

ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI



**RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS EM
INDIVÍDUOS COM AIDS E PREVALÊNCIA DE SUBTIPOS DO HIV-1
NO NORDESTE DO BRASIL: 2002 A 2004**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado, do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

ORIENTADORA

PROF^a. DRA. HELOISA RAMOS LACERDA DE MELO

Professora Adjunta do Departamento de Medicina Clínica

Centro de Ciências da Saúde

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CO- ORIENTADORA

PROF^a. DRA. ANA MARIA DE BRITO

Professora Adjunta do Dep. Medicina Social, Faculdade de Ciências Médicas

UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

Docente Pesquisadora do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

RECIFE

2005

Cavalcanti, Ana Maria Salustiano

Resistência secundária aos anti-retrovirais em indivíduos com AIDS e prevalência de subtipos do HIV-1 no Nordeste do Brasil: 2002 a 2004 / Ana Maria Salustiano Cavalcanti – Recife: O Autor, 2005.

73 folhas : il., tab., fig., gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2005.

Inclui bibliografia, apêndice e anexos.

1. Medicina tropical – Doenças sexualmente transmissíveis. 2. AIDS-HIV-1. – Resistência aos anti-retrovirais – Genotipagem – Prevalência de mutações. 3. Subtipos do HIV-1. – Prevalência no Nordeste brasileiro. I. Título.

**616.97
616.9792**

**CDU (2.ed.) UFPE
CDD (22.ed.) BC2005-553**



RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI

No dia 30 de agosto de 2005, às 14h00, na Sala Murillo La Greca do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – C.C.S./UFPE, os Professores: Prof. Dr. **Demócrito de Barros Miranda Filho** (Depto. de Clínica Médica-UPE – Membro Externo), Prof.^a Dr.^a **Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho** (Depto. de Fisiologia e Farmacologia-UFPE – Membro Interno) e Prof. Dr. **Ricardo Arraes de Alencar Ximenes** (Depto. de Medicina Tropical-UFPE – Membro Interno), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, argüíram a mestranda **ANA MARIA SALUSTIANO CAVALCANTI** sobre a sua Dissertação intitulada "RESISTÊNCIA SECUNDÁRIA AOS ANTI-RETROVIRAIS EM INDIVÍDUOS COM AIDS E PREVALÊNCIA DOS SUBTIPOS DO HIV NO NORDESTE DO BRASIL: 2002 A 2004". Ao final da argüição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho

APROVADA (DISTINÇÃO)

Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

APROVADA (DISTINÇÃO)

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Aprovada (Distinção)

Prof. Dr. Demócrito de Barros Miranda Filho

Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof. Dr. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**REITOR
PROF. AMARO LINS**

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROF. CELSO PINTO DE MELO**

**DIRETOR DE CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROF. TADEU PINHEIRO**

**DIRETORA SUPERINTENDENTE DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS
PROF. HELOÍSA MENDONÇA**

**CHEFE DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROF. JOSEMIR BELO DOS SANTOS**

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL
PROF. RICARDO ARRAES DE ALENCAR XIMENES**

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL
PROF^a. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO**

CORPO DOCENTE

**PROF^a. CÉLIA MARIA MACHADO BARBOSA DE CASTRO
PROF^a. ELIZABETH MALAGÑO DE SANTANA
PROF^a. HELOÍSA RAMOS LACERDA DE MELO
PROF^a. MARIA AMÉLIA VIEIRA MACIEL
PROF^a. MARIA DE FÁTIMA P. MILITÃO DE ALBUQUERQUE
PROF^a. MARIA ROSÂNGELA CUNHA DUARTE COELHO
PROF^o. RICARDO ARRAES DE ALENCAR XIMENES
PROF^a. SÍLVIA MARIA DE LEMOS HINRICHSEN
PROF^a. VERA MAGALHÃES DA SILVEIRA**

A Ruthênio, Yttérbio e Túlio,
meus “homens”,
companheiros de todas as horas.

A minha mãe, Dona Anita,
e meus irmãos,
pelo incentivo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho, desenvolvido no Laboratório Central de Pernambuco, faz parte do Projeto Nacional da Rede de Laboratórios de Genotipagem do HIV (RENAGENO), implantado pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, resultado de um esforço coletivo de pessoas e instituições de todo o Brasil.

Gostaria de expressar meus agradecimentos aos vários amigos e colegas que encontraram tempo para ajudar-me, de diversas formas, na construção deste trabalho, tornando-o possível.

Inicialmente, agradeço a minha orientadora, Heloisa Ramos Lacerda de Melo, pela dedicação, profissionalismo e paciência em todas as etapas da construção deste trabalho. Minha especial gratidão a Ana Maria de Brito, co-orientadora e amiga, sempre atenta e crítica, que, através da revisão minuciosa em todas as fases do trabalho, proporcionou rigor científico e enriquecimento de seu conteúdo.

Meu profundo e carinhoso agradecimento a minha querida sobrinha Daniela Salustiano, que sempre foi minha fiel colaboradora em todas as etapas deste trabalho, desde a implantação dos testes que atuou como estagiária, até o final da elaboração dessa dissertação, mesmo às vésperas do nascimento de Felipe.

Agradeço a todas as colegas da Divisão de Virologia, especialmente a Shirley, Lúcia e Marta, pela indispensável ajuda e suporte no desenvolvimento de minhas tarefas, bem como o carinho dedicado nesta batalha. Agradeço, também, aos meus colegas de trabalho do Laboratório e do Centro de Testagem e Aconselhamento de Olinda, que executaram várias atividades que a mim cabiam e pela compreensão durante todo o período do curso. Os agradecimentos são extensivos aos meus superiores e demais gerentes, tanto do LACEN, como da Secretaria de Saúde de Olinda, os quais liberaram meus compromissos tanto quanto possível, para o cumprimento deste estudo.

Meus agradecimentos a todos os professores que compõem o Curso de Mestrado de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, e um especial agradecimento aos secretários, Walter e Jupira, pelas orientações e cordialidade com que sempre me trataram. Meu especial obrigado a Ulisses Montarroyos pela contribuição na análise estatística e edição final do texto, assim como pela supervisão da base de dados, digitados por Edjane, a quem também gentilmente agradeço.

A todas as colegas da minha turma do Mestrado, Alethéia, Magda, Joana, Valéria, Paula e Francilídia, dirijo um especial agradecimento pelos quase três anos de estudo e alegre convívio.

Registro ainda um agradecimento a todos os médicos assistentes e aos pacientes, bem como aos médicos de referência em Genotipagem de todos os estados, especialmente a Magda Maruza, que iniciou comigo esta tarefa tão complexa da rede de genotipagem em Pernambuco.

Carinhosos agradecimentos devo expressar às minhas amigas Cândida Dantas e Suelene Oliveira, que conviveram comigo durante vários anos de trabalho na Divisão de Virologia do LACEN-PE, e que atuaram em dois momentos específicos da RENAGENO, respectivamente, na implantação da rede e atualmente como responsável técnica no Programa Nacional-DST e Aids, agradeço pelo apoio, amizade e confiança.

Agradeço também aos colegas Mônica Arruda e Rodrigo Brindeiro, do Laboratório de Referência da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e Ricardo Diaz e Patrícia Munerato, do Laboratório de Retrovirologia da Universidade Federal de São Paulo, pela ajuda no resgate de amostras e durante todo o processo de desenvolvimento da RENAGENO em nosso laboratório.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram no desenvolvimento deste tão árduo, mas gratificante, trabalho.

“[...] uma doença se torna o mal do século porque cristaliza, porque simboliza mesmo, a maneira como uma sociedade vive coletivamente o medo e a morte. Nesse sentido, a doença importa tanto por seus efeitos imaginários quanto por seus efeitos reais” (Michel Mafesoli, 1987).

“A AIDS não escapa a essa regra: muito depressa, saiu do mundo médico para pôr em questão os próprios fundamentos de nossa sociedade. Presente em nossa vida cotidiana, ela nos obriga a refletir e, eventualmente, a modificar nossos comportamentos. Nenhuma doença na época contemporânea nos incitou tanto a pôr em questão nossa identidade, nossos valores, nosso senso de tolerância e de responsabilidade” (Luc Montagnier, 1995).

RESUMO

O tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem contribuído para uma mudança do perfil de morbimortalidade da Aids, principalmente a partir de 1996, com o uso da terapia anti-retroviral (ARV) combinada. Apesar do indiscutível avanço do tratamento ARV, pela expressiva redução na ocorrência de infecções oportunistas e das internações hospitalares, e um aumento significativo no tempo de sobrevivência, problemas com esse tipo de terapia têm sido registrados: alguns pacientes não apresentam supressão da replicação viral devido a vários fatores, entre eles a resistência aos ARV. Com o objetivo de estudar o perfil das mutações do HIV relacionadas à resistência aos ARV após falha terapêutica, a distribuição dos subtipos circulantes no Nordeste do Brasil e as mutações presentes nos subtipos mais prevalentes foram analisadas 576 amostras de sangue de indivíduos com Aids, com falha terapêutica aos anti-retrovirais, procedentes de seis estados do Nordeste, no período de 2002 a 2004. Utilizou-se o teste de genotipagem, Kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, USA) que processa automaticamente o DNA gerado, por amplificação viral, identificando as mutações relacionadas com a resistência do gen *pol* do HIV aos ARV. As seqüências geradas foram analisadas pelo Stanford Sequence Resistance Data Base da Stanford University para identificação dos subtipos virais. Os exames foram realizados pelo Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco (LACEN/PE) que integra a Rede Nacional de Genotipagem do HIV (RENAGENO) do Programa Nacional de DST/Aids. Os resultados revelaram que 91,1% dos pacientes apresentavam mutação relacionadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), 58,7% aos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN) e 94,8%, aos inibidores da proteases (IP). As mutações mais prevalentes foram 184V e 215E para ITRN, 103N e 190A para ITRNN e as mutações secundárias 63P e 36I para IP. A resistência relacionada com as classes de drogas evidenciou que 14% apresentavam resistência a uma única classe, 61% a duas classes e 18,9% a três classes de ARV. O subtipo B foi o mais prevalente (82,4%) seguido do subtipo F (11,8%), e de formas recombinantes (4,6%). Cerca de 72 % das amostras do subtipo F foram procedentes de Pernambuco. A prevalência de mutações relacionadas aos ITRN e ITRNN foi semelhante nos dois subtipos, porém a análise dos códons relacionados com os IP mostrou maior freqüência de mutações no códon 63 no subtipo B e no códon 36, no subtipo F. Os achados do presente estudo mostram uma elevada freqüência de mutações primárias que conferem

resistência aos ITRN e ITRNN aparentemente com poucas diferenças nas mutações decorrentes da falha terapêutica. O monitoramento dos pacientes com falha ao tratamento por meio dos exames de genotipagem é uma importante ferramenta para auxiliar os médicos na terapia de resgate, reduzindo inclusive gastos com terapias ineficientes ou inadequadas. Além disso, o teste possibilita verificar a prevalência dos subtipos na região. A circulação de vírus resistentes aos anti-retrovirais pode representar um problema de saúde pública pelo risco de transmissão de cepas resistentes.

Palavras chaves: Vírus da Imunodeficiência Adquirida tipo 1; Resistência anti-retroviral; Genotipagem; Sub-tipos; Nordeste.

ABSTRACT

The treatment of HIV infection has contributed for the changing in the mobility and mortality profile of AIDS in Brazil, mainly since 1996, when the Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) begun to be used. In spite of the advance on HIV treatment, with reduction on opportunistic infections and hospitalizations, and an important increase on life expectancy. Some problems with this therapy have been related. Some patients could not have their viral replication suppressed because of many factors, like drugs resistance. This study had the objective of analyzing: the HIV mutation profile related to the antiretroviral resistance after therapeutic fail; the distribution of HIV subtypes, present on Northeastern Brazil; and the mutations on the subtypes more prevalent. It has analyzed 576 blood samples from patients with AIDS and therapeutic failure, collected on six different states of the Brazilian Northeast, since the year 2002 until 2004. The genotyping Kit ViroSeq™ (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories, USA), that automatically processes the DNA generated, has been used to make viral amplification, identifying the mutations related with the HIV's *pol* gene resistance to the antiretroviral drugs. The sequence has been analyzed by the Stanford Sequence Data Base for viral subtypes identification. The laboratory exams were done at Central Laboratory of Public Health of Pernambuco, that is part of the National Genotyping Network from the National Programm of STD/AIDS. The results reveled that 91,1% of the patients had mutation for the reverse transcriptase nucleoside inhibitors (NRTI), 58,7% for the reverse transcriptase non-nucleoside inhibitors (NNRTI) and 94,8%, for the protease inhibitors (PI). The mutations more prevalent were 184V and 215E for NRTI, 103N and 190A for NNRTI and secondary mutation 63P and 36I for PI. The resistance related to the drugs classes had evidenced that 14% had resistance for only one class, 61% for two classes and 18,9% for three classes of antiretroviral. The subtype B was the most prevalent (82,4%) followed by subtype F (11,8%) and recombinant forms (4,6%). Around 72% of the samples from subtype F had been from people leaving in Pernambuco. The prevalence of mutations related to NRTI and NNRTI was the same in the two subtypes, but the codons analysis, related with PI, showed greater frequency of mutations on the code 63 on subtype B, and code 36 on subtype F. The findings concerning the present study showed an elevated frequency of primary mutations, that provides resistance for NRTI and NNRTI, apparently with few differences occurring from therapeutic failure. The monitoring of patients with treatment failure given by genotyping exams is an important tool to aid physicians on the rescue therapy also reducing expenses

with inefficient or inadequate therapies. Therefore, the test provides a way to verify the regional subtypes prevalence. The antiretroviral resistant virus circulation may represent a problem to public health because it increases the risk of transmission of resistant strains.

