharan Africa after rollout of antiretroviral therapy: a multicentre observational study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 750-759, Oct. 2011.

HAMERS, R. L. et al. Patterns of HIV-1 drug resistance after first-line antiretroviral therapy (ART) failure in 6 sub-saharan african countries: implications for second-line ART strategies. **Clinical Infectious Disease Journal**, v. 54, n. 11, p. 1660-1669, 2012.

HARTLEY, O. et al. V3: HIV's switch-hitter. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 21, n. 2, p. 171-189, Feb. 2005.

HAUBRICH, R. et al. Week 24 efficacy and safety of TMC114/ritonavir in treatment-experienced HIV patients. **AIDS**, v. 21, n. 6, F11-8, Mar. 2007.

HIGHTOWER, K. E. et al. Dolutegravir (S/GSK1349572) exhibits significantly slower dissociation than raltegravir and elvitegravir from wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-1 integrase-DNA complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4552-4559, Oct. 2011.

HOFSTRA, L. M. et al. Transmission of HIV drug resistance and the predicted effect on current first-line regimens in Europe. **Clinical Infectious Disease Journal**, v. 62, n. 5, p. 655-663, Mar. 2015.

HORIZONS. Population Council. International Centre for Reproductive Health and Coast Province General Hospital, Mombasa-Kenya. **Adherence to antiretroviral therapy in adults: a guide for trainers**. Nairobi: Population Council. 2004. Disponível em: <<http://www.popcouncil.org/uploads/pdfs/horizons/mombasaarvtrainingguide.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

HUANG, W. et al. Multiple genetic pathways involving amino acid position 143 of HIV-1 integrase are preferentially associated with specific secondary amino acid substitutions and confer resistance to raltegravir and cross-resistance to elvitegravir. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4105-4113, Sept. 2013.

HUMPHREYS, E. H.; CHANG, L. W.; HARRIS, J. Antiretroviral regimens for patients with HIV who fail first-line antiretroviral therapy. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 16, n. 6, p. 1-16, Jun. 2010.

HUMPHREYS, E. H.; HERNANDEZ, L. B.; RUTHERFORD, G. W. Antiretroviral regimens for patients with HIV who fail first-line antiretroviral therapy. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v. 17, n. 4, p. 1-5, Oct. 2007.

HUNT, P. W. HIV and inflammation: mechanisms and consequences. **Current HIV/AIDS Reports**, v. 9, n. 2, p. 139-147, 2012.

_____. et al. Prevalence of CXCR4 tropism among antiretroviral-treated HIV-1-infected patients with detectable viremia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 7, p. 926-930, Oct., 2006.

IMAMICHI, T. et al. High-level resistance to 3'-Azido-2',3'-Deoxythymidine due to a deletion in the reverse transcriptase gene of human immunodeficiency virus type 1. **Journal of Virology**, v. 74, n. 2, p. 1023-1028, Jan. 2000.

INSIGHT START STUDY GROUP. Initiation of antiretroviral therapy in early asymptomatic hiv infection. **New England Journal Medicine**, v. 373, n. 9, p. 795-807, 2015.

JAPOUR, A. J. et al. Standardized peripheral blood mononuclear cell culture assay for determination of drug susceptibilities of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 5, p. 1095-1101, Mayo 1993.

- JIANG, X. et al. Characterizing the diverse mutational pathways associated with R5-tropic maraviroc resistance: HIV-1 that uses the Drug-Bound CCR5 Coreceptor. **Journal of Virology**, v. 89, n. 22, p. 11457-11472, Nov. 2015.
- KANTERS, S. et al. Comparative efficacy and safety of second-line antiretroviral therapy for treatment of HIV/AIDS: A systematic review and network meta-analysis. **Lancet HIV**, v. 4, n. 10, p. 433-441, Oct. 2017.
- KATLAMA, C. et al. Efficacy and safety of TMC114/ritonavir in treatment-experienced HIV patients: 24-week results of POWER 1. **AIDS**, v. 4, n. 10, p. 395-402, Feb. 2007.
- KIERTIBURANAKUL, S. et al. Using of nevirapine is associated with intermediate and reduced response to etravirine among HIV-infected patients who experienced virology failure in a resource-limited setting. **Journal of Clinical Virology**, v. 47, n. 4, p. 330-334, Apr. 2010.
- KOLOMEETS, A. N. et al. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. **AIDS**, v. 28, n. 17, p. 1-8, Nov. 2014.
- KORBER, B. et al. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. **British Medical Bulletin**, v. 58, n. 1, p. 19-42, Sept. 2001.
- KOZAL, M. Cross-resistance patterns among HIV protease inhibitors. **AIDS Patient Care and STDS**, v. 18, n. 4, p. 199-208, Apr. 2004.
- KULLER, L. H. et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with hiv infection. INSIGHT SMART Study Group. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1496-1508, Oct. 2008.
- LACERDA, H. R. et al. Comparison of the epidemiology, profile of mutations, and clinical response to antiretrovirals among subtypes B and F of the human immunodeficiency virus type 1. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 6, p. 693-699, Sept. 2007.
- LAM, E. P. et al. Antiretroviral resistance following first-line antiretroviral therapy failure in diverse HIV-1 subtypes in the SECOND-LINE study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 32, n. 9, p. 1-26, Sept. 2016.
- LARDER, B. A. et al. A family of insertion mutations between codons 67 and 70 of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase confer multinucleoside analog resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 1961-1967, Ago. 1999.
- LA ROSA, A. L. et al. Raltegravir in second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings (SELECT): a randomised, phase 3, non-inferiority study. **Lancet HIV**, v. 3, n. 6, p. 247-258, Jun. 2016.

- LAZZARIN, A. et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-2: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 370, n. 9581, p. 39-48, Jul. 2007.
- LEAL, E. et al. Molecular and structural characterization of HIV-1 subtype B Brazilian isolates with GWGR tetramer at the tip of the V3-loop. **Virology**, v. 381, n. 2, p. 222-229, Nov. 2008.
- LEE, J. S. et al. Incomplete viral suppression and mortality in HIV patients after antiretroviral therapy initiation. **AIDS**, v. 31, n. 14, p. 1989-1997, Sept. 2017.
- LIMA, K. et al. Epidemiological, clinical and antiretroviral susceptibility characterization of human immunodeficiency virus subtypes b and non-b in Pernambuco, Northeast Brazil. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1-13, Mayo 2016.
- 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. 6-11, Sept. 2015.
- MADRUGA, J. V. et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-1: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 370, n. 9581, p. 29-38, Jul. 2007.
- MAEDA, K. et al. Delayed emergence of HIV-1 variants resistant to 4'-ethynyl-2-fluoro- 2'-deoxyadenosine: comparative sequential passage study with lamivudine, tenofovir, emtricitabine and BMS-986001. **Antiviral therapy**, v. 19, n. 2, p. 179-189, Oct. 2014.
- MAMMANO, F. et al. Retracing the evolutionary pathways of human immunodeficiency virus type 1 resistance to protease inhibitors: virus fitness in the absence and in the presence of drug. **Journal of Virology**, v. 74, n. 18, p. 8524-8531, Sept. 2000.
- MARGOLIS, D. A. et al. Long-acting intramuscular cabotegravir and rilpivirine in adults with HIV-1 infection (LATTE-2): 96-week results of a randomised, open-label, phase 2b, non-inferiority trial. **Lancet**, v. 390, n. 10101, p. 1499-1510, Sept. 2017.
- MATSUDA, E. M. et al. High prevalence of drug resistance mutations among patients failing first-line antiretroviral therapy and predictors of virological response 24 weeks after switch to second-line therapy in São Paulo State, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, p. 1-27, Nov. 2017.
- MELIKIAN, G. L. et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 12-20, Jan. 2014.

MELIKIAN, G. L. et al. Standardized comparison of the relative impacts of HIV-1 Reverse Transcriptase (RT) mutations on nucleoside RT inhibitor susceptibility. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 5, p. 2305-2313, Mayo 2012.

MENDOZA, C.; SORIANO, V. Resilience to resistance to HIV protease inhibitors: mechanisms and clinical consequences. *Current Drug Metabolism*, v. 5, n. 4, p. 321-328, Ago. 2004.

METIFIOT, M. et al. Elvitegravir overcomes resistance to raltegravir induced by integrase mutation Y143. *AIDS*, v. 25, n. 9, p. 1175-1178, Jun. 2011.

MEYER, S. D. et al. Confirmation of the negative impact of protease mutations I47V, I54M, T74P and I84V and the positive impact of protease mutation V82A on virological response to darunavir/ritonavir. *Antiviral Therapy*, v. 14, Jan. 2009.

MEYNARD, J. et al. Phenotypic or genotypic resistance testing for choosing antiretroviral therapy after treatment failure: a randomized trial. *AIDS*, v. 16, n. 5, p. 727-736, Mar. 2002.

MICHAILIDIS, E. et al. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine triphosphate, a translocation-defective reverse transcriptase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 51, p. 35681-35691, Dez. 2009.

MILLER, M. D. et al. Trends in HIV-1 reverse transcriptase resistance-associated mutations and antiretroviral prescription data from 2003-2010. *Antiviral Therapy*, v. 17, n. 6, p. 993-999, Jul. 2012.

MILLER, M. D. et al. Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. *Journal of Infectious Diseases*, v. 189, n. 5, p. 837-846, Mar. 2004.

MOLINA, J. M. et al. Safety and efficacy of darunavir (TMC114) with low-dose Ritonavir in Treatment-Experienced Patients 24-Week Results of POWER 3. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, v. 46, n. 1, p. 24-31, Sept. 2007.

MUFTUOGLU, Y. et al. Probing the molecular mechanism of action of the HIV-1 reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) using pre-steady-state kinetics. *Antiviral Research*, v. 106, p. 1-4, Jun. 2014.

MYINT, L. et al. Gag non-cleavage site mutations contribute to full recovery of viral fitness in protease inhibitor-resistant human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 2, p. 444-452, Feb. 2004.

NAKATA, H. et al. Activity against human immunodeficiency virus type 1, intracellular metabolism, and effects on human DNA polymerases of 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 8, p. 2701-2708, Ago. 2007.

OLIVEIRA, M. et al. M184I/V substitutions and E138K/M184I/V double substitutions in HIV reverse transcriptase do not significantly affect the antiviral activity of EFdA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 11, p. 3008-3011, Nov. 2017.

PATON, N. I. et al. Assessment of Second-Line Antiretroviral Regimens for HIV Therapy in Africa. **New England Journal Medicine**, v. 371, n. 3, p. 234-247, Jul. 2014.

PATON, N. et al. Impact of NRTI cross-resistance on second-line PI + NRTI therapy outcomes in Africa. In: CONFERENCE ON RETROVIRUS AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS, Seattle, WA, **Abstract**, n. 119, Feb. 2015. Disponível em: <<http://www.croiconference.org/sessions/impact-nrti-cross-resistance-second-line-pi-nrti-therapy-outcomes-africa>>. Acesso em: 10/11/2017.

PATON, N. I. et al. Nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance and outcomes from second-line antiretroviral therapy in the public health approach: an observational analysis within the randomised, open-label, EARNEST trial. **Lancet HIV**, v. 3018, n. 17, p. 341-348, Ago. 2017.

PEETERS, M. et al. Geographical distribution of HIV-1 group viruses in Africa. **AIDS**, v. 11, n. 4, p. 493-498, Mar. 1997.

PICCHIO, G. R. et al. Prevalence in the USA of rilpivirine resistance-associated mutations in clinical samples and effects on phenotypic susceptibility to rilpivirine and etravirine. **Antiviral Therapy**, v. 19, p. 819-823, 2014.

PIRES, A. et al. **Brazilian network for HIV drug resistance surveillance (HIV-BresNet) of naive-treatment individuals**: a cross sectional study. In: IAS CONFERENCE ON HIV SCIENCE, 9., 2017, Paris. Disponível em: <<http://www.ias2017.org>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

QUASHIE, P. K. et al. Characterization of the R263K mutation in HIV-1 integrase that confers low-level resistance to the second-generation integrase strand transfer inhibitor dolutegravir. **Journal of Virology**, v. 86, n. 5, p. 2696-26705, Mar. 2012.

RAMRATNAM, B. et al. The decay of the latent reservoir of replication-competent HIV-1 is inversely correlated with the extent of residual viral replication during prolonged anti-retroviral therapy. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 82-85, 2000.

RIMSKY, L. T.; SHUGARS, D. C.; MATTHEWS, T. J. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. **Journal of Virology**, v. 72, n. 2, p. 986-993, Feb. 1998.

RIMSKY, L. et al. Original article 96-Week resistance analyses of rilpivirine in treatment-naive , HIV-1-infected adults from the ECHO and THRIVE Phase III trials. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 8, p. 967-977, Mayo 2013.

RODGER, A. J. et al. Sexual activity without condoms and risk of HIV transmission in serodifferent couples when the HIV-positive partner is using suppressive antiretroviral therapy. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, v. 316, n. 2, p. 171-181, Jul. 2016.

RODRIGUES, R. et al. Low prevalence of primary antiretroviral resistance mutations and predominance of HIV-1 clade C at polymerase gene in newly diagnosed individuals from south Brazil. **Virus Research**, v. 116, n. 1, p. 201-207, 2006.

SALIE, Z. L. et al. Structural basis of HIV inhibition by translocation-defective RT inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 33, p. 9274-9279, Ago. 2016.

SHAFFER, R. W.; SCHAPIRO, J. M. HIV-1 drug resistance mutations: An updated framework for the second decade of HAART. **AIDS**, v. 10, n. 2, p. 67-84, Jun. 2008.

SHIGDEL, R. et al. Factors associated with adherence to antiretroviral therapy in HIV-infected patients in Kathmandu District, Nepal. **HIV/AIDS: Research and Palliative Care**, v. 6, p. 109-116, 2014.

SILVEIRA, J. et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 subtype C in southern Brazil. **Journal of Clinical Virology**, v. 54, n. 1, p. 36-41, Mayo 2012.

SIVAMALAR, S. et al. Accumulation of HIV-1 Drug Resistance Mutations After First-Line Immunological Failure to Evaluate the Options of Recycling NRTI Drugs in Second-Line Treatment: A Study from South India. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 3, p. 271-274, Mar. 2017.

SLUIS-CREMER, N. et al. E138A in HIV-1 reverse transcriptase is more common in subtype C than B: implications for rilpivirine use in resource- limited settings. **Antiviral Research**, v. 107, p. 31-34, Jul. 2014.

SMART STUDY GROUP. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. **New England Journal Medicine**, v. 355, n. 22, p. 2283-2296, Nov. 2006.

SOHL, C. D. et al. Mechanism of interaction of human mitochondrial DNA polymerase γ with the novel nucleoside reverse transcriptase inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine indicates a low potential for host toxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1630-1634, Mar. 2012.

STEVENS, W. S. et al. Will etravirine work in patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based treatment in southern Africa? **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 52, n. 5, p. 655-656, Dez. 2009.

SUCUPIRA, M. C. A. et al. High levels of primary antiretroviral resistance genotypic mutations and B/F recombinants in Santos, Brazil. **AIDS Patient Care STDS**, v. 21, n. 2, p. 116-28, Feb. 2007.

SUNGKANUPARPH, S. et al. HIV-1 drug resistance mutations among antiretroviralnaive HIV-1-infected patients in Asia: results from the TREAT Asia studies to evaluate resistance-monitoring study. **Clinical Infectious Disease Journal**, v. 52, n. 8, p. 1053- 1057, Apr. 2011.

TAIWO, B. et al. Suboptimal etravirine activity is common during failure of nevirapinebased combination antiretroviral therapy in a cohort infected with non-B subtype HIV-1. **Current HIV Research**, v. 8, n. 3, p. 194-198, Apr. 2010.

TAIWO, B. et al. Antiretroviral drug resistance in HIV-1-infected patients experiencing persistent low-level viremia during first-line therapy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 4, p. 515-520, Ago. 2011.

TAMIYA, S. et al. Amino acid insertions near gag cleavage sites restore the otherwise compromised replication of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to protease inhibitors. **Journal of Virology**, v. 78, n. 21, p. 12030-12040, Nov. 2004.

TAN, Q. et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. **Science**, v. 341, n. 6152, p. 1387-13890, Sept. 2013.

TANG, M. W.; SHAFER, R. W. HIV-1 antiretroviral resistance: scientific principles and clinical applications. **Drugs**, v. 72, n. 9, p. 1-25, Jun. 2012.

TEIXEIRA, P. R.; VITORIA, M. A.; BARCAROLE, J. Antiretroviral treatment in resource-poor settings: the brazilian experience. **AIDS**, v. 18, n. 3, p. 5-7, Jun. 2004.

TIEN, P. C. et al. Inflammation and mortality in HIV-infected adults: analysis of the FRAM study cohort. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 55, n. 3, p. 316-322, Nov. 2010.

TURAL, C. et al. Clinical utility of HIV-1 genotyping and expert advice: the Havana trial. **AIDS**, v. 16, n. 2, p. 209-218, Jan. 2002.

UNAIDS. **Global AIDS update**. 2016. Disponível em: <www.unaids.org/en/regionscountries/countries/brazil/>. Acesso em: 20 dez. 2016.

VALLARI, A. et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. **Journal of Virology**, v. 85, n. 3, p. 1403-1407, Feb. 2011.

VAN-ZYL, G. U. et al. Trends in genotypic hiv-1 antiretroviral resistance between 2006 and 2012 in South african patients receiving first- and second-line antiretroviral treatment regimens. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 687-697, Jun. 2013.

VANDAMME, A. M. et al. Laboratory guidelines for the practical use of HIV drug resistance tests in patient follow-up. **Antiviral Therapy**, v. 6, n. 1, p. 21-39, Mar. 2001.

VANDENHENDE, M. A. et al. Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients: the antiretroviral therapy cohort collaboration (ART-CC). **AIDS**, v. 29, n. 3, p. 373-383, Jan. 2015.

VELASCO-DE-CASTRO, C. A. et al. HIV-1 diversity and drug resistance mutations among people seeking HIV diagnosis voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-8, Jan. 2014.

VINGERHOETS, J. et al. Resistance profile of etravirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies. **AIDS**, v. 24, n. 4, p. 503-514, Feb. 2010.

VON-WYL, V. et al. Incidence of HIV-1 drug resistance among antiretroviral treatment-naïve individuals starting modern therapy combinations. **Clinical Infectious Disease Journal**, v. 54, n. 1, p. 131-140, Jan. 2012.

WALMSLEY, S. L. et al. Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. **New England Journal Medicine**, v. 369, n. 19, p. 1807-1818, Nov. 2013.

WALMSLEY, S. L. et al. Brief report: dolutegravir plus abacavir/lamivudine for the treatment of hiv-1 infection in antiretroviral therapy-naïve patients: week 96 and week 144 results from the single randomized clinical trial. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 70, n. 5, p. 515-519, Dez. 2015.

WEI, X. et al. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1896-1905, Jun. 2002.

WEINHEIMER, S. et al. Atazanavir signature I50L resistance substitution accounts for unique phenotype of increased susceptibility to other protease inhibitors in a variety of human immunodeficiency virus type 1 genetic backbones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3816-3824, Sept. 2005.

WENSING, A. M. et al. 2017 Update of the drug resistance mutations in HIV-1. **Topics in Antiviral Medicine**, v. 24, n. 4, p. 132-141, Dez. 2016.