Key words: human immunodeficiency virus; antiretroviral resistance; genotyping; subtypes; Northeast

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1 - Percentual de resistência aos ARV de acordo com o número de classes de drogas. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 32 |
| Gráfico 2 - Relação entre número médio de mutações detectadas e o número de esquemas terapêuticos utilizados pelos 516 pacientes estudados. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 33 |
| Gráfico 3 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias relacionadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN). Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 35 |
| Gráfico 4 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias relacionadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos não nucleosídeos (ITRNN). Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 36 |
| Gráfico 5 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias relacionadas aos inibidores da protease (IP). Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 37 |
| Gráfico 6 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), relacionadas com os subtipos B e F. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 43 |
| Gráfico 7 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos não nucleosídeos (ITRNN), relacionadas com os subtipos B e F. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 44 |
| Gráfico 8 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores da protease (IP), relacionadas com os subtipos B e F. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 45 |

FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 na região Nordeste do Brasil-2002 a 2004..... | 40 |
|---|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Distribuição dos dados demográficos, imunológicos e virológicos dos 576 indivíduos estudados. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 31 |
| Tabela 2 - Distribuição das amostras com mutações relacionadas a resistência aos ARV nas 516 amostras analisadas. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 32 |
| Tabela 3 - Correlação de Pearson entre número médio de mutações e número de esquemas terapêuticos, por classe de droga ARV..... | 33 |
| Tabela 4 - Distribuição dos subtipos do HIV-1 nas 502 amostras analisadas. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 39 |
| Tabela 5 - Distribuição dos dados demográficos, imunológicos e virológicos dos 473 indivíduos estudados relacionados com os subtipos mais prevalentes - B e F..... | 41 |
| Tabela 6 - Frequência de amostras com mutações relacionadas à resistência aos ARV de acordo com os subtipos B e F, nas 473 amostras analisadas. Região Nordeste, 2002 a 2004..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| ABI | Applied Biosystems |
| ARV | Anti-retroviral |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| DST | Doenças Sexualmente Transmissíveis |
| HIV | Vírus da Imunodeficiência Humana |
| IP | Inibidores da Protease |
| ITRN | Inibidores da Transcriptase Reversa Análogo de Nucleosídeo |
| ITRNN | Inibidores da Transcriptase Reversa não-Análogo de Nucleosídeo |
| LACEN | Laboratório Central de Saúde Pública |
| MRG | Médico de Referência em Genotipagem |
| MS | Ministério da Saúde |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| PN-DST e Aids | Programa Nacional DST e Aids |
| PR | Protease |
| RENAGENO | Rede Nacional de Genotipagem |
| RNA | Ácido Ribonucléico |
| TAM | Mutações associadas aos timidínicos. |
| TR | Transcriptase Reversa |

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISAO DA LITERATURA | 20 |
| 2.1 Resistência aos anti-retrovirais | 20 |
| 2.2 Subtipos do HIV-1 | 22 |
| 3 OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 Objetivo geral | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos | 24 |
| 4 METODOLOGIA | 25 |
| 4.1 População do estudo | 25 |
| 4.2 Características da população | 25 |
| 4.3 Desenho do estudo | 26 |
| 4.4 Critérios de inclusão das amostras | 26 |
| 4.5 Definição das variáveis | 26 |
| 4.6 Processamento das amostras | 27 |

| | |
|---|----|
| 4.6.1 <i>O teste de genotipagem do HIV</i> | 28 |
| 4.6.2 <i>A determinação dos subtipos</i> | 29 |
| 4.7 Processamento e análise dos dados | 29 |
| 4.8 Considerações éticas | 29 |
| 5 RESULTADOS | 31 |
| 5.1 Perfil da população estudada e caracterização das mutações | 31 |
| 5.2 Análise dos subtipos de HIV-1 | 39 |
| 6 DISCUSSÃO | 46 |
| 7 CONCLUSÕES | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| APÊNDICE | |
| ANEXOS | |

1 INTRODUÇÃO

A principal finalidade da terapia anti-retroviral para indivíduos com infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) é retardar a progressão da imunodeficiência, aumentando a sobrevivência dos casos de aids, diminuindo a ocorrência de infecções oportunistas e melhorando a qualidade de vida dos doentes. Um esquema terapêutico anti-retroviral consiste em uma associação de drogas com o propósito de diminuir a carga viral plasmática para atingir níveis indetectáveis na circulação periférica, de maneira persistente. Embora nenhum esquema anti-retroviral seja curativo, vários estudos comprovam o benefício desta terapia em pacientes com Aids (COFFIN et al., 1995; LITTLE et al., 1999).

No Brasil, a distribuição gratuita de medicamentos anti-retrovirais passou a ser feita pelo Ministério da Saúde, a partir de 1991. Em 1996 foi introduzida a terapia anti-retroviral de alta eficácia ou *Highly Active Antiretroviral Therapy* (HAART), tratamento já preconizado em países desenvolvidos, aos pacientes com HIV e Aids, segundo recomendações técnicas consensuais definidas por Comitê Técnico Assessor, instituído pelo Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids (PN-DST e Aids). Esta medida tem causado grande impacto na epidemia especialmente na redução da morbi-mortalidade. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar falha terapêutica à terapia anti-retroviral (ARV) sugerindo que os mesmos podem ser portadores de variantes virais resistentes. Os portadores de vírus mutantes, além de não responderem adequadamente a terapia ARV podem transmitir cepas de vírus mutantes, representando potencial problema de saúde pública, e comprometendo a política de medicamentos do PN-DST e Aids (BRASIL, 2001).

A falha terapêutica pode ocorrer por defeito do sistema imune, falta de adesão ao tratamento, concentrações sub ótimas das drogas, má absorção ou resistência viral (GATELL et al., 2001; RICHMAN, 1996; DURANT et al., 1999). O surgimento da resistência às drogas anti HIV é o fator limitante para o sucesso da terapia da Aids, e essa resistência é consequência da diversidade do HIV. O HIV apresenta alta taxa de replicação e elevada taxa de mutação que leva à geração contínua de partículas virais com mutações em seu material genético. Aproximadamente 10 bilhões (10^{10}) de partículas de HIV são geradas diariamente (PERELSON et al., 1996) e com uma taxa de mutação de 10^5 nucleotídeos por ciclo replicativo aproximadamente, uma mutação é gerada a cada novo genoma de aproximadamente 9.200 nucleotídeos, resultando em 10^4 a 10^5 mutações por dia (MANSKY;

TEMIN, 1995). Com o acúmulo de mutações de resistência, a susceptibilidade às drogas diminui, reduzindo progressivamente a potência dos componentes do esquema terapêutico. A replicação contínua na presença das drogas seleciona, para níveis ainda maiores de resistência, a cada droga administrada, e progressivamente induzem também a uma resistência cruzada com outras drogas da mesma classe. Dessa forma esquemas terapêuticos impotentes, baixa adesão, absorção limitada das drogas e compartimentos corporais tratados ineficientemente, entre outros fatores, podem permitir a emergência de vírus resistentes (SHAFER, 2002; CLAVEL; HANCE, 2004).

Resistência é, portanto, consequência de mutações que emergem em alvos protéicos virais por agentes anti-retrovirais, conceituada como a diminuição da susceptibilidade às drogas anti-retrovirais, e dividida em primária e secundária. A resistência primária é a que já está presente mesmo antes do uso da medicação pelo indivíduo infectado. A secundária é aquela que aparece em consequência da pressão seletiva exercida pela terapia ARV.

As mutações existentes nos genes que codificam as enzimas transcriptase reversa (RT) e protease (PR) do HIV-1, associadas à resistência aos ARV, podem ser definidas como principais ou primárias e acessórias ou secundárias. As mutações principais são aquelas que produzem significativa perda da susceptibilidade ao anti-retroviral que a selecionou e, normalmente, é a primeira mutação que emerge em decorrência do uso do ARV. As mutações secundárias, por outro lado, causam perda modesta de susceptibilidade ao anti-retroviral que a selecionou e aparece, comumente, para recuperar o *fitness* viral, ou seja, a capacidade adaptativa do vírus, perdida pelo aparecimento da mutação principal.(DIAZ,2004)

As mutações associadas à resistência têm sido associadas às três principais classes de drogas anti-retrovirais: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeo (ITRN); inibidores da transcriptase reversa não-análogos de nucleosídeo (ITRNN); e inibidores da protease (IP). Algumas drogas ITRN podem ter sua atividade reduzida devido ao aparecimento de uma única mutação no gene da transcriptase reversa ou um maior número de mutações da TR pode ser necessário para conferir resistência significativa a outros ITRN. Para a classe dos ITRNN a resistência pode ser conferida por uma única mutação no gene da TR. Por outro lado, múltiplas mutações são frequentemente necessárias no gene da protease antes do desenvolvimento da resistência aos IP (CERQUEIRA et al., 2004). As principais drogas anti retrovirais atualmente em uso encontram-se listadas no anexo A.

O acúmulo de resistência às drogas anti-retrovirais impõe desafios na melhoria do tratamento de pacientes com vírus mutantes. Os testes de resistência às drogas têm sido incorporados ao tratamento e monitoramento de pacientes com Aids (HIRSCH et al., 2003).

Estes testes podem ajudar a determinar qual droga poderá não funcionar, diminuindo custo e toxicidade, facilitando a adoção de regimes terapêuticos mais eficazes para a completa eliminação de partículas virais em circulação (ROLAND et al., 1999).

Dois tipos de ensaios estão sendo utilizados para avaliar e monitorar o tratamento dos pacientes submetidos à terapia ARV: fenotipagem e genotipagem. Os ensaios de fenotipagem medem a susceptibilidade do vírus às drogas em cultura de células, ou seja, determinam a quantidade de droga necessária para inibir a replicação do HIV-1 *in vitro*. A resistência fenotípica representa o “comportamento” do vírus em meio de cultura na presença de anti-retrovirais sendo determinada a concentração da droga que é capaz de inibir a replicação viral em 50, 90 ou 95%. Os testes de genotipagem determinam a seqüência genômica da região que codifica as enzimas transcriptase reversa (RT) e protease (PR) do HIV-1, analisando automaticamente o ácido desoxirribonucléico (DNA) gerado por amplificação do ácido ribonucléico (RNA) viral. Esta análise permite a identificação dos pontos de mutação do HIV isolado, revelando a que drogas anti-retrovirais o vírus está resistente, permitindo redirecionar o tratamento (HERTTOGS et al., 1998; PETROPOULOS et al., 2000; MORTENSEN; AZEVEDO; MUNERATO, 2002).

Estudos estão sendo realizados em diferentes países para avaliar a resistência aos anti-retrovirais, tanto a primária como a secundária. Os estudos prospectivos Viradapt (Europa), Gart (Estados Unidos), Narval (França), Havana (Espanha) e Avanti (Itália) avaliaram o benefício da genotipagem para auxiliar no resgate terapêutico dos pacientes com falha terapêutica. Os resultados mostraram que, nos pacientes com falha ao tratamento aos anti-retrovirais, são freqüentes presença de mutações. Indicam ainda que a utilização do ensaio de genotipagem resulta em maior eficácia na troca dos medicamentos quando orientada pelo resultado do teste, quando comparada com a troca empírica, habitualmente utilizada. Em relação ao custo do teste, observa-se uma diminuição dos gastos com medicamentos pelo uso mais precoce e correto do tratamento, principalmente no uso racional dos inibidores de protease (DIAZ, 2004).

Estudos conduzidos no Brasil demonstram a presença de resistência em pacientes com falha terapêutica. Pesquisa realizada em São Paulo, que incluiu 791 pacientes, revelou uma resistência de 99% aos anti-retrovirais, sendo 94,7% aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), 58% aos inibidores de protease (IP) e 48% aos inibidores da transcriptase reversa não análogos de nucleosídeos (ITRNN). Este estudo também demonstrou que 21,5% dos pacientes apresentavam resistência a uma classe de anti-retrovirais, 42,2% a duas classes e 34,4% a três classes dessas drogas, comprometendo

fortemente a terapia nos pacientes estudados (SUCUPIRA et al., 2002). Outros estudos demonstram a alta prevalência de mutações relacionadas com a resistência aos anti-retrovirais atualmente em uso no Brasil: no Rio de Janeiro e em São Paulo, ensaios com pacientes que realizaram genotipagem, mostrou uma alta prevalência de mutações primárias relacionadas com a resistência aos ITRN e aos ITRNN, assim como mutações associadas aos timidínicos (TAM) (RODRIGUES et al., 2005; COUTO-FERNANDEZ et al., 2005).

O adequado monitoramento da terapia ARV inclui, entre outros fatores, o conhecimento da resistência secundária às drogas utilizadas, em pacientes com falha terapêutica, com o intuito de estender ao máximo a supressão viral e conseqüentemente os efeitos indesejáveis da imunodeficiência. Há necessidade então, do desenvolvimento de estudos sobre a resistência genotípica aos anti-retrovirais e estudos sobre a prevalência dos subtipos circulantes, que permitam uma melhor compreensão da situação dos pacientes com aids, para auxiliar na seleção da terapia de resgate de pacientes atendidos na rede pública de saúde.

O Programa Nacional de DST e Aids implantou, em dezembro de 2001, a Rede Nacional de Genotipagem do HIV-1-RENAGENO, composta por vários laboratórios distribuídos nas diferentes regiões do País, aptos a executar o exame de genotipagem do HIV-1, com a finalidade de detectar a ocorrência de resistência genotípica deste vírus frente aos anti-retrovirais, além de contar com médicos treinados na interpretação do teste de genotipagem e na seleção da terapia de resgate.

O Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Pernambuco (LACEN-PE) ficou responsável pela realização dos exames de genotipagem dos pacientes com aids atendidos nos hospitais de referência dos seguintes estados da região Nordeste: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas.

Este estudo propõe-se a analisar as mutações do gen *pol* do HIV-1 associadas com a resistência aos anti-retrovirais e identificar os subtipos virais circulantes, por meio do exame de genotipagem, nos pacientes com aids residentes no nordeste do Brasil, que apresentaram falha terapêutica aos anti-retrovirais, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

2 REVISAO DA LITERATURA

2.1 Resistência aos anti-retrovirais

Vários estudos clínicos e moleculares foram desenvolvidos na Europa e EUA para validar o teste de genotipagem do HIV-1, como indicador prognóstico da falha terapêutica de natureza viral e da sua utilização para aconselhamento clínico na decisão do esquema anti-retroviral de resgate terapêutico.

Estudos de análise da genotipagem como fator prognóstico mostraram a aplicabilidade do teste de genotipagem em casos de resgate de pacientes com falha terapêutica. Entre eles: o estudo Gart randomizou pacientes em dois grupos: o primeiro usando o teste de genotipagem como referencial para o resgate terapêutico e o segundo grupo não usou o teste e teve como referencial apenas a experiência clínica dos médicos assistentes. O percentual de pacientes com carga viral inferior a 500 cópias/ml após 4, 8 e 12 semanas de acompanhamento foram 45% versus 23%, 51% versus 25% e 29% versus 17% para o grupo que usou o teste de genotipagem em relação ao grupo que não usou o teste, respectivamente. No estudo Narval, 541 pacientes com uso prévio de ARV foram randomizados em três grupos: um primeiro grupo foi tratado de forma convencional pelos seus médicos assistentes; um segundo, usando o teste de fenotipagem como referencial para o resgate terapêutico; e um terceiro grupo, baseou-se no teste de genotipagem para a indicação da terapia. O percentual de pacientes que tiveram supressão viral, medida pela carga viral inferior a 200 cópias/ml, após 12 semanas de tratamento, foi: 35% para o grupo que utilizou a fenotipagem, 44% para o grupo que se baseou no teste de genotipagem para o tratamento de resgate e 36% para o grupo controle tratado sem nenhum teste de resistência. Durant et al., 1999, no estudo Viradapt, arrolaram um grupo de pacientes tratados com o auxílio da genotipagem (n=65) e um grupo controle tratado de forma *standard* (n=43). Os resultados obtidos demonstraram que, após três meses de seguimento, a média da queda da carga viral foi de 1,04 *log* para o grupo que usou a genotipagem e de 0,4 *log* para o grupo controle. Após seis meses de acompanhamento, a queda da carga viral foi de 1,15 *log* para o primeiro grupo e 0,67, para o segundo. Além disso, dados de custo do tratamento, apresentados por Chaix et al. (2001), a partir do estudo Viradapt, sugerem que os gastos com genotipagem no grupo de pacientes submetidos a esse ensaio foram semelhantes aos do grupo sem acesso a genotipagem. A diminuição nos custos

do grupo onde houve gastos com os testes genotípicos, foi devido à diminuição nos gastos com os medicamentos anti-retrovirais, especialmente com inibidores de protease (IP). Os autores também apontam para o uso racional dos IP e na diminuição dos efeitos adversos a essas medicações. Clotet et al. (2002) avaliaram dois grupos de pacientes com falha terapêutica, um recebendo tratamento com base na genotipagem e outro somente com a experiência clínica do médico. O grupo da genotipagem foi subdividido em dois subgrupos: no primeiro o médico ao interpretar o resultado do teste teve o auxílio de um virologista e no outro sub-grupo, interpretou sozinho as mutações apresentadas no laudo. Observou-se que os pacientes do primeiro grupo – que recebeu tratamento com base na genotipagem – tiveram melhores resultados no tratamento. Com relação ao subgrupo que não teve o auxílio de um virologista, observaram-se os mesmos resultados dos que não tinham utilizado o teste de genotipagem, demonstrando que o exame é bastante útil, mas que requer uma interpretação cuidada e altamente especializada para se obter resultados satisfatórios para o paciente.

Em relação à prevalência da resistência primária aos ARV, estudos conduzidos em diferentes países, independente da classe de drogas, de uma maneira geral, mostram resultados que oscilam entre 3 a 35%, estando intimamente relacionados à localidade pesquisada e as particularidades relativas às políticas de acesso aos ARV em cada país (DIAZ, 2003). Na Espanha, obtiveram-se percentuais de 17% de resistência para o ITRN e de 6% para os IP (PUIG et al., 2000). A prevalência da resistência primária, nos Estados Unidos da América, passou de 3,5% no período de 1995-98 para 14%, no período de 1999-2000, com um incremento de três vezes (LITTLE et al., 2002). Nos países da Europa a prevalência da resistência primária também difere, por exemplo, na Inglaterra foi de 7,9%; na Suíça, 10% e na Itália, 21% (DIAZ, 2003).

Estudos conduzidos em diversas localidades no Brasil também mostraram diferentes valores de prevalência primária. Em uma pesquisa que incluiu 535 amostras de pacientes procedentes de vários estados do Brasil, em pacientes virgens de tratamento, no ano de 2001, foi detectada uma prevalência de resistência primária de 2,2% para os IP; 2,4% para os ITRN; e 2,1% para ITRNN (BRINDEIRO et al., 2003). Por outro lado, Sucupira et al. (2002), analisando 90 pacientes na cidade de Santos, São Paulo, atendidos entre 1999 e 2001, observaram que 35% das pessoas com infecção recente já tinham vírus mutante, justificando a realização do teste de genotipagem para iniciar uma terapia anti-retroviral. Estudo conduzido no Rio de Janeiro, com 56 pacientes atendidos no Hospital Geral do Exército, entre 2000 e 2002, a prevalência estimada de mutação primária relacionada aos ITRN foi de 14%, e não se identificou nenhuma mutação primária relacionada aos IP (PIRES et al., 2004). Em

Pernambuco, estudo conduzido em 84 pacientes virgens de tratamento, entre 2002 e 2003, mostrou baixa prevalência de mutações primárias para ITRN (2,4%) e nenhuma mutação primária para ITRNN e IP, entretanto, foram observados percentuais relevantes de mutação secundária para ITRN e IP, da ordem de 20,2% e 78,3%, respectivamente (MEDEIROS, 2005).

O perfil de resistência genotípica em pacientes com falha terapêutica, tomando como base amostras processadas pelos laboratórios da RENAGENO ou por outros estudos moleculares, em diferentes estados do Brasil, revelam frequências elevadas e bastante semelhantes de mutações nos códons 184, 103 e 90 associadas, respectivamente, aos ITRN, ITRNN e IP (RODRIGUES et al., 2005; COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; WALERIA-ALEIXO; CLETO; GREGO, 2005).

2.2 Subtipos do HIV-1

A diversidade genética é uma das características mais marcantes do HIV. Os diversos padrões genéticos nas populações de HIV podem alterar a estrutura, função e imunogenicidade de seus produtos gênicos de maneira biologicamente significativa. A população viral em um indivíduo infectado com HIV apresenta-se com microvariantes que são bastante relacionados, porém geneticamente distintas entre si, que são chamadas de *quasispecies*, (SAAG et al., 1988). Os subtipos do HIV-1 foram classificados através de análises filogenéticas e atualmente estão distribuídos nos grupos M (*main*), O (*outlier*) e o N (*non-M/non-O*) (GURTLER et al., 1994; SIMON et al., 1998; ROBERTSON et al., 2000). O grupo M é o mais prevalente e subdividido em subtipos (A, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) e formas recombinantes circulantes (CRF) que são híbridos entre subtipos diferentes.

O subtipo C é atualmente o mais freqüente no mundo, sendo responsável por 48% das infecções globais, porém nos países desenvolvidos da Europa e Estados Unidos o subtipo mais freqüente é o B, e no continente africano estão presentes praticamente todos os subtipos virais (APETREI; MARX; SMITH, 2004). Análises realizadas, em 1993, com banco de dados de seqüências do HIV revelaram que 10% das seqüências do HIV-1 eram na verdade recombinantes sugerindo que, além do fenômeno de *quasispecies* a recombinação tem um papel importante na diversidade genética do vírus (ROBERTSON et al., 1995).

Os primeiros estudos sobre subtipos realizados no Brasil detectaram a presença de subtipos B e F, sendo o subtipo B o mais freqüente (LOUWAGIE et al., 1993). No Rio de Janeiro, Morgado et al. (1998) identificaram 80,9% de subtipo B, 15,3% de subtipo F e uma

única amostra do subtipo D em 131 pacientes analisados. Dados semelhantes foram encontrados por Tanuri et al. (1999) no Rio de Janeiro analisando 43 amostras de doadores de sangue, encontrando 76,7% de subtipo B, 14% do subtipo F e 9,3% de mosaicos dos subtipos B/F ou B/D. A distribuição da infecção pelo HIV-1 de acordo com os subtipos no País parece estar sofrendo alterações ao longo dos anos. Estudos recentes encontraram os seguintes subtipos circulantes: B (45,2%), C (40%), F (12%) e 3% de recombinantes entre dois ou mais subtipos no Rio Grande do Sul (SOARES et al., 2003). Em outro trabalho, analisando amostras de 535 indivíduos virgens de tratamento ARV de vários estados, encontrou-se uma maior prevalência do subtipo B (64,9%), seguido dos subtipos C (22,8%) e F (11,8%); observou-se, ainda, em alguns estados da região Sul do país uma acentuada prevalência do subtipo C 24%, no Paraná e 44%, no Rio Grande do Sul, enquanto em estados da região Nordeste uma maior circulação dos subtipos B e F, demonstrando uma mudança substancial na distribuição dos subtipos circulantes nas diferentes regiões brasileiras (BRINDEIRO et al., 2003).

Análises com amostras da RENAGENO, em São Paulo, mostraram uma prevalência do subtipo B em 70% dos casos, 12% do subtipo F e 18% de recombinantes B/F (RODRIGUES et al., 2005). Os dados do Rio de Janeiro revelam uma prevalência de 91,2% do subtipo B, 4,9% do subtipo F e apenas 0,4% do subtipo C; cerca de 3,3% eram recombinantes B/F (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005).

Em Pernambuco, a análise de 84 amostras de pacientes virgens de tratamento anti-retroviral, mostrou uma prevalência de 72,6% do subtipo B, 22,5% do subtipo F, 3,6% de recombinantes B/F e apenas um caso de subtipo C (1,2%) (MEDEIROS, 2005).

Recentemente, estudo apresentado durante a 3rd IAS Conference, por Munerato et al. (2005), revelou uma prevalência de 86% do subtipo B, 5% do F, 1,9% do subtipo C e 7,1% de formas recombinantes B/F, em pacientes de São Paulo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar as mutações no gen *pol* do HIV-1 e identificar os subtipos virais, em amostras de sangue de indivíduos com aids residentes na região Nordeste do Brasil, que apresentaram falha à terapia anti-retroviral, detectadas pelo exame de genotipagem realizado no LACEN – PE no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características demográficas, imunológicas e virológicas dos pacientes com falência terapêutica submetidos ao teste de genotipagem;
- Determinar a frequência das mutações do gen *pol* do HIV-1 nas regiões das enzimas transcriptase reversa (TR) e protease (PR), relacionadas com as três classes de medicamentos anti-retrovirais (ITRN, ITRNN e IP);
- Determinar a frequência de resistência relacionada com as diferentes classes de anti-retrovirais;
- Estabelecer a correlação entre o número de esquemas anti-retrovirais e a média de mutações para cada classe de anti-retrovirais;
- Identificar os subtipos do HIV-1 circulantes nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas;
- Verificar a associação entre as características demográficas, imunológicas e virológicas dos pacientes com falha terapêutica aos anti-retrovirais, e os subtipos mais prevalentes (B e F);
- Descrever a associação entre as mutações relacionadas às três classes de anti-retrovirais e os subtipos mais prevalentes (B e F) em pacientes com falha terapêutica aos anti-retrovirais.

4 METODOLOGIA

4.1 População do estudo

Indivíduos com aids que apresentaram falha terapêutica aos anti-retrovirais, residentes nos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, que realizaram o teste de genotipagem do HIV no LACEN – PE no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

4.2 Características da população

A Rede Nacional de Genotipagem inicialmente foi implantada em 2001, em 14 laboratórios distribuídos pelo Brasil, segundo capacidade técnica/científica, estrutura física/pessoal instalada, e de acordo com o número de pacientes em uso de anti-retrovirais nas diferentes macro regiões do país. A localização dos laboratórios foi determinada de comum acordo entre as Coordenações Estaduais e o Programa Nacional. O número de exames mensais que cada laboratório deveria processar foi pré-estabelecida pelo PN-DST e Aids, baseado no número de pacientes em tratamento com anti-retrovirais, proporcional a cada região, sendo considerado também a capacidade operacional dos laboratórios executores, sendo disponibilizado um total de 6000 testes para toda a rede laboratorial, no primeiro ano de funcionamento. Atualmente, a rede conta com 18 laboratórios em todo o país (anexo B).

Além da equipe dos laboratórios, foram inicialmente capacitados cerca de 60 médicos de referência em genotipagem (MRG), em todo o Brasil, com o intuito de padronizar as condutas para interpretação dos laudos dos exames, conforme documento elaborado por comitê assessor do PN-DST e Aids, e atualmente se dispõe de 160 MRG treinados. Ficou estabelecido que todas as solicitações do exame de genotipagem deveriam ser autorizadas pelos MRG através de formulários específicos para a coleta do sangue e o processamento pelo laboratório executor. (anexo C e D) Os laudos liberados após a realização dos testes foram enviados aos MRG e após interpretação clínica dos resultados, os mesmos foram encaminhados ao médico solicitante com sugestões de uma possível terapia de resgate para o paciente por ele assistido. Todos os pacientes que realizaram o exame de genotipagem assinaram um protocolo de consentimento livre /esclarecido (anexo E). O LACEN-PE ficou responsável pela realização dos testes de genotipagem do HIV para os estados de Piauí,

Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, recebendo 595 amostras de sangue enviadas por esses estados no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004.