WESENBEECK, L. V. et al. Cross-Resistance Profile Determination of Two Second-Generation HIV-1 Integrase Inhibitors Using a Panel of Recombinant Viruses Derived from Raltegravir-Treated Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 321-325, Jan. 2011.

WESTBY, M. et al. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. **Journal of Virology**, v. 359, n. 19, p. 4909-4920, Mayo 2006.

WHO. **Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection**: recommendations for a public health approach. 2. ed. 480 p. Geneva, 2016. Disponível em: <https://aidsfree.usaid.gov/sites/default/files/9789241549684_eng.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2017.

WHO. **HIV drug resistance report 2017**. 2017. 82 p. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255896/1/9789241512831-eng.pdf?ua=1>>. Acesso em: 10 nov. 2017.

XU, L. et al. Emergence and evolution of enfuvirtide resistance following long-term therapy involves heptad repeat 2 mutations within gp41. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1113-1119, Mar. 2005.

APÊNDICE A – FICHA DE COLETA DOS DADOS

Nome:

Prontuário:

Data de
Nascimento:

Data da
genotipagem:

Sexo:

Subtipo Viral:

Primeiro esquema ARV:

Tempo ARV até genotipagem (meses):

Tempo da genotipagem até troca meses):

Tempo sob falha até esquema resgate

(meses): Esquema sugerido pelo MRG:

Resgate Esquema :

GSS (S-1; R-0, I-0,25, BNR-0,5 PBNR-

0,75): CD4 PRÉ-ARV :

CV PRÉ-ARV:

CD4 NA

GENOTIPAGEM : CV

NA GENOTIPAGEM:

CD4 APÓS 48 SEMANAS DA

TROCA: CV APÓS 48 SEMANAS DA

TROCA:

Mutações ITRN(t)/N^o :

Mutações

TAMs/N^o :

Mutações ETR:

Mutação principal

IP: Mutação

APÊNDICE B – ARTIGO ORIGINAL

Virologic suppression in response to antiretroviral therapy despite extensive resistance within HIV-1 reverse transcriptase after the first virologic failure

Marta Iglis de Oliveira;¹ Claudia Fernanda de Lacerda Vidal;²
Valter Romão de Souza Júnior;³ Paulo Sérgio Ramos de Araújo⁴

ABSTRACT

Introduction Incomplete virologic suppression results in mutations associated with resistance and is a major obstacle to disease control. We analyzed the genotypic profiles of HIV-1 patients at the time of the first virologic failure and the response to a salvage regimen after 48 weeks. **Materials and Methods** This work was a cross-sectional, retrospective, analytical study based on data collected from medical records and genotyping tests between 2006 and 2016. The sample consisted of data on individuals living with HIV (PLWH) from three major reference centers. **Results** A total of 184 patients were included in the data analysis. Viral subtype B was the most common (81.3%) as well as M184V/I (85.3%) and K103 codon mutations (65.8%). Forty-eight weeks after switching to a salvage regimen, 67.3% of patients achieved an undetectable viral load. **Discussion** the number of mutations associated with nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors (NRTI(t)s) did not affect virologic suppression (9.3% for zero NRTI(t)-associated mutations vs 48.6% for 1-2 NRTI(t)-associated mutations vs 42.1% for ≥ 3 NRTI(t)-associated mutations, $p = 0.179$). An ARV time (the beginning of the first ARV regimen up to genotyping) of >36 months was a protective factor for detectable viral load (PR = 0.60, 95% CI = 0.39-0.92, $p = 0.020$) and a risk factor for developing ≥ 3 NRTI(t)-associated mutations (PR = 2.43, 95% CI 1.38-4.28, $p = 0.002$). **Conclusions** we found that extensive resistance to NRTI(t)s at the

time of the first virologic failure did not impact virologic suppression at 48 weeks after switching to a second-line therapy based on NRTI(t)s plus protease inhibitors.

Palavras-chave: HIV-1 drug resistance. Genetic diversity. Subtypes. Antiretroviral therapy.

Introduction

Approximately 21 million people are living with HIV (PLHIV) and receiving antiretroviral therapy,¹ which is responsible for a significant decrease in their morbidity and mortality as well as in the risk of transmission.^{2,3} However, the importance of this therapy to global health has been threatened by an increased prevalence of resistance to antiretrovirals (ARVs), which has increased from 11% to 29% since 2001.⁴ Of the individuals under ARV treatment, 20% will have to switch ARVs due to virologic failure.^{5,6} Thus, drug resistance is a real obstacle to viral suppression and disease control.¹

In Brazil, approximately 60% of PLHIV receive ARVs⁷ through a program by the Brazilian Ministry of Health. From 2004 to 2017, the first-line therapy in the country was based on regimens involving efavirenz (EFV), a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI). In 2013, tenofovir (TDF) became the preferred nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor (NRTI(t)), and it was given in a single dose combined with lamivudine (3TC) and EFV.⁸ In 2017, dolutegravir (DTG), an integrase inhibitor that was administered with TDF/3TC, became the first-line therapy.⁹

Genotypic and immunovirologic data from patients following the first virologic failure are scarce in Brazil, and they are limited to certain regions of the country. A recent study from the city of São Paulo¹⁰ on patients who failed first-line therapy between 2013 and 2015 found a higher prevalence of the M184V/I mutation (74.3%) and K103 codon (56.7%), similar to that found in other Brazilian states.¹¹ Among the 205 subjects who started the second-line therapy with NRTI(t)s combined with protease inhibitor/ritonavir (PI/r), 76.6% experienced virologic suppression (<200 copies/ml), despite the extensive resistance of the virus to NRTI(t)s.¹⁰

Low- and middle-income countries in sub-Saharan Africa, where 70% of PLHIV live¹, access 2 NRTI(t)+NNRTI as a first-line therapy.¹² This regimen has a low genetic barrier and easily results in cross-resistance. Thus, the sensitivity of NRTI(t)s may be compromised by multiple mutations that arise during the first virologic failure. In addition, NRTI(t)s have recognized risks of toxic effects. These factors are concerning and have led to the decision to retain this drug class as a second-line therapy, and they have motivated the development of randomized clinical trials to evaluate the efficacy of the salvage regimen with NRTI(t)s plus PI/r.

The impact of mutations associated with NRTI(t)s during the second-line regimen was evaluated through the SECOND-LINE, EARNEST and SELECT

studies^{13,14,15} and they were recently reevaluated in a meta-analysis,²⁰ which showed the success of salvage regimens based on NRTI(t)s combined with PI/r. In this study, we analyzed the genotypic profile of HIV-1 in patients during the first virologic failure and the predictors of virologic success 48 weeks after switching to a salvage regime

Methodology

This work was a cross-sectional, retrospective, multicenter study evaluating genotypic resistance tests of PLHIV during the first virologic failure in the city of Recife, the capital of the state of Pernambuco, an important medical center in Northeast Brazil. The patients were enrolled in three large centers specializing in the care of PLHIV. We reviewed tests that were performed from January 2006 to December 2016 and included patients over 18 years of age who had used ARVs for more than six months and presented two consecutive viral load measurements, with an interval of at least 30 days, and values greater than 1,000 copies/ml. Individuals who underwent ARV switching due to virologic failure without genotyping tests, those who used ARVs before receiving the first-line therapy, those showing an absence of mutations associated with resistance in genotyping, and those with insufficient data were excluded.

The immunovirologic and genotypic data and the history of ARV use were collected from genotyping tests, medical charts and through the Laboratory Test Control System (Sistema de Controle de Exames Laboratoriais - SISCEL- online platform). To identify the mutations associated with resistance, the ViroSeqTM HIV-1 Genotyping System kit (Celera Diagnostics, Alameda, CA, USA) was used from 2006 to 2008 and the TRUGENE System (Siemens, Munich, Germany) was used from 2009 to 2016 by the laboratories that served the National Genotyping Network (Rede Nacional de Genotipagem - Renageno). The viral load (VL) was measured until July 2013 using the Versant HIV-1 RNA 3.0 assay (bDNA, Siemens, USA); real-time qPCR was used after this date (Abbott Laboratories, USA). The CD4 T-cell counts (CD4) were performed by flow cytometry (BD, USA).

The Stanford HIVdb program version 8.4 (<https://hivdb.stanford.edu/hivdb/by-mutations>) was used to interpret the genotype resistance. The mutations were analyzed individually using a list provided by the International AIDS Society (IAS) in 2017¹⁶ and the Stanford HIVdb program and categorized as mutations associated with

NRTI(t), NNRTI and major and accessory mutations for protease inhibitors (PI). Forty-eight weeks after switching to second-line therapy, virologic suppression was considered successful when an undetectable viral load was found by the given method. Viral load values made available 60 days before or after the date of completion (for the 48 weeks) were considered. The time on ARVs was the period between the beginning of the first ARV regimen and the performance of the genotyping test. The time in virologic failure was the period between virologic failure detection (two consecutive viral loads above 1,000 copies/ml) and the switch to the salvage regimen.

The genotypic sensitivity score (GSS) was calculated individually only for the drugs used by each patient in the salvage regimen. A value of 1 was attributed to drugs with full activity, 0.75 for a low potential resistance level, 0.5 for a resistance level, 0.25 for an intermediate resistance level and zero if the drug showed a lack of activity.

SPSS 13.0 (Statistical Package for the Social Sciences) for Windows and Excel 2010 were used for the statistical analysis. The results are presented in the tables with their respective absolute and relative frequencies. The mean or median values for the quantitative variables were calculated according to the normality of their distribution. The normality of the quantitative variables was tested using the Kolmogorov-Smirnov test.