4.3 Desenho do estudo

Estudo descritivo, observacional, do tipo transversal. Neste estudo identificaram-se as mutações e os subtipos em amostras de sangue de indivíduos que são atendidos nas unidades de referência para tratamento de pessoas com aids de seis estados da região Nordeste, revelando o perfil das mutações e dos subtipos circulantes do HIV-1 mais freqüentes na região nos últimos três anos da epidemia de aids.

4.4 Critérios de inclusão das amostras

Foram incluídos indivíduos com aids atendidos nos hospitais de referência da região Nordeste, que apresentaram evidência de falha terapêutica a um ou mais esquemas anti-retrovirais. Considera-se falha terapêutica o aumento da carga viral plasmática acima de 5000 cópias/ml ou 0,5 log (falha virológica) e/ou uma diminuição dos níveis dos linfócitos TCD4+ maior que 25% em valores absolutos ou 3% em valores percentuais (falha imunológica), e/ou aparecimento ou recidiva de infecções oportunistas (falha clínica) no indivíduo sob tratamento com anti-retrovirais.

4.5 Definição das variáveis

- **Variáveis independentes:** idade, sexo, local de residência, última determinação da carga viral, última contagem de linfócitos TCD4+ e condição clínica do paciente, falência ao primeiro esquema terapêutico, e ano do diagnóstico da infecção pelo HIV.
- **Variáveis dependentes:** mutações detectadas no gene *pol* nas regiões da transcriptase reversa e da protease, e subtipos identificados nas amostras seqüenciadas.

Categorização das variáveis:

- A variável **sexo** foi categorizada como masculino e feminino;

- A variável **idade** foi categorizada em menor de 25 anos, de 25 a 34 anos, de 35 a 49 anos e 50 e mais;
- A variável **local de residência** considerou-se o estado onde o paciente residia;
- A variável **última determinação da carga viral**, foi categorizada em > ou igual a 100.000 cópias RNA/ml de sangue, de 10.000 a 100.000 cópias RNA/ml e <10.000 cópias RNA/ml;
- A variável **última contagem de linfócitos TCD4+** foi categorizada como menor de 200 células por mm³, de 200 a 349 células/mm³ e 350 células/mm³ e mais.
- A variável **condição clínica do paciente** foi categorizada em sintomático e assintomático

Com relação as variáveis independentes, foram consideradas de cada paciente, todas as **mutações primárias e secundárias** detectadas nos genes da Transcriptase reversa e da Protease relacionadas com a resistência aos anti-retrovirais inibidores nucleosídeos e não nucleosídeos da RT e aos inibidores da PR, descritas no resultado do teste - laudo Celera Diagnostic/Abbott. (anexo F)

Em relação aos subtipos, foram considerados os **subtipos identificados pelo banco de análises de seqüências da Stanford University**, considerando os subtipos do HIV-1 do grupo M (*major*) inclusive formas recombinantes.

4.6 Processamento das amostras

Foram recebidas para a realização do teste de genotipagem do HIV-1 no período de janeiro 2002 a dezembro de 2004, amostras de sangue coletadas de 595 pacientes com aids, atendidos nos hospitais de referência dos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Piauí. As amostras estavam acompanhadas com suas fichas de solicitação do teste, do formulário de deferimento do MRG e do consentimento livre e esclarecido assinado. Dezenove amostras foram descartadas por terem sido consideradas inadequadas para processamento e/ou foram indeferidas pelos médicos de referência dos estados citados, por não preencherem os critérios de inclusão, ficando para objeto de análise de nosso estudo 576 amostras.

As amostras de sangue foram coletadas nos hospitais solicitantes, em tubos de ensaio contendo anticoagulante EDTA e enviadas ao LACEN-PE onde o plasma era separado por

centrifugação a 3000 rotações por minuto e congelados a 70°C para posterior processamento, de acordo com as normas do manual de processamento do kit. As amostras recebidas dos estados vizinhos eram coletadas nos laboratórios de saúde pública estaduais (LACEN), centrifugadas e separadas da mesma forma que descrita acima, e os plasmas enviados congelados em gelo seco ou bateria de gelo reciclável, conforme normas de biossegurança de transporte de amostras biológicas.

4.6.1 O teste de genotipagem do HIV

O teste utilizado para processamento das amostras foi o kit ViroSeq™ HIV-1 Genotyping System (Celera Diagnostic, Abbott Laboratories-ABI-USA). A técnica identifica mutações associadas à resistência aos principais anti-retrovirais atualmente em uso pelos pacientes atendidos no serviço público do Brasil. A mesma consiste no isolamento e purificação do RNA viral do plasma do paciente por ultra centrifugação (21.000g x120min a 4° C) seguido da síntese do DNA complementar (cDNA) e sua posterior amplificação pela técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) de uma fração da região *pol* do HIV isolado, gerando um produto para sequenciamento do gen da protease (códon de 1 a 99) e dois terços do gen da transcriptase reversa (códon de 1 a 335).

O produto de 1,8kb gerado por sequenciamento utilizando sete *primers* inclusos no kit, formulados com Big Dye Terminator, foram depois purificados e analisados em sequenciador automático ABI Prisma 3100 (Applied Biosystems) o qual é acoplado a um software de análise de sequenciamento de DNA. Este sistema de genotipagem da ViroSeq™ HIV-1, consiste em um software que automaticamente importa os dados da seqüência construída com os sete primers, a qual é comparada com uma seqüência referencia do vírus selvagem (*wyld type*) HXB-2 (GeneBank K03455), analisando os pontos divergentes onde ocorre as mutações. Após a edição e o estabelecimento de uma seqüência consenso, o software patenteado de análise ViroSeq versão 2.6, gera um laudo com o perfil das mutações de resistência para as diferentes classes de anti-retrovirais (MORTENSEN; AZEVEDO; MUNERATO, 2002).

As amostras não amplificadas pelo modulo de PCR do kit ViroSeq™, foram enviadas para o laboratório de referência em genotipagem na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) para resgate, conforme recomendação da RENAGENO, em forma de produto de PCR (1° round), onde as mesmas eram submetidas a um 2° round de PCR com *primers* internos K1 e K2 (“*nested*” PCR), e seqüenciadas da mesma forma que descrito anteriormente. Todos os

laudos liberados eram enviados aos MRG que, após análise, enviava aos médicos assistentes, com sugestão de terapia de resgate, ficando todas as cópias dos resultados arquivados no laboratório.

Uma vez que existem vários algoritmos de interpretação de mutações, e as regras de interpretação mudam a medida que novos conhecimentos são incorporados, os laudos gerados pelo sistema ViroSeq™ foram compilados e a análise das mutações foram baseadas na classificação do International AIDS Society Consensus (IAS) (D'ÁQUILA, 2002) (anexo G).

4.6.2 A determinação dos subtipos

Para obtenção dos subtipos do HIV-1, as seqüências obtidas por sequenciamento foram analisadas utilizando o Stanford Sequence Resistance Database (STANFORD UNIVERSITY, 2004).

4.7 Processamento e análise dos dados

Elaborou-se um instrumento de coleta de dados para coletar as informações relativas aos dados demográficos, virológicos, imunológicos e esquemas anti-retrovirais previamente utilizados dos pacientes estudados e as mutações identificadas nos laudos dos testes de genotipagem (apêndice A). O processo de digitação dos dados foi realizado por meio de dupla entrada. Foram utilizados os softwares EPIINFO na versão 6.04 na entrada, validação (VALIDATE) e análise dos dados, como também o Microsoft Excel na elaboração de tabelas e gráficos. Os dados foram descritos utilizando-se distribuição de frequências das variáveis incluídas no estudo e as possíveis diferenças de prevalência foram testadas por meio do teste do χ^2 (Qui-quadrado), a um nível de significância de 95%, ou seja, há significância estatística quando o p-valor for inferior a 5% ($p < 0,05$).

4.8 Considerações éticas

O estudo faz parte do “Projeto de Implantação da Rede Nacional de Genotipagem do HIV-1 RENAGENO em pacientes com falha terapêutica aos anti-retrovirais” elaborado pelo Programa Nacional DST e Aids do Ministério da Saúde que foi submetido ao Comitê de Ética (CONEP), sob o registro 2857, número do Processo 25.100823/01, com Parecer de aprovado

número 1121/2001 de 20/09/2001 (Anexo H). Esta rede foi implantada como uma pesquisa operacional cujos critérios de inclusão, avaliação e acompanhamento foram estabelecidos por Comitê Técnico Assessor do Ministério da Saúde, e conta com laboratórios capacitados para realizar o teste de genotipagem, e com médicos treinados para interpretação e orientação do exame.

O presente estudo contempla a análise dos dados laboratoriais de seis estados da Região Nordeste, área de abrangência do Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco- LACEN-PE que é integrante da RENAGENO, cujos testes de genotipagem foram realizados no período de janeiro de 2002 a dezembro 2004.

O consentimento livre e esclarecido foi assinado pelo paciente no momento da consulta com seu médico assistente, sendo encaminhado junto com a amostra para o laboratório, e permanece arquivado sob a guarda do LACEN-PE, conforme normas do Projeto original. Nos exames realizados utilizou-se apenas 10 ml de sangue colhido do paciente de forma habitual, conforme é detalhado no termo de consentimento.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da população estudada e caracterização das mutações

As principais características dos indivíduos incluídos no estudo, apresentadas na tabela 1, revelam que do total de 576 pacientes, a maioria era procedente dos estados de Pernambuco e Ceará, perfazendo mais de 80% das amostras analisadas da região Nordeste, predominantemente do sexo masculino (73,5%) e assintomáticos (79,9%). Em relação à idade, 56,8% dos pacientes tinham entre 35 a 49 anos. A maioria dos casos (74,1%) teve o diagnóstico de aids depois de 1997, um ano após a implantação universal da TARV no Brasil. A média de linfócitos T CD4+ foi de 268,7 células/mm³ e 42,2% tinham títulos inferiores a 200 células/mm³. A maioria possuía carga viral entre 10.000 e 100.000 cópias RNA/ml (56,1%), sendo a média de 121.267.

Tabela 1 - Distribuição dos dados demográficos, imunológicos e virológicos dos 576 indivíduos estudados. Região Nordeste, 2002 a 2004.

| Variável | N | % |
|--|------------|--------------|
| Local de residência | | |
| Alagoas | 57 | 9,9 |
| Ceará | 241 | 41,8 |
| Paraíba | 13 | 2,3 |
| Pernambuco | 240 | 41,7 |
| Piauí | 22 | 3,8 |
| Rio Grande do Norte | 3 | 0,5 |
| Sexo | | |
| Masculino | 424 | 73,5 |
| Feminino | 152 | 26,5 |
| Faixa etária (em anos) | | |
| Menor de 25 | 31 | 5,4 |
| De 25 a 34 | 149 | 26,0 |
| 35 a 49 | 326 | 56,8 |
| 50 e mais | 68 | 11,8 |
| Sintomatologia | | |
| Sim | 111 | 20,1 |
| Não | 442 | 79,9 |
| Ano de diagnóstico | | |
| Antes de 1997 | 143 | 25,9 |
| De 1997 a 2003 | 409 | 74,1 |
| CD4 (Média = 268,7; DP = 204,2) | | |
| Menor de 200 células/mm ³ | 241 | 42,2 |
| 200 a 349 células/mm ³ | 182 | 31,8 |
| 350 células/mm ³ e mais | 149 | 26,0 |
| Carga viral (Média = 121.267; DP = 8.194) | | |
| ≥ 100.000 cópias RNA/mL | 176 | 30,8 |
| De 10.000 a 100.000 cópias RNA/mL | 321 | 56,1 |
| < 10.000 cópias RNA/mL | 75 | 13,1 |
| Falência do 1º tratamento | | |
| Sim | 150 | 26,6 |
| Não | 414 | 73,4 |
| Total geral* | 576 | 100,0 |

* Diferença entre o total geral e o total para cada variável devem-se às informações ignoradas.

Do total de 576 casos analisados, cerca de 99% apresentaram mutações nas amostras de sangue analisadas, e em apenas dois casos foi detectado vírus totalmente sem mutação relacionada com a resistência aos anti-retrovirais, ou seja, vírus selvagem. Dentre as amostras analisadas, 3,6% (n=21) não foi possível resgatar os laudos, e 6,4% (n=37) não foram amplificadas, nem pelo protocolo do ViroSeq™ nem pelo protocolo de resgate do laboratório de referência, restando portanto, 516 amostras para análise das mutações.

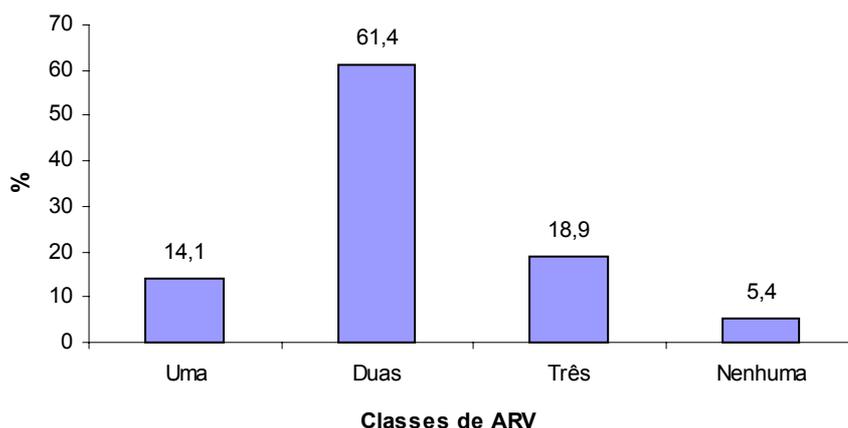
Cerca de 91,1% das amostras apresentaram mutações primárias ou secundárias relacionadas com resistência aos ITRN, 58,7% aos ITRNN e 94,8%, aos IP. Quando se analisou a presença de pelo menos uma mutação primária, os percentuais ficaram em 97,9% (460/470), 94,4% (286/303) e 52,1% (255/489), para ITRN, ITRNN e IP, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das amostras com mutações relacionadas a resistência aos ARV nas 516 amostras analisadas. Região Nordeste, 2002 a 2004.

| Classe de ARV | Amostras | | | |
|---------------|-------------------------------------|------|-------------------------------------|------|
| | Com mutação primárias e secundárias | | Com pelo menos uma mutação primária | |
| | N | % | N | % |
| ITRN | 470 | 91,1 | 460 | 97,9 |
| ITRNN | 303 | 58,7 | 286 | 94,4 |
| IP | 489 | 94,8 | 255 | 52,1 |

A análise da resistência, por número de classes das drogas anti-retrovirais, revelou que 14,1% dos pacientes apresentaram resistência a uma classe, 61,4% a duas classes e 18,9% a três classes da terapia ARV. Apenas 5,4% dos pacientes não apresentaram mutações primárias, conseqüentemente isentos de resistência a qualquer uma das drogas anti-retrovirais (gráfico 1).

Gráfico 1 - Percentual de resistência aos ARV de acordo com o número de classes de drogas. Região Nordeste, 2002 a 2004.



Em relação ao número de esquemas terapêuticos utilizados pelos indivíduos, identificou-se que 26,6% usaram um esquema, 30,3% usaram dois esquemas, 20,5% três, 12% quatro esquemas e 10,6% usaram 5 esquemas ou mais. Quando da análise das mutações segundo as classes dos ARV, observa-se que o número médio de mutação guarda uma relação direta com o número de esquemas terapêuticos usados, e esta correlação é estatisticamente significativa. Ou seja, o aumento do número de esquemas terapêuticos está correlacionado com o aumento do número de mutações (gráfico 2 e tabela 3).

Gráfico 2 - Relação entre número médio de mutações detectadas e o número de esquemas terapêuticos utilizados pelos 516 pacientes estudados. Região Nordeste, 2002 a 2004.

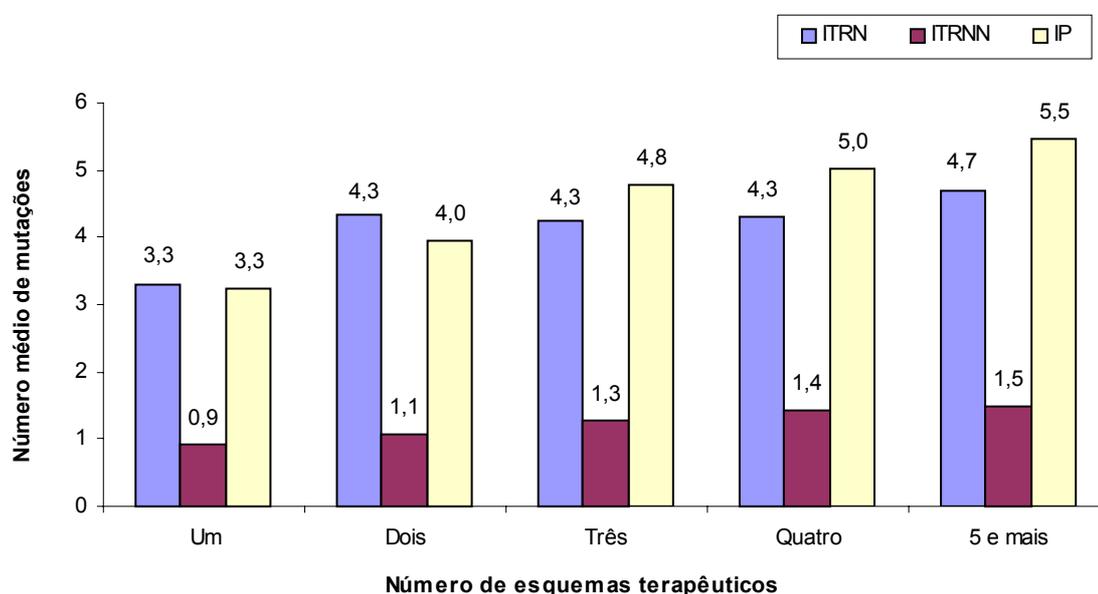


Tabela 3 - Correlação de Pearson entre número médio de mutação e número de esquemas terapêuticos, por classe de drogas ARV.

| Classe de ARV | Correlações | p-valor |
|---------------|-------------|---------|
| ITRN | 0,129 | 0,004 |
| ITRNN | 0,142 | 0,001 |
| IP | 0,244 | 0,000 |

As representações gráficas da prevalência das mutações para os as três classes de anti-retrovirais estão demonstradas na seqüência de gráficos 3, 4 e 5.

No gráfico 3 estão distribuídas as mutações relacionadas com os ITRN, sendo as mais freqüentes 184, 215 e 41, com 66%, 61,5% e 47,9%, respectivamente. Observaram-se baixos percentuais de mutações relacionadas com multidroga resistência como a mutação 151 (0,2%) e a inserção no códon 69 (1,1%). Em contraposição, verificou-se uma prevalência relevante nos códons relacionados com as mutações associados aos timidínicos (TAM) – 41L (67N, 70R, 210W, 215Y/F, E 219Q/E/N).

Com relação às mutações relacionadas com os ITRNN (gráfico 4), destacam-se, entre as mais freqüentes, 103 (62%), 190 (38.7%) e 181C (29.2%).

A maioria das mutações relacionadas aos IP, mostradas no gráfico 5, são secundárias, embora se observe percentuais expressivos nos códons 90, 82 e 30, perfazendo percentuais de 25,2, 21,1 e 16,2, respectivamente.

Gráfico 3 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias relacionadas a resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN). Região Nordeste, 2002 a 2004.

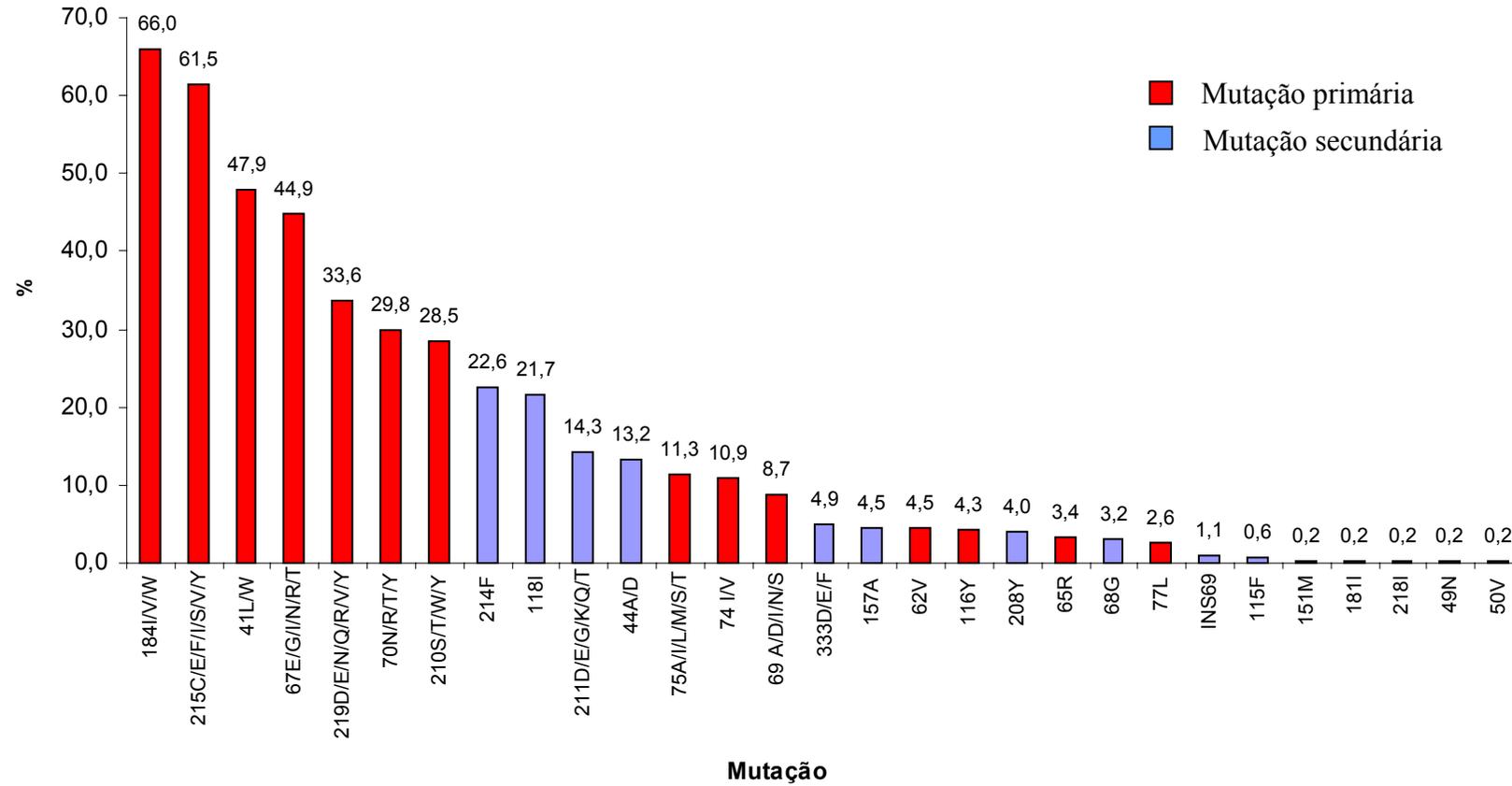


Gráfico 4 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias relacionadas a resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos não nucleosídeos (ITRNN). Região Nordeste, 2002 a 2004.