We tested for the presence of an association using the chi-square test and Fisher's exact test for categorical variables. To identify the predictive factors that independently influenced virologic suppression and the number of mutations associated with NRTI(t)s, we used the STATA/SE 12.0 programs. For the multivariate analysis, the Poisson regression model was used, taking into account the variables that obtained significance ≤ 0.20 in the bivariate analysis.

The prevalence ratio was calculated with a 95% confidence interval. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. The poisson-regression were chosen as an excellent alternative for estimating adjusted prevalence ratio for confounding variables in cross-sectional studies when compared with Cox and log-binominal logistic regression. The study was approved by the institutional ethics committee (CEP-CCS-UFPE/1.985.922).

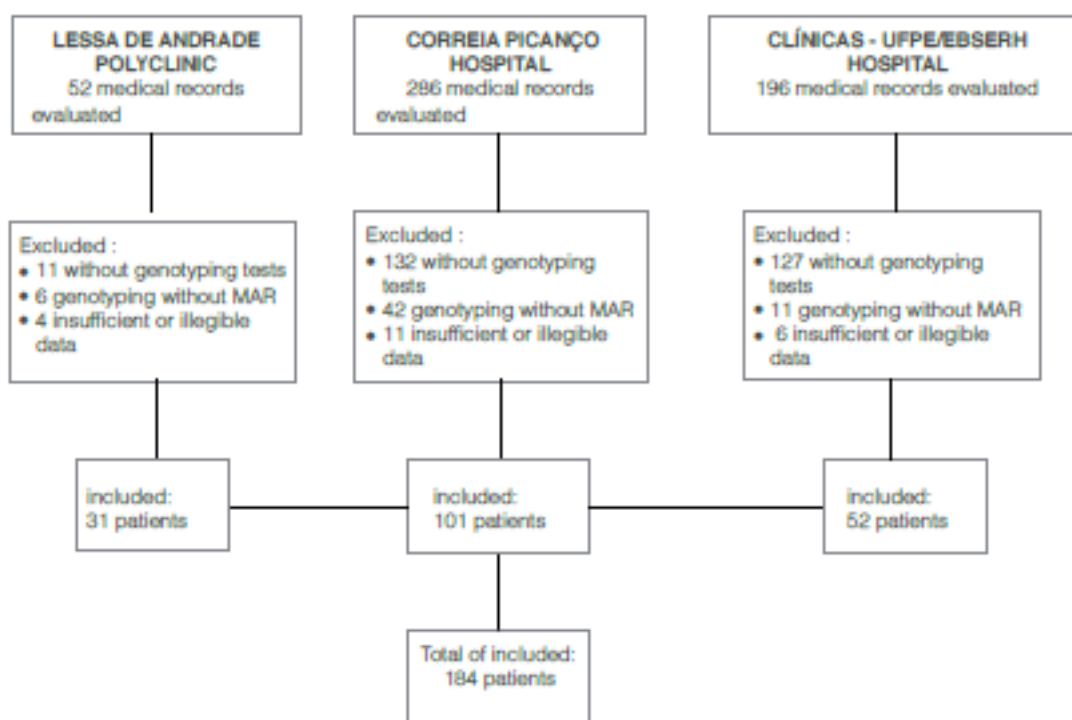
Results

A total of 534 medical records were evaluated, of which 270 were excluded due to a lack of genotyping tests when the patients switched ARVs after the first virologic

failure. In 59 medical records, there was no selective pressure during genotyping. Therefore, the absence of mutation does not represent reality, so 59 were excluded (Figure 1). Non-adherence to ARV use at the time of genotyping was recorded in the medical charts of the 59 excluded patients with an absence of resistance-associated mutations. Furthermore, 21 were not include due to insufficient or illegible data.

A total of 184 patients were included in the first virologic failure for analysis. The majority of the participants were male (73.4%) and the mean age at virologic failure was 41 (± 9.4) years. The median CD4 (n = 155) and VL (n = 141) pre-ARV were 176 cells/m³ and 130,000 copies/ml, respectively.

Figure 1 – Sample selection



Factors associated with genotypic, immunovirologic and ARV characteristics at the time of genotyping

As The genotypic, immunovirologic and ARV characteristics at the time of genotyping are described in Table 1. The NRTI(t)-associated mutation M184V/I emerged in 78.4% of the subtype B sequences and in 21.6% of the non-B subtype sequences ($p = 0.009$). Most individuals (89.7%) exhibited at least one mutation for NRTI(t). The association of the presence of ≥ 3 NRTI(t)-associated mutations with CD4 pre-ARVs < 200 cell/mm³ (66.7% vs 33.3% for CD4 pre-ARVs ≥ 200 , prevalence ratio [PR] = 1.52, CI = 1.00-2.31, $p = 0.041$), with CD4 at the time of genotyping < 200 cells/mm³ (59.4% vs 23.4% for CD4 200-350 vs 17.2% for CD4 > 350 , PR = 2.04, CI = 1.18-3.55, $p < 0.011$), and with a time on ARV of greater than 36 months (81.2% vs 18.8% for $\Delta t < 36$ months, $p = 0.003$) were significant, according to Table 2. In addition, a VL of 10,000-100,000 copies/ml was associated with the highest number of NRTI(t)-associated mutations (Table 2).

After analysis using the Poisson regression model (Table 3), only patients who were on ARVs for more than 36 months until genotyping (PR = 2.43, 95% CI = 1.38-4.28, $p = 0.002$) and who developed VL at the time of genotyping of 10,000-100,000

copies/ml (PR = 2.09 95% CI = 1.25-3.50, p = 0.005) and >100,000 copies/ml (PR = 2.20, 95% CI = 1.14-4.27, p = 0.005) had a higher risk of having ≥ 3 NRTI (t)-associated mutations.

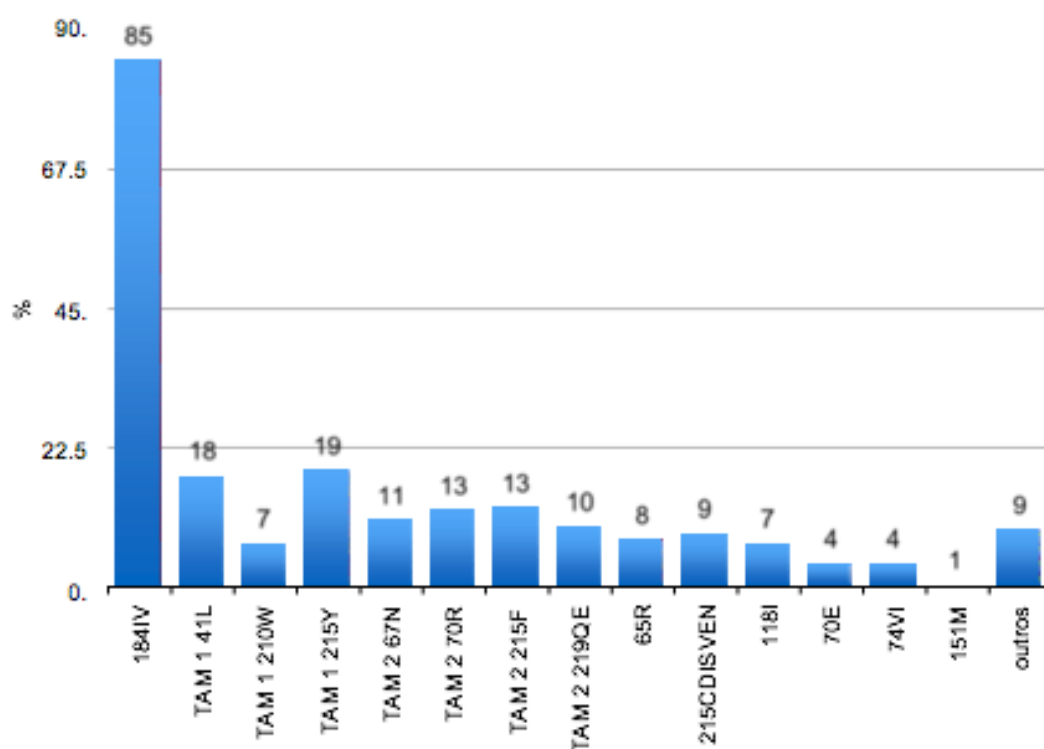
Table 1 - Genotypic, immunovirology and ARV characteristics at time of genotyping in 184 individuals at the first virological failure

Variable	n	%
Age (years) (mean $\pm$ SD)	41,1 $\pm$ 9,4	
Sex		
Male	135	73,4
Female	49	26,6
CD4, median (Q1; Q3)	234,0 (118,0; 361,0)	
CD4		
< 200	78	42,4
200 a 350	50	27,2
> 350	47	25,5
Losses	9	4,9
CV (copies/ml), median (Q1; Q3)	19.812,5 (7.036,0; 78.674,2)	
CV (copies/ml)		
≤ 10.000	59	32,1
>10.000 a 100.000	75	40,7
>100.000	37	20,1
Losses	13	7,1
Δt in ARV (months), median (Q1;Q3)	54,5 (29,0; 90,0)	
Δt under VF (months), median (Q1;Q3)	17,0 (10,0; 34,0)	
ARV-based in NRTI (t)	184	100,0
AZT/3TC	126	68,5
TDF/3TC	48	26,1
Outros	10	5,4
ARV-based in NNRTI	155	84,2
EFV	135	87,1
NVP	20	12,9
ARV-based in PI	29	15,8
LPV/r	16	55,2
ATV/r ou ATV 400 mg	12	41,4
Outros	1	3,4
Viral Subtype	171	92,9
B	139	81,3
F	31	18,1
BF	1	0,4

CD4- counting CD4 T cells; CV- viral load; Δt in ARV-time in antiretroviral until genotyping; Δt in VF- time in virological failure; NRTI(t) – núcleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor ; AZT- zidovudine; 3TC-lamivudine; TDF-tenofovir; NNRTI-non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; EFV-efavirenz; NVP- nevirapine; PI - protease inhibitor; LPV/r- lopinavir /ritonavir; ATV / r- atazanavir / ritonavir; MAR- mutation associated with resistan

There was a trend towards the emergence of three or more thymidine-associated mutations (TAMs) when the time on ARVs was greater than 36 months (92% vs 8% for Δt on ARVs ≤ 36 months, $p = 0.051$). K65R emerged in 7.6% of 184 genotyping tests (Figure 1) and was observed in 27.1% of patients who were exposed to TDF/3TC. Mutations in the K103 codon were observed in 65.8% ($n = 121/184$) of the genotyping tests. Among those who used NNRTI, this mutation occurred in 78.0% ($n = 121/155$). The NNRTI-associated mutation 90IV was more frequent in the non-B subtype (57.1% vs 42.9% for subtype B, $p = 0.024$) and the 190AS was most prevalent for etravirine.