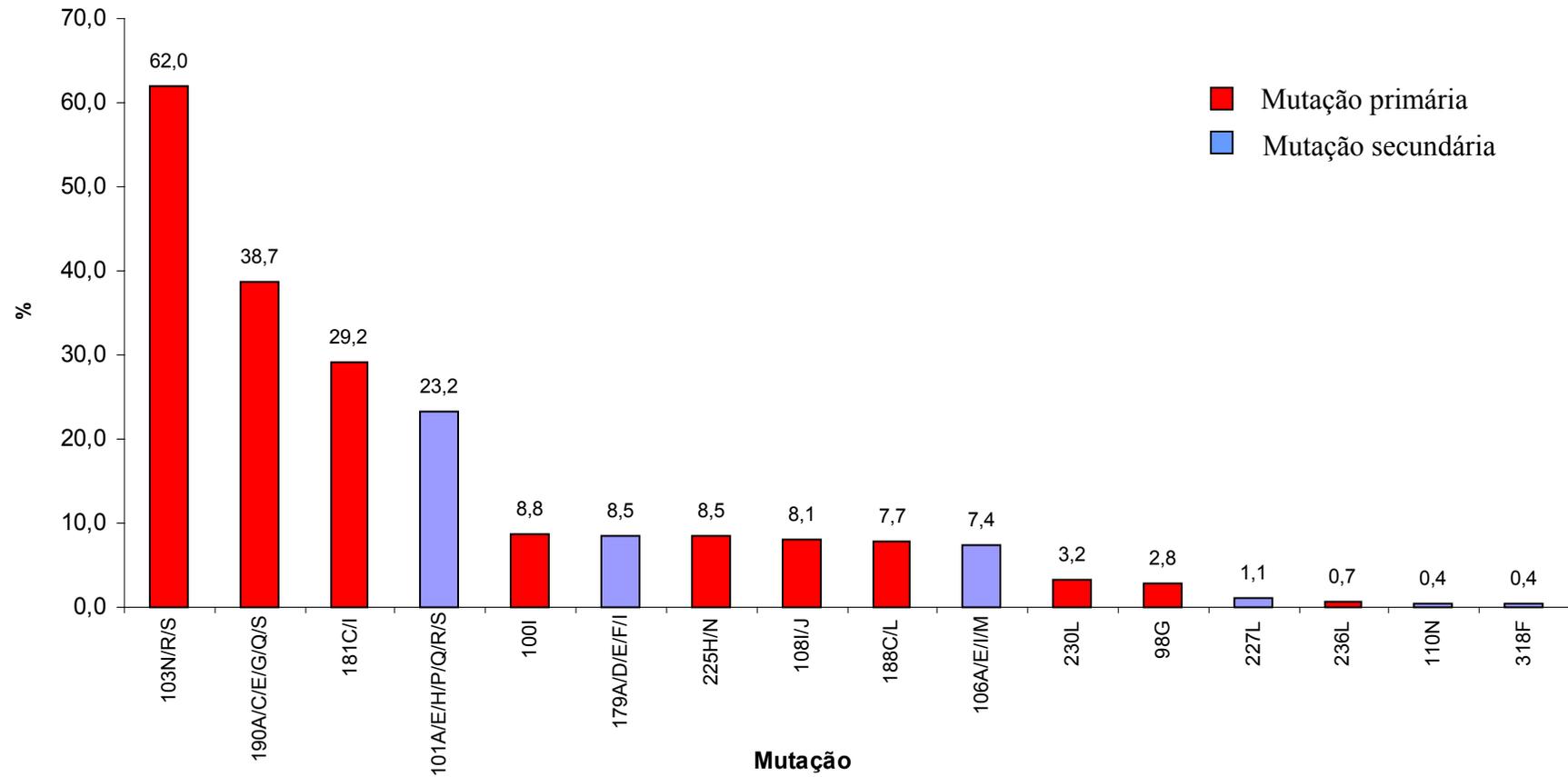
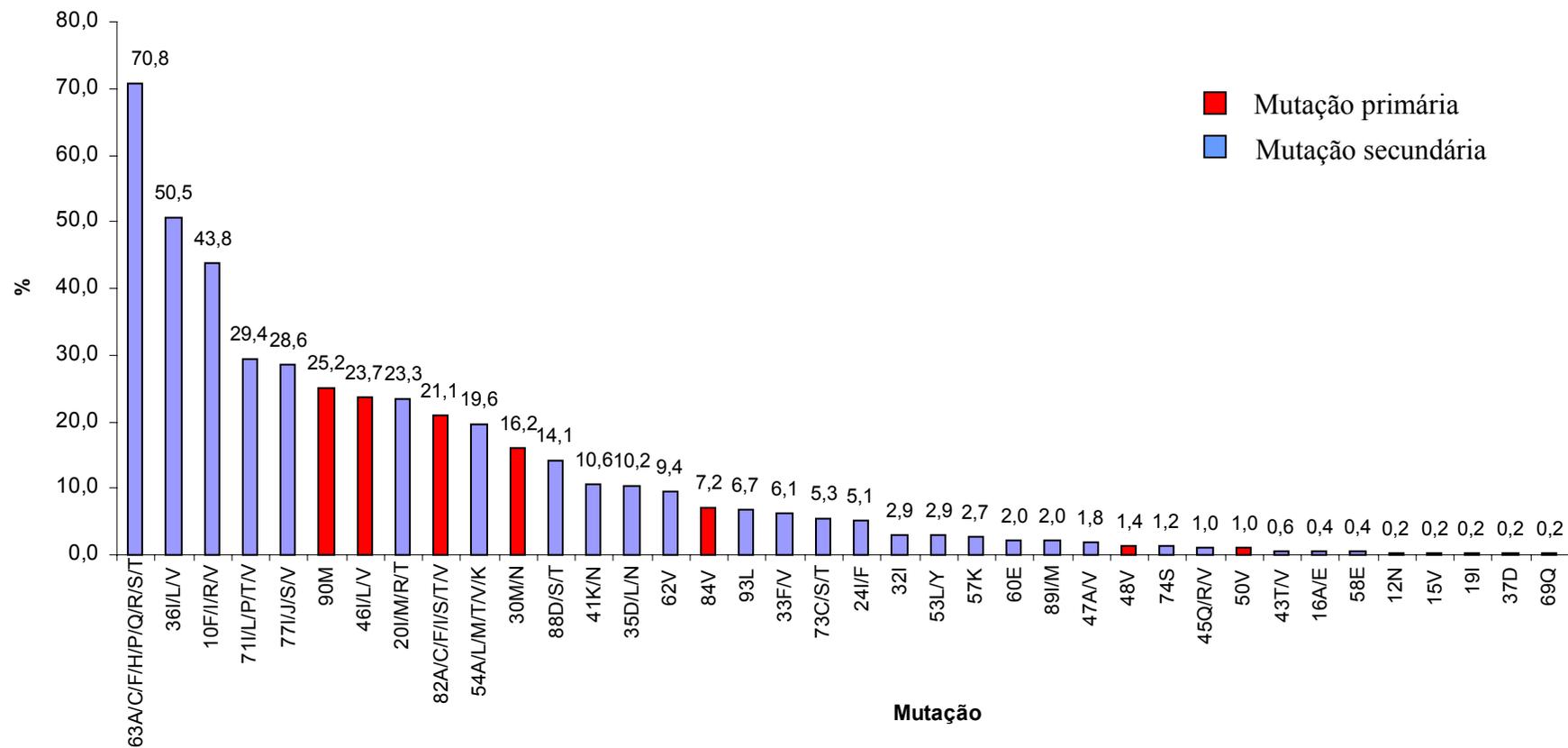


Gráfico 5 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias relacionadas aos inibidores da protease (IP). Região Nordeste, 2002 a 2004.



5.2 Análise dos subtipos do HIV-1

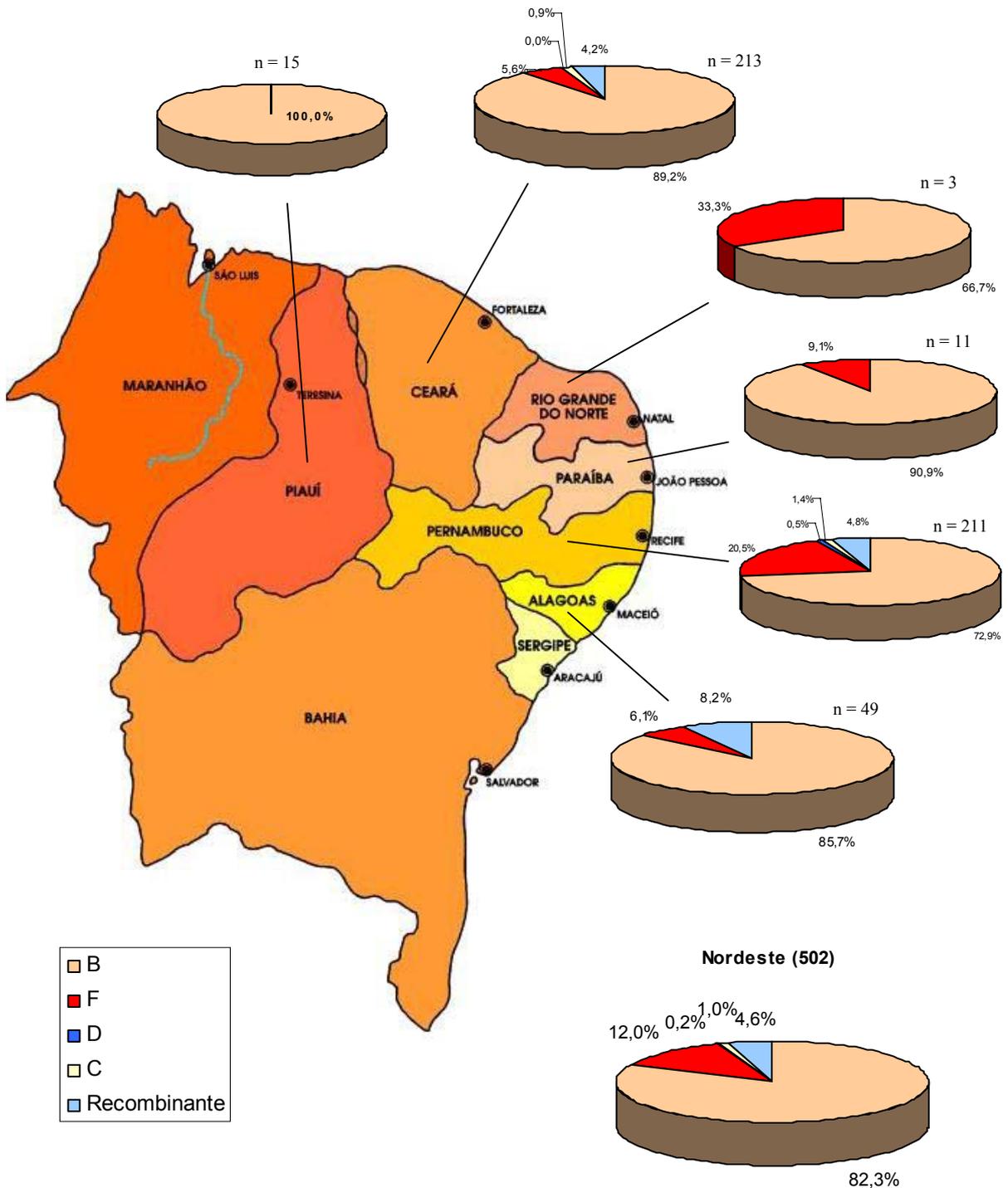
Para a análise dos subtipos virais foram incluídos 502 casos uma vez que, das 576 amostras de sangue dos pacientes inicialmente arrolados no estudo, em 37 não se obteve informações sobre o subtipo do HIV-1, e de outros 37 não se conseguiu obter amplificação. O subtipo B foi o mais prevalente (82,4%), seguido do F (11,8%). Obteve-se percentuais inferiores a 3% de subtipos recombinantes B/D e B/F, e apenas cinco casos foram identificados do subtipo C e um do D. Juntos, os subtipos B e F, totalizaram 94,2% de todos os subtipos circulantes nos estados da região Nordeste estudados (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos subtipos do HIV-1 nas 502 amostras analisadas. Região Nordeste, 2002 a 2004.

| Subtipo | N | % | % acumulado |
|---------|-----|-------|-------------|
| B | 413 | 82,4 | 82,4 |
| F | 60 | 11,8 | 94,2 |
| B/D | 13 | 2,6 | 96,8 |
| B/F | 10 | 2,0 | 98,8 |
| C | 5 | 1,0 | 99,8 |
| D | 1 | 0,2 | 100,0 |
| Total | 502 | 100,0 | - |

A distribuição dos subtipos por estado, mostrada na figura 1, revela que apenas os estados de Pernambuco e Ceará apresentaram casos do subtipo C. O único caso identificado como subtipo D reside em Pernambuco. Todos os casos do estado do Piauí foram do subtipo B.

Figura 1 - Distribuição geográfica dos subtipos do HIV-1 na região Nordeste: 2002-2004.



Para avaliar possíveis diferenças entre os subtipos mais prevalentes (B e F), procedeu-se à análise da associação entre eles e variáveis demográficas, imunológicas e virológicas, bem como a presença de mutações primárias e secundárias (tabela 5). Observou-se diferença estatisticamente significativa na distribuição dos subtipos por estado, caracterizado por um predomínio do subtipo F, em Pernambuco, e do subtipo B, no Ceará. Para esta análise

estatística, por local de residência, não foram incluídos os dados dos estados do Piauí e Rio Grande do Norte. Além do estado, a outra variável que mostrou associação significativa com os subtipos analisados foi o sexo, sendo o subtipo B mais prevalente entre os homens ($\chi^2 = 12,72$ $p < 0,001$).

Tabela 5 - Distribuição dos dados sócio demográficos, imunológicos e virológicos dos 473 indivíduos estudados relacionados com os subtipos mais prevalentes - B e F.

| Variáveis | Subtipo | | | | χ^2 | p-valor |
|-------------------------------------|---------|------|----|------|--------------|-------------------|
| | B | | F | | | |
| | N | % | N | % | | |
| Estado | | | | | 28,53 | < 0,001 |
| Alagoas | 42 | 10,2 | 3 | 5,0 | | |
| Ceará | 190 | 46,0 | 12 | 20,0 | | |
| Paraíba | 10 | 2,4 | 1 | 1,7 | | |
| Pernambuco | 153 | 37,0 | 43 | 71,7 | | |
| Piauí | 16 | 3,9 | - | 0,0 | | |
| Rio Grande do Norte | 2 | 0,5 | 1 | 1,7 | | |
| Sexo | | | | | 12,72 | < 0,001 |
| Masculino | 325 | 78,9 | 34 | 56,7 | | |
| Feminino | 88 | 21,1 | 26 | 43,3 | | |
| Faixa etária (em anos)* | | | | | 2,42 | 0,489 |
| Menor de 25 | 20 | 4,9 | 3 | 5,0 | | |
| De 25 a 34 | 106 | 25,8 | 10 | 16,7 | | |
| 35 a 49 | 239 | 58,2 | 40 | 66,7 | | |
| 50 e mais | 46 | 11,2 | 07 | 11,7 | | |
| Sintomatologia | | | | | 0,05 | 0,816 |
| Sim | 81 | 20,2 | 10 | 17,9 | | |
| Não | 320 | 79,8 | 46 | 82,1 | | |
| Ano de diagnóstico | | | | | 1,33 | 0,248 |
| Antes de 1997 | 114 | 28,4 | 11 | 20,0 | | |
| De 1997 a 2002 | 287 | 71,6 | 44 | 80,0 | | |
| CD4 (células/mm³) | | | | | 1,23 | 0,541 |
| Menor de 200 | 170 | 41,6 | 28 | 46,7 | | |
| De 200 a 349 | 131 | 32,0 | 15 | 25,0 | | |
| 350 e mais | 108 | 26,4 | 17 | 28,3 | | |
| CV (cópias RNA/mL) | | | | | 2,52 | 0,284 |
| Mais de 100.000 | 118 | 28,9 | 23 | 38,3 | | |
| De 10.000 a 100.000 | 239 | 58,4 | 29 | 48,3 | | |
| Menos de 10.000 | 52 | 12,7 | 8 | 13,3 | | |
| Falência do 1º tratamento | | | | | 0,05 | 0,951 |
| Sim | 110 | 27,2 | 15 | 25,9 | | |
| Não | 294 | 72,8 | 43 | 74,1 | | |

* A diferença entre o total geral e o total para cada variável devem-se às informações ignoradas.

Analisando as mutações relacionadas as três classes de anti-retrovirais nos dois subtipos mais prevalentes, não se observou diferença estatisticamente significativa, com percentuais muito próximos aos identificados na análise geral de mutações (Tabela 6).

Tabela 6 - Frequência de amostras com mutações relacionadas à resistência aos ARV de acordo com os subtipos B e F, nas 473 amostras analisadas. Região Nordeste, 2002 a 2004.

| Classe de ARV | Subtipo | | | | χ^2 | p-valor |
|----------------------------|----------------|------|----------------|------|----------|---------|
| | B | | F | | | |
| | Nº de amostras | % | Nº de amostras | % | | |
| ITRN | 356 | 90,6 | 53 | 91,4 | 0,05 | 0,829 |
| ITRNN | 225 | 57,3 | 36 | 62,1 | 0,18 | 0,669 |
| IP | 374 | 95,2 | 54 | 93,1 | 0,23 | 0,633 |
| Amostras analisadas | 393 | - | 58 | - | | |

* 22 amostras sem informação

A associação entre a prevalência das mutações nos dois subtipos, B e F, em relação a cada uma das classes de drogas ARV, estão mostradas nos gráficos 6, 7 e 8.

Em relação à classe dos ITRN, as mutações mais prevalentes para ambos os subtipos foram nos códons 184 e 215, sem diferença estatística entre eles. Quando se comparam as outras mutações mais frequentes observa-se que a mutação no códon 211 foi mais frequente no subtipo F quando comparado ao B, e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O inverso se observa com a mutação 210, mais prevalente no subtipo B do que o F ($p < 0,005$). Outras mutações mais prevalentes identificadas nos dois subtipos não mostraram diferenças (Gráfico 6). Este gráfico ainda mostra algumas mutações encontradas apenas no subtipo B – códons 65, 77, 116, 118 e 151.

Com relação à associação entre as mutações detectadas na classe dos ITRNN, a prevalência foi semelhante nos dois subtipos, exceção apenas das mutações no códon 110 que aparece apenas no subtipo F e do códon 98 que aparece no subtipo B (Gráfico 7).

A prevalência das mutações relacionadas com o IP revelou diferenças estatisticamente significativas nos códons 20, 35, 36 e 41 ($p < 0,005$) com predominância no subtipo F. Por outro lado, as mutações no códon 63 e 77 foram mais frequentes no subtipo B, com diferença estatisticamente significativas ($p < 0,005$).

Gráfico 6 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), relacionadas com os subtipos B e F. Região Nordeste, 2002 a 2004.

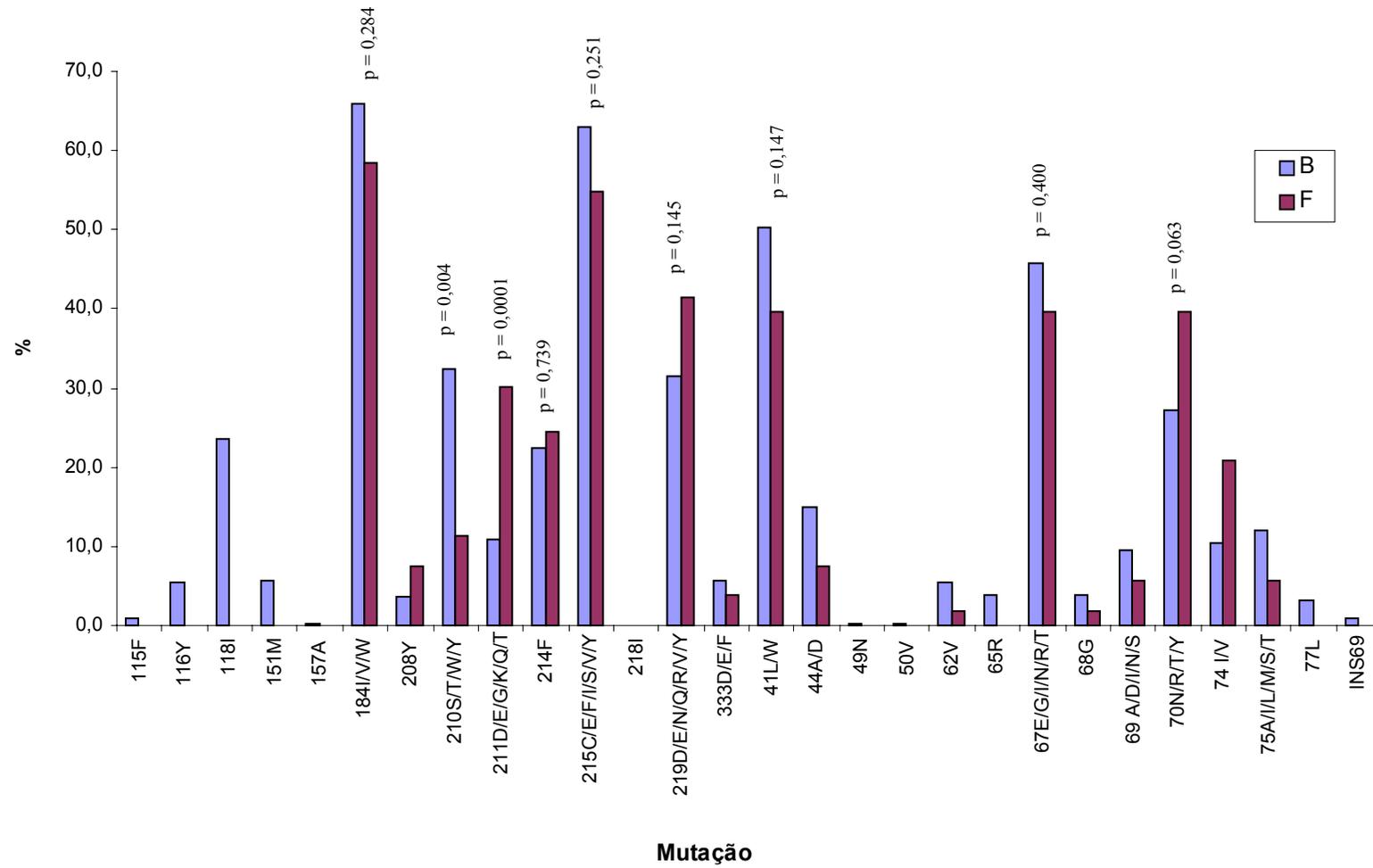


Gráfico 7 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores da transcriptase reversa análogos não nucleosídeos (ITRNN), relacionadas com os subtipos B e F. Região Nordeste, 2002 a 2004.

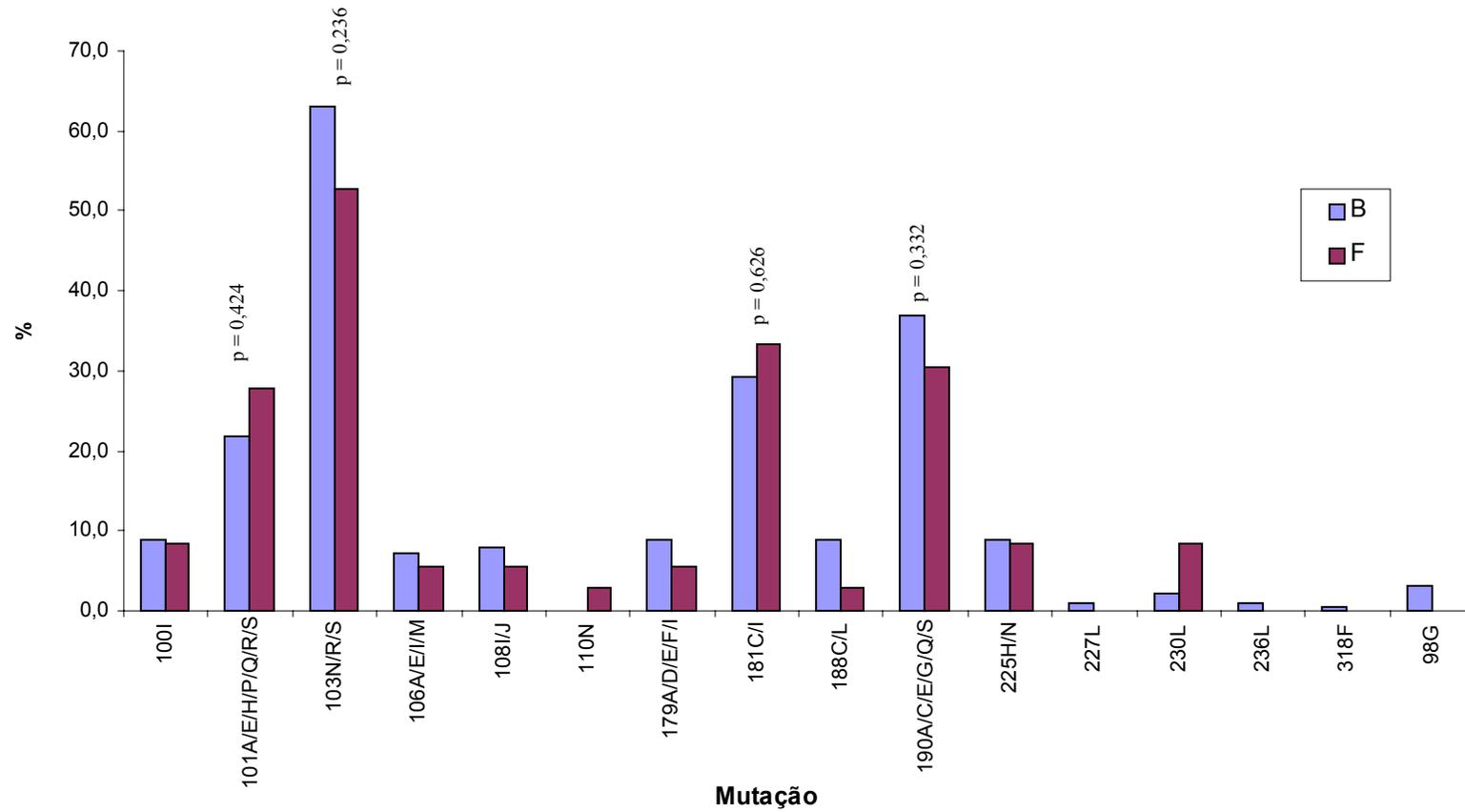
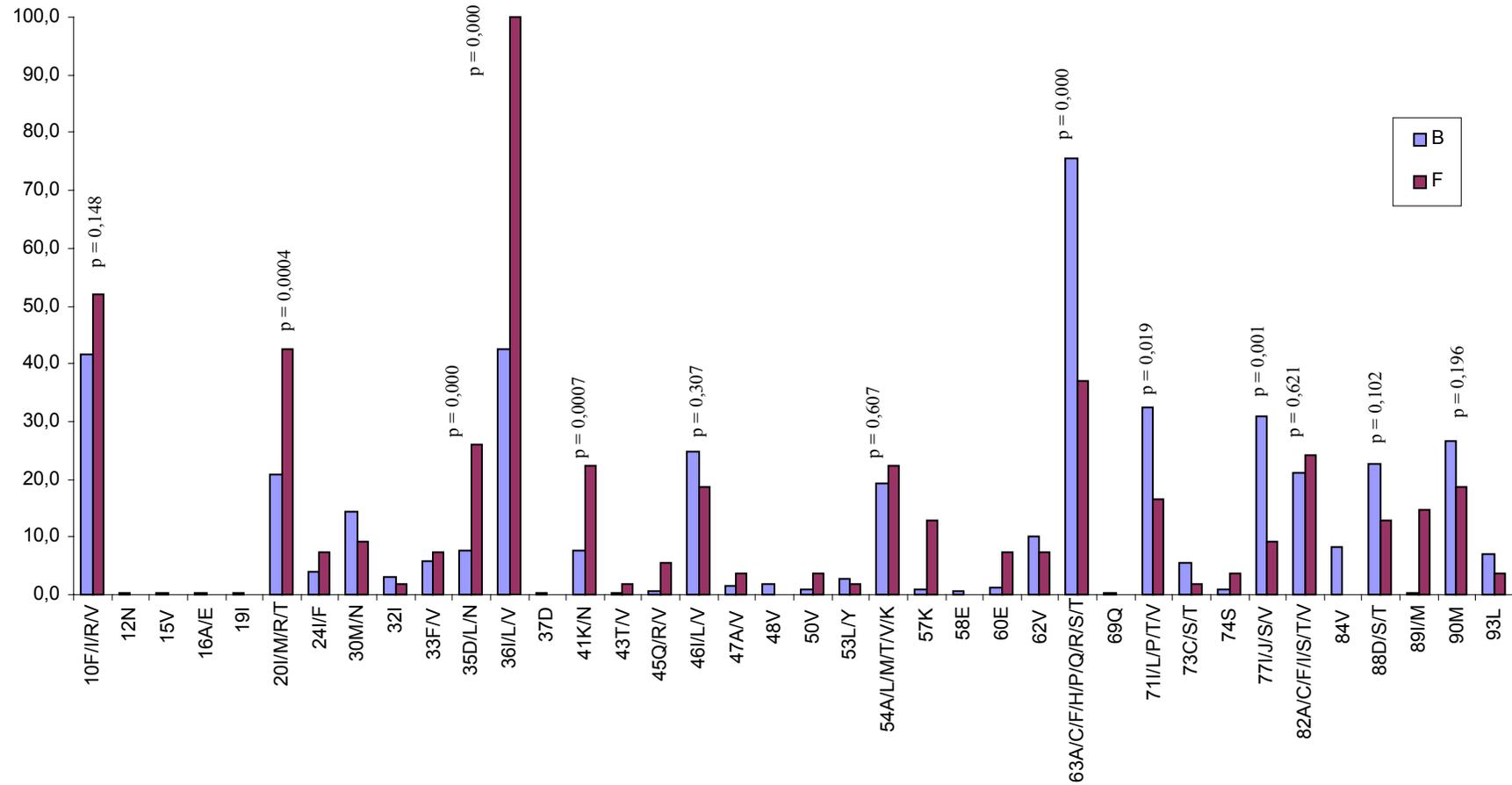


Gráfico 8 - Distribuição percentual das mutações primárias e secundárias associadas à resistência aos inibidores da protease (IP), relacionadas com os subtipos B e F. Região Nordeste, 2002 a 2004.