Graph 1 - Prevalence of of NRTI(t)-associated mutation*



* NRTI(t) – núcleos(t)ide reverse transcriptase inhibit

Table 2 - Factors associated with the number of NRTI(t)-associated mutation in the first virological failure

Factors	N.º NRTI- AM		PR	PR CI95%	p-valor
	≥ 3 n (%)	< 3 n (%)			
Age (years)					0,806 *
18-30	7 (10,1)	11(11,5)	0,90	0,49 – 1,66	
31-50	52 (75,4)	68(70,8)	1,00	–	
>50	10 (14,5)	17(17,7)	0,85	0,50 – 1,46	
Sex					0,476 *
Male	53 (76,8)	69(71,9)	1,17	0,75 – 1,81	
Female	16 (23,2)	27(28,1)	1,00	–	
Subtype					0,771 *
B	50 (80,6)	74(78,7)	1,00	–	
Não-B	12 (19,4)	20(21,3)	0,93	0,57 – 1,53	
VL before-ARVs (copies / ml)					0,570 **
≤10.000	4 (7,5)	3(4,3)	1,00	–	
>10.000 a 100.000	17 (32,1)	27(38,6)	0,68	0,32 – 1,42	
>100.000	32 (60,4)	40(57,1)	0,78	0,39 – 1,55	
CD4 before-ARVs (cells/mm³)					0,041 *
<200	40 (66,7)	39(49,4)	1,52	1,00 – 2,31	
≥200	20 (33,3)	40(50,6)	1,00	–	
VL on genotyping (copies / ml)					0,042 *
≤10.000	15 (24,6)	38(71,7)	1,00	–	
>10.000 a 100.000	34 (55,7)	33(36,3)	1,79	1,10 – 2,92	
>100.000	12 (19,7)	20(22,0)	1,33	0,71 – 2,46	
CD4 on genotyping (cells/mm³)					0,011 *
<200	38 (59,4)	33(35,9)	2,04	1,18 – 3,55	
200-350	15 (23,4)	28(30,4)	1,33	0,69 – 2,56	
>350	11 (17,2)	31(33,7)	1,00	–	
ARV-basead in RNTI(t)					0,189 *
TDF	12 (17,4)	25(26,0)	1,00	–	
Não-TDF	57 (82,6)	71(74,0)	1,37	0,83 – 2,27	
Δt under VF (months)					0,221 *
<12	13 (19,4)	28(30,4)	1,00	–	
12-24	25 (37,3)	34(37,0)	1,34	0,78 – 2,29	
>24	29 (43,3)	30(32,6)	1,55	0,92 – 2,60	
Δt in ARV (months)					0,003 *
≤36	13 (18,8)	39(40,6)	1,00	–	
>36	56 (81,2)	57(59,4)	1,98	1,19 – 3,29	

* Chi-square test ** Fisher's exact test PR- prevalence ratio; CI- confidence interval; Nº NRTI(t)-AM- mutation number associated to núcleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor ; VL- viral load; CD4 - CD4 T cell count; TDF- tenofovir; Δt under VF- time under virological failure; Δt in ARV- time in antiretroviral until genotyping was performed.

Table 3 - Poisson model for ≥ 3 NRTI(t)-associated mutation

Variáveis	PR	PR CI95%	p-valor
CD4 before-ARVs (cells/mm³)			
< 200	1,46	0,95 – 2,24	0,084
≥ 200	1,00	–	
VL on genotyping (copies / ml)			
≥ 10.000	1,00	–	
> 10.000 a 100.000	2,09	1,25 – 3,50	0,005
> 100.000	2,20	1,14 – 4,27	0,018
Δt in ARV (months)			
≤ 36	1,00	–	0,002
> 36	2,43	1,38 – 4,28	

PR- prevalence ratio; CI- confidence interval; CD4- CD4 + T cell count; VL: viral load; Δt in ARV: antiretroviral time to genotyping

Considering the 29 patients who used PI, 55.2% (n = 16) were on lopinavir/ritonavir (LPV/r) and 41.4% (n = 12) were on atazanavir (ATV) (Table 1). The PI-associated major and accessory mutations were 82AF (51.7%) and 10IFV (62%), respectively.

The PI-associated major mutation 54VL emerged frequently in subtype B sequences (58.3% vs 41.7% for non-B subtype, p = 0.05), as did the PI-associated accessory mutations 10IFV (69% vs 31% for non-B subtype, p = 0.019) and 20RT (60% vs 40% for non-B subtype, p = 0.010).

The total number of mutations was significantly equal to or greater than seven among the users who had a CD4 count below 200 cells/m³ at the time of genotyping (52.9% vs 27.6% for CD4 200-350 cells/m³ vs 19.5% for CD4 >350 cells/m³, p = 0.045).

Salvage therapy characteristics

There was a loss of follow-up in eight (4.3%) patients after the genotyping test was performed. Thus, 176 (95.7%) patients switched to the salvage regimen. Of these individuals, 109 (61.9%) patients used TDF/3TC as the NRTI(t), followed by 28 (15.9%) who used TDF/AZT (zidovudine)/3TC and 27 (15.3%) AZT/3TC. Only nine (5.1%) individuals did not have NRTI(t)s included in their salvage regimen.

PIs were present in the salvage regimen of 99.4% of the individuals; only one patient did not use PI. LPV/r was the most frequently prescribed (48.5%) followed by

ATV/r (33.1%). O Integrase inhibitors made up the salvage regimen of 35 (19.9%) indivíduos. Raltegravir (RAL) was the most frequently used one ($n = 32$). When the salvage regimen consisted of two active drugs ($GSS = 2$), 79.5% of this population showed genotyping with less than three NRTI(t)-associated mutations (79.5% vs 20.5% for ≥ 3 NRTI(t)-associated mutations, $p < 0.000$).

The susceptibility of etravirine was not associated with the use of EFV or nevirapine (NVP) or with the number of NNRTI-associated mutations. This treatment remained fully active in 63.2% of the sequences among the patients who experienced a failed NNRTI therapy. We found a similar susceptibility of AZT and TDF (64.2% vs 65.9%). Among the PI/r users, darunavir/ritonavir (DRV/r) showed the highest percentage of sensitivity (69%), and ATV/r experienced the highest percentage of resistance (79.3%).

Most of the salvage regimens showed GSS equal to two (42.6%) or greater than two (44.3%). We found that in most of the regimens with a GSS greater than 2, the patient was in virologic failure for more than 24 months (46% vs 30.8% for Δt in virologic failure 12-24 months vs 23.2% for Δt in virological failure < 12 months, $p = 0.013$) and on ARV for more than 36 months (76.9% vs 23.1% for Δt in ARV 36 months, $p = 0.004$).

When virologic failure occurred during LPV/r use, the GSS of the salvage therapy regimen was significantly higher than two (85.7% vs 14.3% for $GSS = 2$ vs 0% for $GSS < 2$, $p = 0.001$). The significant majority of TDF users in virologic failure were salvaged with an ARV regimen with a GSS equal to two (62.2% vs 27.0% for $GSS > 2$ vs 10.8% for $GSS < 2$, $p = 0.023$).

Predictors of undetectable viral loads and CD4 T-cell count variation at 48 weeks after the onset of the salvage regimen

Of the 176 patients who received documented salvage therapy prescriptions, we were able to obtain the VL value 48 weeks after switching ARVs for 159 (90.3%). Of these, 67.3% ($n = 107$) experienced virologic suppression and 11.3% did not reach an undetectable VL but had below 400 copies/ml. The majority of the population with undetectable VL had more than 36 months of ARV use until genotyping (73.8% vs 26.2% for 36 months, $p = 0.022$), and 42.0% were in virologic failure for 12 to 24 months (42.0% vs 34.6% for > 24 months vs 23.4% for < 12 months, $p = 0.029$) (Table 4).

Table 4 - Characteristics related to the irrigation regimen, ARV time and virological failure time associated with virological suppression after 48 weeks from the start of the rescue scheme

Vira Load (VL)					
Characteristics	Detectable	Undetectable	PR	PR CI95%	p-value
	n (%)	n (%)			
Δt in VF (months)					0,029 *
<12	22 (42,3)	25 (23,4)	1,00	–	
12-24	13 (25,0)	45 (42,0)	0,48	0,27 – 0,84	
>24	17 (32,7)	37 (34,6)	0,67	0,41 – 1,11	
Δt in ARV (months)					0,022 *
≤36	23 (44,2)	28 (26,2)	1,00	–	
>36	29 (55,8)	79 (73,8)	0,60	0,39 – 0,92	
ARV rescue NRTI(t)					0,711 **
TDF/3TC	36 (69,2)	62 (57,9)	1,00	–	
AZT/3TC	7 (13,5)	18 (16,8)	0,76	0,39 – 1,50	
TDF/AZT/3TC	7 (13,5)	19 (17,8)	0,73	0,37 – 1,45	
DDI/3TC	0 (0,0)	1 (0,9)	–	–	
ABC/3TC	1 (1,9)	1 (0,9)	1,36	0,33 – 5,58	
SEM ITRN(t)	1 (1,9)	6 (5,6)	0,39	0,00 – 2,43	
ARV rescue PI					0,013 **
LPV/r	24 (46,1)	55 (51,5)	2,13	0,71 – 6,39	
ATV/r	20 (38,5)	33 (30,8)	2,64	0,88 – 7,96	
DRV/r	3 (5,8)	18 (16,8)	1,00	–	
FPV/r	5 (9,6)	1, (0,9)	5,83	1,93 – 17,65	
ARV rescue with RAL					0,050 *
Yes	5 (9,6)	24 (22,4)	1,00	–	
No	47 (90,4)	83 (77,6)	2,10	0,91 – 4,81	
GSS					0,947 *
<2	8 (15,4)	15 (14,0)	1,11	0,57 – 2,14	
2	22 (42,3)	44 (41,1)	1,06	0,65 – 1,72	
>2	22 (42,3)	48 (44,9)	1,00	–	

*Chi-square test ** Fisher's exact test; PR: prevalence ratio; CI: Confidence interval; Δt in ARV-time in antiretroviral until genotyping; NRTI(T)(t): reverse transcriptase inhibitor Nucleos(t)etide; AZT: zidovudine; TAM: analogous thymidine mutation; 3TC: lamivudine; TDF: tenofovir; NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor; IP: protease inhibitor; LPV / r: lopinavir / ritonavir; ATV / r- atazanavir / ritonavir; DRV/r: Darunavir / ritonavir; FPV / r: fosamprenavir / ritonavir; GSS: genotypic sensitivity score

The number of NRTI(t)-associated mutations did not affect virologic suppression (9.3% for zero NRTI(t)-associated mutations vs 48.6% for 1-2 NRTI(t)-associated mutations vs 42.1% for ≥ 3 NRTI(t)-associated mutations, $p=0.179$) (Table 5).

Table 5 –Genotypic, immunological and virological characteristics at the time of genotyping associated with virological suppression after 48 weeks of initiation of the rescue scheme

Viral Load (VL)					
Characteristics	Detectável	undetectable	RP	RP IC95%	p-valor
	n (%)	n (%)			
Age (years)					0,662 *
18-30	6(11,5)	13 (12,2)	0,92	0,45 – 1,86	
31-50	40 (76,9)	76(71,0)	1,00	–	
>50	6 (11,5)	18 (16,8)	0,73	0,35 – 1,52	
Sex					0,385 *
Male	36 (69,2)	81 (75,7)	0,81	0,50 – 1,29	
Female	16 (30,8)	26 (24,3)	1,00	–	
VL on genotyping (copies/ml)					0,752 *
≤ 10.000	18 (35,3)	36 (34,3)	1,00	–	
>10.000 a 100.000	20 (39,2)	47 (44,7)	0,90	0,53 – 1,52	
>100.000	13 (25,5)	22 (21,0)	1,11	0,63 – 1,98	
CD4 on genotyping (cells/mm³)					0,796 *
<200	20 (38,5)	45 (42,9)	0,95	0,54 – 1,66	
200-350	18 (34,6)	31 (29,5)	1,13	0,64 – 1,99	
>350	14 (26,9)	29 (27,6)	1,00	–	
Number of NRTI(t)-associated mutation					0,179 *
Zero	6 (11,6)	10(9,3)	1,00	–	
<3	32 (61,5)	52(48,6)	1,02	0,51 – 2,02	
≥ 3	14 (26,9)	45(42,1)	0,63	0,29 – 1,38	
Number of NRTI(t) TAM					0,058 *
Zero	35 (67,3)	54 (50,4)	1,00	–	
<3	14 (26,9)	34 (31,8)	0,74	0,45 – 1,24	
≥ 3	3 (5,8)	19 (17,8)	0,35	0,12 – 1,02	
Number of NNRTI-associated mutation					0,113 *
≤ 2	32 (61,5)	79 (73,8)	1,00	–	
>2	20 (38,5)	28 (26,2)	1,45	0,93 – 2,25	
Number of PI- associated mutation					1,000 **
≤ 2	4 (80,0)	14 (77,8)	1,00	---	
>2	1 (20,0)	4 (22,2)	0,90	0,13 – 6,35	
Presence of M184V/I					0,693 *
yes	44 (84,6)	93 (86,9)	1,00	---	
No	8 (15,4)	14 (13,1)	1,13	0,62 – 2,07	

* Chi-square test ** Fisher's exact test; PR: prevalence ratio; CI: Confidence interval; CD4- células T CD4; VL: viral load; NRTI(T)(t): núcleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor ; TAM: TAM: analogous thymidine mutation; NNRTI- non-núcleos(t)ide reverse transcriptase inhibitor; PI – protease inhibitor.

After an analysis with the Poisson regression model, only being on ARVs for more than 36 months until genotyping was a protective factor for a detectable viral load (PR 0.6, 95% CI = 0.39-0.92, $p = 0.02$) 48 weeks after switching to the salvage regimen (Table 6).

Table 6 - Poisson model for viral load detectable after 48 weeks of initiation of the scheme

Variable	PR*	PR CI 95%**	p-valor
*** Δt in ARV (months)			
≤ 36	1,00	–	0,020
> 36	0,60	0,39 – 0,92	

* PR: prevalence ratio. ** Confidence interval. *** Δt in ARV: time in antiretroviral until genotyping

For the 153 patients with documented CD4 after 48 weeks, the median was 376 cells/mm³ (Q1 246; Q3 553) and the median CD4 gain was 125 cells/mm³ (Q1 47; Q3 243). In the population with virologic success, the variation in the CD4 gain above 100 cells/mm³ was significant when the VL at the time of genotyping was 10,000-100,000 copies/ml (69.8% vs 30.2% for variation < 100 cells/mm³, $p = 0.047$) and when the CD4 at the time of genotyping was below 200 cells/mm³ (81.4% vs 18.6% for CD4 < 100 cells/mm³ $p = 0.010$).

Discussion

After evaluating 184 genotyping tests from patients during the first virologic failure, we found a higher prevalence of subtype B, of the M184V/I and K103N mutations, as well as a high frequency of NRTI(t) and NNRTI-associated mutations, with no impact on virologic suppression. We observed that the salvage therapy regimen was predominantly composed of PI/r and NRTI(t)s, with virologic success in most cases. Subtype B remains the most common in Pernambuco^{17,18,19} and in Brazil,¹¹ except in the south, where subtype C²¹ is predominant. There has been an increase in the proportion of recombinant forms in Rio de Janeiro²² and subtype F in Minas Gerais.⁴⁰

The elevated presence of M184 codon mutations is expected and arises as a consequence of the use of lamivudine as part of all the first-line regimens in our study. This drug confers a high level of resistance to cytosine analogs (lamivudine and

emtricitabine), a low level of resistance to abacavir, and the increased susceptibility of zidovudine and TDF. In addition, it decreases the replication capacity of HIV-1.^{23,24} Its presence has been associated with virologic success,¹⁰ but we did not observe this success in the present study.

Similar to our results, the high prevalence of M184V/I mutations was reported in several regions of Brazil,^{11,40,25} in Sub-Saharan Africa²⁶ and in Asia,²⁷ but to a lesser extent in western Europe.²⁸ This difference can be explained by the use of emtricitabine in European countries and by the use of lamivudine in low- and middle-income settings. However, in a recent meta-analysis,²⁹ lamivudine and emtricitabine were clinically equivalent. All the genotype sequences of the non-B subtype (F and BF) had the M184V/I mutation, probably due to the high prevalence of this mutation and the very low frequency of non-B subtypes in our study.

We found no association between the number of NRTI(t)-associated mutations and the ARVs used at the time of genotyping, including ARV regimens with or without TDF. There are studies showing a greater number of resistance-associated mutations among AZT³⁰ and TDF users.^{10,31} However, those studies had populations with different characteristics, especially with regard to subtype prevalence. A higher number of mutations with a TDF-based regimen was reported for both the B subtype¹⁰ as well as with the C subtype.³³ The association between a high number of NRTI(t)-associated mutations with CD4 pre-ARV and at the time of genotyping of >200 cells/mm³ suggests a late diagnosis of PLHIV in our population, with an impact on the genotypic profile. These factors did not remain significant after the analysis with the Poisson regression model.

The K103N/S mutation was documented in most genotypic sequences, due to the frequent use of EFV as the primary NNRTI in the first-line therapy for more than a decade in Brazil. These findings are similar to the national data^{10,11,12} and data from low- and middle-income countries.^{14,15,26,27} The susceptibility of etravirine, a second-generation NNRTI, was not influenced by experiencing a long period of time in virologic failure while using EFV or NVP, or by the number of NNRTI-associated mutations.

This analysis was hampered by the small number of NVP users at the time of virologic failure. However, some studies^{32,33,34} have shown that NVP-containing ARVs have repercussions on the response to etravirine for selecting the Y181C and G190A mutations, whereas the K103 mutation associated with EFV does not interfere with etravirine susceptibility.

The median time from ARV therapy to genotyping was similar to that of recent studies in Brazil,¹⁰ Africa and Europe.³⁶ After the Poisson regression model analysis, remaining on ARV for more than 36 months until genotyping was the only factor that impacted the virologic response 48 weeks after the onset of salvage therapy, appearing as a protective factor for a detectable viral load. To understand the impact of time on ARV on virologic success, factors that could influence treatment adherence would have to be identified and controlled, because the major cause of acquired virologic failure is poor adherence to ARVs.⁴²

A shorter time on ARV is used as the best scenario for adherence in the calculation of odds ratio in studies that seek to understand the risk factors for treatment adherence. However, after association testing, its impact on adherence is not always confirmed.⁴³ This finding is probably observed because adherence is a dynamic behavior and varies over time for the same individual, and it is affected by diverse factors such as psychosocial-, ARV- and clinical scenario-related factors. This finding explains why the time on ARV may be a risk or protective factor for poor adherence, with an impact on virologic success.⁴²

By contrast, more than 36 months on ARV increased the risk for the selection of three or more NRTI(t)-associated mutations, although a longer time in virologic failure did not generate the same outcome. According to the virologic failure criterion of this study, individuals with low VL (>1,000 copies/ml) were not considered to be in virologic failure, because the genotyping tests available in Brazil during the data collection period were not able to expand the genetic material when the VL was <1,000 copies/ml. However, there is evidence that having a VL of >200 copies/ml increases the risk for virologic failure and may lead to mutation accumulation.⁴⁴ Therefore, it is possible that many individuals who are on ARV for a long period of time (>36 months) had low VL but were not diagnosed with virologic failure, accumulating mutations.

We observed that the presence of NRTI(t)-associated mutations or TAMs at the first virologic failure did not interfere with virologic suppression 48 weeks after the switch to a second-line therapy with NRTI(t)s combined with PI/r. This finding is not only due to the high potency of PI/r or to the direct activity of NRTI(t)s, and it may reflect an effect of the NRTI(t)s on viral fitness.³⁵ This finding is consistent with the results of three large randomized controlled trials in which patients with extensive resistance to reverse transcriptase evolved with virologic success after salvage therapy based on NRTI(t) with PI/r.^{13,14,15}

We found no difference in the virologic response between regimens with an individual GSS of less than two and those greater than or equal to two, confirming the hypothesis that there is no difference between active, partially active or inactive NRTI(t)s in terms of virologic success.³⁵ In the EARNEST study,¹⁴ the group receiving inactive or partially active NRTI(t)s exhibited viral load suppression that was similar to if not better than that exhibited by the group receiving the regimen containing a fully active drug from a new class, and it was superior to that exhibited by the group using only a protease inhibitor.

It is possible that pharmacokinetic characteristics optimize the benefits of NRTI(t)s even if inactive. Thus, ARVs with a long intracellular half-life, such as TDF and lamivudine, may help the PI/r to maintain viral suppression. This effect is independent of the drug activity.⁴¹

We were able to define the time in virologic failure until the switch to second-line therapy. Surprisingly, most of the patients with undetected viral loads were in virologic failure for more than 12 months. Because the time under virologic failure did not interfere with the number of NRTI(t)-associated mutations or TAMs in our study, we can suggest that the resistance-associated mutations arose during the first months of virologic failure. In the EUROSIDA study,³⁷ a high number of TAM-1 mutations was observed within one year of failure, with a lower accumulation rate than what was predicted among those who stayed on the failing regimen.

The total absence of ARV selective pressure during part of the virologic failure period is another way to explain why the longer virologic failure time did not influence the number of NRTI(t)-associated mutations or TAMs. The complete withdrawal of ARVs generates fewer resistance-associated mutations than does the maintenance of sub-therapeutic doses.⁹ It was not possible to determine whether the study participants were kept on sub-therapeutic doses or if they completely abandoned the treatment when they were in virologic failure.

When we analyzed the virologic response and ARVs used in salvage therapy, we observed that there was no difference between the patients who used AZT or TDF or both. The use of LPV/r was significant among those who experienced virologic success, probably because it was the most frequently prescribed PI during the study period, as directed by the Brazilian Ministry of Health. Among users of DRV/r or RAL, the majority achieved virologic success, although they were smaller in absolute numbers.

DRV/r is the newest PI and has a high genetic barrier, in addition to fewer adverse effects than LPV/r, possessing activity even with a protease mutation.³⁸ When the protease is not intact, adding a new ARV class is critical. This class has often been the integrase inhibitor.³⁹ It should be noted that this study was not designed to assess the individual power of each regimen. Among those who reached an undetectable VL, a CD4 gain above 100 cells/mm³ was significant in subjects with CD4 at the time of genotyping >200 cells/mm³, demonstrating that when there is adherence, a significant immunologic gain is possible even in patients with a low immunologic reserve and extensive resistance in reverse transcriptase.

Our primary limitation was the difficulty in establishing cause-and-effect relationships, because this was a cross-sectional study. Our results may have been partially affected by data we were unable to collect, particularly those related to adherence to ARV therapy, and by the loss of information in some variables. However, this study has relevant points because it updates the genotypic data of an important region of Brazil with limited resources. In addition, we were able to establish the time in virologic failure and the ARV regimen before and after genotyping in the first virologic failure as well as the factors associated with the number of NRTI(t)-associated mutations and virologic success.

Conclusions

Patients in their first virologic failure who were seen at referral centers in the city of Recife, Pernambuco, Northeastern Brazil presented a high frequency of mutations pertaining to secondary resistance to the use of NRTI(t)s and NNRTIs. However, extensive resistance in reverse transcriptase did not impact the second-line virologic suppression after 48 weeks of the salvage therapy with PI/r combined with active, partially active or inactive NRTI(t)s. The time on ARVs to genotyping was an independent protective factor for a detectable viral load. Long-term follow-up is needed to support the use of partially active NRTI(t)s in salvage therapy regimens while controlling for adherence-related factors. Studies assessing the actual need for genotyping after the first virologic failure with NNRTIs are also needed.

References

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. *Global AIDS Update*. 2016. <http://www.unaids.org/en/topic/treatment> (accessed Dec 20, 2017).
2. Strategies for Management of Antiretroviral Therapy (SMART) Study Group, El-Sadr WM, Lundgren J, Neaton JD, et al. CD4+ count-guided interruption of antiretroviral treatment. *N Engl J Med*. 2006; 355: 2283-96.
3. Rodger AJ, Cambiano V, Bruun T, et al.: PARTNER Study Group. Sexual activity without condoms and risk of hiv transmission in serodifferent couples when the HIV-positive partner is using suppressive antiretroviral therapy. *JAMA*. 2016 Jul 12;316 (2):171-81.
4. World Health Organization. *HIV drug resistance report 2017*. (www.who.int/hiv/pub/drugresistance/hivdr-report-2017/en/)
5. Campbell TB, Smeaton LM, Kumarasamy N, et al. Efficacy and safety of three antiretroviral regimens for initial treatment of HIV-1: A randomized clinical trial in diverse multinational settings. *PLoS Med*. 2012; 9:e1001290. [PubMed: 22936892]
6. Tilghman M, Tsai D, Buene TP, et al. Pooled nucleic acid testing to detect antiretroviral treatment failure in HIV-infected patients in Mozambique. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2015; 70:256-61. [PubMed: 26135327]
7. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. *Global AIDS Update*. 2016. <http://www.unaids.org/en/regionscountries/countries/brazil/> (Accessed Dec 20, 2017).
8. Brasil. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos*. Data de publicação: 03/10/2013. Data última atualização: 31/07/2015. Available at www.aids.gov.br/tags/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas. (Accessed in Aug 20, 2017).
9. Brasil. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos*. Data de publicação: 2017. Available at www.aids.gov.br/tags/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas. (Accessed in DEC 01, 2017).
10. Matsuda EM, Coelho, LP, Romero G, et al. High prevalence of drug resistance mutations among patients failing first-line antiretroviral therapy and predictors of virological response 24 weeks after switch to second-line therapy in São Paulo State, Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2017.
11. Brites C, Pinto-Neto L, Medeiros M et al. Extensive variation in drug-resistance mutational profile of Brazilian patients failing antiretroviral therapy in five large Brazilian cities. *Braz J Infect Dis*. 2016; 20(4):323-9.

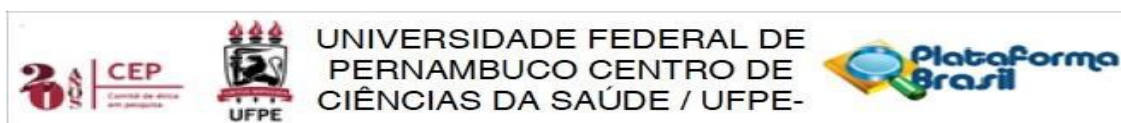
12. World Health Organization. Consolidated Guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/treatment-monitoring-info-2017/en/> (accessed Dec 20, 2017).
13. Boyd MA, Kumarasamy N, Moore CL, et al, for the Second-Line Study Group. Ritonavir-boosted lopinavir plus nucleoside or nucleotide reverse transcriptase inhibitors versus ritonavir-boosted lopinavir plus raltegravir for treatment of HIV-1 infection in adults with virological failure of a standard first-line ART regimen (SECOND-LINE): a randomised, open-label, non-inferiority study. *Lancet* 2013; 381: 2091–99.
14. Paton NI, Kityo C, Hoppe A, et al.: EARNEST Trial Team. Assessment of second-line antiretroviral regimens for HIV therapy in Africa. *N Engl J Med*. 2014 Jul 17; 371 (3):234-47.
15. La Rosa AM, Harrison LJ, Taiwo B, et al. Raltegravir in second-line antiretroviral therapy in resource-limited settings (SELECT): a randomised, phase 3, non-inferiority study. *Lancet HIV*. 2016; 3: e247-58.
16. 2017 Resistance Mutations Update. Volume 24, Issue 4, Dec. 2016/January 2017. Available at www.iasusa.org/sites/default/files/uploads/2017hiv-muta-article.pdf. accessed in 01/20/2017.
17. Cavalcanti AM, Lacerda HR, Brito AM et al. Antiretroviral resistance in individuals presenting therapeutic failure and subtypes of the human immunodeficiency virus type 1 in the northeast region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 102:785- 92.
18. Lacerda HR, Medeiros LB, Cavalcanti AM, et al. Comparison of the epidemiology, profile of mutations, and clinical response to antiretrovirals among subtypes B and F of the human immunodeficiency virus type 1. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 693-9.
19. Lima K, de Souza Leal É, Cavalcanti AMS, Salustiano DM, de Medeiros LB, da Silva SP, et al. Epidemiological, Clinical and Antiretroviral Susceptibility Characterization of Human Immunodeficiency Virus Subtypes B and Non-B in Pernambuco, Northeast Brazil. *PLoS ONE*. 2016; 11(5): e0155854.
20. Kanters S, Socias ME, Paton NI et al. Comparative efficacy and safety of second-line antiretroviral therapy for treatment of HIV/AIDS: A systematic review and network meta-analysis. *The Lancet HIV*. 2017; 3018(17): 1-9.
21. Gräf T, Vrancken B, Maletich Junqueira D et al. Contribution of epidemiological predictors in unraveling the phylogeographic history of HIV-1 subtype C in Brazil. *J Virol*. 2015; 89:12341-8.
22. Velasco-de-Castro CA, Grinsztejn B, Veloso VG, et al. HIV-1 diversity and drug

- resistance mutations among people seeking HIV diagnosis in voluntary counseling and testing sites in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One*. 2014; 9(1):e87622.
23. Miller MD, Margot N, Lu B, Zhong L, et al. Genotypic and phenotypic predictors of the magnitude of response to tenofovir disoproxil fumarate treatment in antiretroviral-experienced patients. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004; 189(5): 837-46.
 24. Melikian GL, Rhee SY, Taylor J. et al. Standardized comparison of the relative impacts of HIV-1 reverse transcriptase (RT) mutations on nucleoside RT inhibitor susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5): 2305-13.
 25. Lopes CA, Soares MA, Falci DR, Sprinz E: The Evolving Genotypic Profile of HIV- 1 Mutations Related to Antiretroviral Treatment in the North Region of Brazil. *Biomed Res Int*. 2015; 2015:738528.
 26. Hamers RL, Sigaloff KC, Wensing AM, et al.: PharmAccess African Studies to Evaluate Resistance (PASER).. Patterns of HIV-1 drug resistance after first-line antiretroviral therapy (ART) failure in 6 sub-Saharan African countries: implications for second-line ART strategies. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun; 54(11): 1660-9.
 27. Sivamalar S, Dinesha TR, Gomathi S, et al.: Accumulation of HIV-1 Drug Resistance Mutations After First-Line Immunological Failure to Evaluate the Options of Recycling NRTI Drugs in Second-Line Treatment: A Study from South India. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017 Mar; 33(3): 271-4.
 28. The TenoRes Study Group. Global epidemiology of drug resistance after failure of WHO recommended first-line regimens for adult HIV-1 infection: a multicentre retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2016; 16: 565-75.
 29. Ford N, Shubber Z, Hill A, et al. Comparative Efficacy of Lamivudine and Emtricitabine: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *PLOs ONE*. 2013; 8(11): e79981.
 30. Von Wyl V, Yerly S, Böni J, et al.: Swiss HIV Cohort Study. Incidence of HIV-1 drug resistance among antiretroviral treatment-naïve individuals starting modern therapy combinations. *Clin Infect Dis*. 2012 Jan 1; 54(1): 131-40.
 31. Van Zyl GU, Liu TF, Claassen M, Engelbrecht S, et al.: Trends in Genotypic HIV-1 Antiretroviral Resistance between 2006 and 2012 in South African Patients Receiving First and Second-Line Antiretroviral Treatment Regimens. *PLoS One*. 2013 Jun 26; 8(6): e67188.
 32. Stevens WS, Wallis CL, Sanne I, Venter F. Will etravirine work in patients failing nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor-based treatment in southern Africa? *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009; 52(5): 655-656.
 33. Kiertiburanakul S, Wiboonchutikul S, Sukasem C, Chantratita W, Sungkanuparph S. Using of nevirapine is associated with intermediate and reduced response to etravirine among HIV-infected patients who experienced virologic failure in a resource-

- limited setting. *J Clin Virol*. 2010; 47(4): 330-34.
34. Taiwo B, Chaplin B, Penugonda S, et al. Suboptimal Etravirine Activity is Common During Failure of Nevirapine-Based Combination Antiretroviral Therapy in a Cohort Infected with Non-B Subtype HIV-1. *Curr HIV Res*. 2010; 8(3): 194-98.
 35. Paton, N, Kityo, C, Thompson, J, et al. Impact of NRTI cross-resistance on second-line PI + NRTI therapy outcomes in Africa; Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections; Seattle, WA, USA. Feb 23-26, 2015;119 (abstr)
 36. Lam EP, Moore CL, Gotuzzo E, et al. Antiretroviral resistance after first-line antiretroviral therapy failure in diverse HIV-1 subtypes in the SECOND-LINE Study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2016; 32: 841-50.
 37. Cozzi-Lepri A, Phillips AN, Martinez-Picado J, et al.: EuroSIDA Study Group. Rate of accumulation of thymidine analogue mutations in patients continuing to receive virologically failing regimens containing zidovudine or stavudine: implications for antiretroviral therapy programs in resource-limited settings. *J Infect Dis*. 2009 Sep 1;200(5):687-97.
 38. Molina JM, Cohen C, Katlama C, Grinsztejn B, Timmerman A, Pedro RD, et al. Safety and efficacy of darunavir (TMC114) with low-dose ritonavir in treatment-experienced patients: 24-week results of POWER 3. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46:24-31.
 39. Grinsztejn B, Nguyen B-Y, Katlama C, et al, for the Protocol 005Team. Safety and efficacy of the HIV-1 integrase inhibitor raltegravir (MK-0518) in treatment-experienced patients with multidrug-resistant virus: a phase II randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369: 1261-69.
 40. Duani H, Aleixo AW, Tupinambás U: Trends and predictors of HIV-1 acquired drug resistance in Minas Gerais, Brazil: 2002-2012. *Braz J Infect Dis*. 2017; 21(2): 148- 54.
 41. Nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance and outcomes from second-line antiretroviral therapy in the public health approach: an observational analysis within the randomised, open-label, EARNEST trial.
 42. Horizons/Population Council, International Centre for Reproductive Health and Coast Province General Hospital, Mombasa-Kenya. Adherence to Antiretroviral Therapy in Adults: A Guide for Trainers. Nairobi: Population Council. 2004. Available from: <http://www.popcouncil.org/uploads/pdfs/horizons/mombasaarvtrainingguide.pdf>. Accessed 6 Feb. 2018.
 43. Shigdel R, Klouman E, Bhandari A, et al. Factors associated with adherence to antiretroviral therapy in HIV-infected patients in Kathmandu District, Nepal. *HIV/AIDS: Research and Palliative Care*. 2014; 6:109-116.
 44. Vandenhende MA, Ingle S, May M, et al. Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients: the antiretroviral therapy

cohort collaboration (ART-CC). *AIDS*; 2015; 29(3): 373-8

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL GENOTÍPICO DO HIV-1 EM PACIENTES COM FALHA VIROLÓGICA À PRIMEIRA LINHA DA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Pesquisador: Marta Iglis de oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58347816.8.0000.5208

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.985.922

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Emenda para a inclusão do Hospital Correia Picanço e da Policlínica

Lessa de Andrade como locais de coleta de dados, a fim de atingir o número da amostra de cerca de 150 participantes. É um estudo de coorte retrospectivo, que será realizado a partir da coleta de dados em prontuário no SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatística) bem como informações sobre genotipagens realizadas entre 2007 e 2016. A pesquisa visa analisar as mutações de resistência associando com os antirretrovirais e subtipo viral em pacientes com falha virológica à primeira linha do tratamento. A pesquisa coletará informações acerca de pacientes com idade maior ou igual a 18 anos, infectados com o HIV-1, que iniciaram a primeira linha da terapia antirretroviral e evoluíram com falha virológica.

Objetivo da Pesquisa:

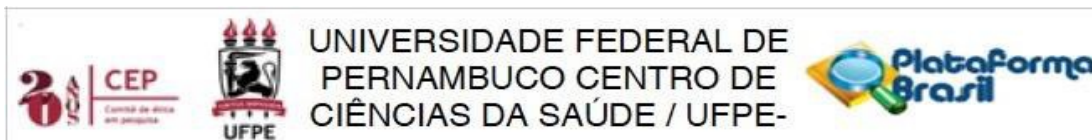
OBJETIVO GERAL

Analisar as mutações de resistência associando com os antirretrovirais e subtipo viral em pacientes com falha virológica à primeira linha do tratamento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a frequência de subtipos do HIV-1 e de mutações de resistência relacionada a droga;

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.985.922

- Comparar o perfil de mutações do grupo que iniciou antirretroviral antes de 2013 com o que iniciou depois;
- Verificar associação entre o acúmulo de mutações e o intervalo de tempo sob falha virológica;
- Analisar a proporção de pacientes com carga viral < 50 cópias/ml após 12 meses da troca para esquema de resgate.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCO

Há risco de dano ao prontuário, de quebra de sigilo, extravio de dados e privacidade dos voluntários cujos dados serão estudados. Estes riscos serão atenuados, uma vez que apenas o pesquisador irá manipulá-los e ficarão armazenados em pastas de arquivo do tipo excel do computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço Rua Januário Barbosa, 232, apto 1102, Madalena, pelo período de mínimo 5 anos.

BENEFÍCIOS

Os Benefícios são conhecer o perfil genotípico do paciente em falha virológica à primeira linha, bem como o esquema de resgate utilizado e resposta a ele.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta uma promissora abordagem, com mérito científico inquestionável. Apresenta uma excelente viabilidade, apresentando hipótese simples e metodologia de fácil execução e bastante clara.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão de acordo com as considerações do comitê de ética.

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

A emenda foi avaliada e APROVADA pelo colegiado do CEP.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br