6 DISCUSSÃO

Em 2001, numa iniciativa pioneira, o PN/DST-AIDS implantou a Rede Nacional de Genotipagem para o HIV. Como o exame ainda não estava devidamente padronizado e os estudos eram preliminares, foi implantado em caráter experimental, com critérios de seleção bem restritos e com disponibilização de um número limitado de exames. Esta iniciativa resultou, além dos benefícios individuais para os que se submeteram ao exame, numa grande base de dados sobre a resistência secundária ao anti-retrovirais no Brasil, que compilado de maneira organizada em cada região, tem permitido agregar importantes conhecimentos sobre o perfil do HIV-1. Além disso, possibilitou equipar os Laboratórios Regionais da Rede de Saúde Pública e a qualificação de técnicos em todo o País. Após quatro anos, portanto, apresenta-se neste trabalho os resultados do levantamento de dados de seis estados nordestinos, cujas amostras foram enviadas ao LACEN-PE, que se tornou referência para a realização dos exames de genotipagem daqueles estados. Constata-se uma disparidade no número de amostras de cada estado, predominando as oriundas do Ceará e Pernambuco, fato que certamente reflete a maior população, o maior número de casos e o momento da epidemia nestes dois estados, com resistência viral mais preocupante e presente.

O perfil dos pacientes estudados é muito semelhante ao da epidemia como um todo da região, onde predominam homens na faixa dos 25 aos 49 anos. Cabe salientar que a proporção de mulheres infectadas vem aumentando, mas o sexo masculino ainda é predominante (BRITO; CASTILHO; SZWARCOWALD, 2005). Além disso, a entrada das mulheres na epidemia é mais recente, de modo que provavelmente ainda não se reflete de maneira consistente na falência ao tratamento viral, que geralmente é mais tardio. Observa-se que a grande maioria dos casos teve o diagnóstico da doença após 1997, ou seja, são infecções com diagnóstico relativamente recente e detectadas num período em que o uso dos esquemas anti-retrovirais potentes já estava padronizado na prática clínica (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS E DST, 2004). No presente estudo, de uma maneira geral os pacientes apresentaram falha virológica ao tratamento, embora na maioria assintomáticos e com contagem média de linfócitos T CD4+ de 268, traduzindo uma boa condição clínica e uma probabilidade aumentada de se beneficiar com o ajuste do tratamento, enquanto ainda assintomáticos. Por outro lado, destaca-se cerca de 30,8%, ou seja, quase um terço dos pacientes, com carga viral acima de 100.000 cópias no momento da genotipagem, o que pode ser considerada muito elevada. Esse achado pode tanto significar que o exame foi realizado em momento tardio da

falha, como pode refletir dificuldades no acesso ao exame, por restrições de cotas e/ou outras dificuldades. Finalmente, observa-se que a maioria dos pacientes já havia utilizado mais de um tratamento anti-retroviral.

Como esperado para pacientes já submetidos a diferentes esquemas terapêuticos de anti-retrovirais, a frequência de mutações foi bastante elevada para todos os grupos de medicamentos, mas na verdade, a presença de mutações principais, ou seja, aquelas que isoladamente conferem resistência ou reduzem a susceptibilidade às drogas foram mais relacionadas aos ITRN e ITRNN. Após avaliação dos laudos, o percentual de resistência a duas classes de drogas ocorreu em 61,4% dos casos, e a resistência a três classes foi observado em 18,9% dos casos. Em outras palavras, cerca de 80% dos pacientes apresentaram resistência a duas ou três classes de drogas anti-retrovirais. Um estudo realizado por Sucupira et al. (2002) São Paulo, demonstrou frequência de resistência de 42,2% para duas classes de anti-retrovirais e 36,8% para três anti-retrovirais. Munerato et al. (2005) também avaliando amostras do estado de São Paulo, detectou níveis de resistência ainda mais elevados, com resistência a duas drogas em 42,9% das amostras e 46,5% de resistência para três drogas, com um evidente aumento da resistência a três drogas em relação ao estudo realizado no mesmo estado, anteriormente. Assim, a multirresistência aos anti-retrovirais parece acompanhar a seqüência histórica do uso de anti-retrovirais, cuja utilização iniciou-se de forma mais abrangente, mais precocemente, em alguns estados da região Sudeste. O presente estudo mostrou ainda que a utilização de um maior número de esquemas anti-retrovirais está relacionado ao maior número de mutações.

Os resultados da análise de mutações obtidas por este trabalho, apresentaram características semelhantes aos de outros estados brasileiros. Assim, a mutação primária relacionada aos ITRN mais prevalente ocorreu no códon 184, identificada em 66% dos casos, enquanto em São Paulo foi detectada em 64%, no Rio de Janeiro em 67% e no Rio Grande do Sul, em 52% (COUTO-FERNANDEZ et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005). Tal mutação está reconhecidamente relacionada à resistência de alto nível a lamivudina, anti-retroviral utilizado em larga escala no Brasil por sua praticidade e baixa toxicidade. Quando a lamivudina faz parte de um esquema anti-retroviral potente que falha, a mutação no códon 184 é a primeira a emergir, habitualmente. Apesar do prejuízo pelo aparecimento desta mutação, a mesma desencadeia algumas reações contraditórias, como o fenômeno de retardar a seleção das TAM, e aumentar parcialmente a atividade antiviral de alguns análogos de nucleosídeos, a despeito da presença das TAM (PICARD, 2001). Finalmente, esta mutação parece ter papel significativo na redução do *fitness* viral. Este fenômeno tem sido confirmado

pela pior evolução nos indivíduos sem lamivudina no seu esquema anti-retroviral de resgate. Por estas vantagens alguns autores têm, inclusive, sugerido a manutenção da lamivudina no esquema anti-retroviral após a falha de esquemas contendo esta medicação. Observou-se também uma elevada prevalência das mutações associadas aos timidínicos: 41 (47,9%), 67 (44,9%), 70 (29,8%), 210 (28,5%), 215 (61,5%) e 219 (33,6%), que podem levar a um grau variado de resistência cruzada entre análogos de nucleosídeos ou reduzir a susceptibilidade a alguns anti-retrovirais da mesma classe (DIAZ, 2004), mesmo que ainda não tenham sido utilizados na terapia. Essas TAM podem causar o mesmo efeito ao tenofovir (CLAVEL; HANCE, 2004), cujo uso em larga escala só recentemente foi recomendado pelo consenso brasileiro (BRASIL, 2004). Coincidente com a literatura, a mutação 151M, foi incomum, pois seu aparecimento parece mais freqüente no HIV-2 (CLAVEL; HANCE, 2004). A mutação K65R, selecionada pelo uso do abacavir ou tenofovir ocorreu em menos de 3,4% dos indivíduos, provavelmente decorrente do pouco uso destes medicamentos, seja pela introdução recente para uso clínico, como é o caso do tenofovir, ou pelo receio de efeitos colaterais severos, como é o caso do abacavir (CHIROUZE et al., 2004).

A freqüência de mutações primárias que conferem resistência aos ITRNN, aqui detectadas, foi semelhante à encontrada nos estudos realizados por Couto-Fernandez et al. (2005), Rodrigues (2005). A mutação mais freqüente ocorreu no códon 103 presente em 62% das amostras. Esta mutação é habitualmente selecionada pela terapia com efavirenz e, ocasionalmente, pela nevirapina e confere alto nível de resistência a todos os medicamentos dessa classe. A elevada freqüência desta mutação decorre, certamente, da inclusão do efavirenz como droga de primeira escolha para o início da terapia anti-retroviral nas recomendações dos diferentes consensos para a terapia anti-retroviral do Ministério da Saúde. Sua escolha deve-se a praticidade de uso (dose única diária), comprovada potência terapêutica e reduzida freqüência de efeitos colaterais graves, principalmente a lipodistrofia (BRASIL, 2004). Devido a estas características, o efavirenz chega a participar de cerca de 75% dos esquemas antivirais iniciais no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital das Clínicas da UFPE (CUELLAR, 2004), parece se repetir em outros serviços brasileiros, contribuindo para a elevada freqüência de mutações que conferem resistência à droga. Infelizmente a barreira genética para resistência aos ITRNN é baixa, com apenas uma mutação determinando uma significativa resistência cruzada para todas as drogas deste grupo (CLAVEL; HANCE, 2004). A mutação 190, que geralmente aparece após um tempo prolongado de terapia não eficaz com ITRNN, ocorreu em 38,7% dos casos, e a mutação 181, geralmente selecionada pela nevirapina, ocorreu em 29,2%. Esse último achado reflete a baixa freqüência da utilização

deste antiviral, que pela sua toxicidade hepática, tendo seu uso ficado restrito aos esquemas profiláticos para prevenção da transmissão vertical nas gestantes.

A análise do perfil das mutações relacionada aos IP mostrou maior prevalência de mutações secundárias tais como 63 (70%), 36 (50,5%) e 10 (43,8%), diferentemente do encontrado nas mutações relacionadas aos ITRN e ITRNN, onde predominaram mutações primárias. As mutações secundárias isoladas não parecem ter um significado especial na resistência viral aos IP. No entanto, a soma de mutações secundárias pode facilitar o aparecimento da resistência aos IP, sendo um processo de forma gradual e progressiva, revelando-se, neste caso, de significado clínico (CLAVEL; HANCE, 2004; DIAZ, 2003). Com relação às mutações primárias desta classe de drogas, encontrou-se uma prevalência de 25,2% no códon 90, seguida da mutação 46 (23,7%) e da mutação no códon 82 (21,1%). A mutação no códon 90 é freqüentemente observada durante a falência da terapia ARV para a maioria dos inibidores de protease, selecionada pelo saquinavir e nelfinavir. A mutação 46 é uma das que se acumula durante a falência da terapia à maioria dos inibidores de protease causando aumento gradual dos níveis de resistência, enquanto a mutação no códon 82 emerge precocemente durante a falência antiviral, mais freqüentemente com o indinavir e ritonavir (CLAVEL; HANCE, 2004; DIAZ, 2004).

Vários estudos mapearam os subtipos do HIV-1, no Brasil, embora sejam escassos os que incluíram análise dos estados nordestinos. Entre os estudos nacionais, destaca-se o realizado por Brindeiro et al. (2003), que analisou 409 amostras provenientes de Centro de Testagem e Aconselhamento, das quais 42 eram provenientes da região Nordeste, sendo 30 do Ceará e 12 da Bahia. Esta pesquisa mostrou como subtipo predominante no Brasil, o B (64,9%), seguido do C, em 22,8% das amostras, e do F, em 11,8%. Observou-se também uma variação regional importante nos subtipos C e F. Enquanto o subtipo C é praticamente exclusivo das regiões sudeste e sul, o subtipo F é mais freqüente no Centro-Oeste e Norte com 23,5% e 4,5% no Nordeste. Em estudo conduzido por Medeiros et al. (2005) com 84 pacientes de Pernambuco mostrou uma prevalência de 72,6% do subtipo B; 22,6% do subtipo F; 3,6% com formas recombinantes; e 1,2%, subtipo C. O presente estudo, constituído de 502 amostras proveniente de seis estados do nordeste, mostra uma maior circulação do subtipo B, seguido do subtipo F, concordando com os dados de Brindeiro et al. (2003). Foram poucos os casos do subtipo C, confirmando a baixa circulação desse subtipo viral na região Nordeste. Entretanto, na análise da distribuição dos subtipos por estado, observou-se uma proporção maior do subtipo F, no estado de Pernambuco, quando comparado aos demais, tendo participado com 71,7% dos casos do subtipo F, enquanto o Ceará participou apenas com 20%

das amostras deste subtipo, apesar de ser o estado com maior número de amostras no estudo. Além disso, enquanto a frequência do subtipo F variou nos estados do Piauí (0%), Ceará (6%), Alagoas (6,7%) e Paraíba (9%), nas amostras originadas em Pernambuco observou-se uma frequência de 22% deste subtipo. Tal constatação mostra variações intra-regionais da epidemia e faz supor uma origem comum para os casos pernambucanos, com disseminação intra-estadual deste subtipo viral.

Outro aspecto que se mostrou diferente entre os subtipos B e F, foi a associação com o sexo: enquanto 81% dos pacientes com o subtipo B eram do sexo masculino, entre aqueles em que se identificou o subtipo F, 43,3% eram do sexo feminino. Há suposições de que o subtipo F tenha maior facilidade de se propagar em decorrência da transmissão por contato heterossexual. (THOMSON; PÉREZ-ÁLVAREZ; NÁJERA, 2002) A diferença na transmissibilidade entre os subtipos B e não-B parece estar relacionada ao tropismo do HIV-1 frente às células de Langerhans, principal alvo da transmissão vaginal do HIV-1. Alguns autores sugerem que a susceptibilidade das células de Langerhans à infecção pelo subtipo B está substancialmente reduzida quando comparada com os subtipos C e E, justificando a menor frequência daquele subtipo nos heterossexuais (SOTO-RAMIREZ et al., 1996; TANURI et al., 1999). Ressalta-se, no entanto, que a distinção no tropismo viral entre os subtipos do HIV-1 ainda é tema controverso (APETREI; MARX; SMITH, 2004). Entretanto, a similaridade da proporção dos subtipos F entre homens e mulheres contra a grande predominância do subtipo B entre os homens sugere que esta distinção na transmissibilidade entre o subtipo B e F possa realmente existir. Um estudo argentino também sugere esta possibilidade, (ÁVILLA et al. 2002), comparando 134 pacientes heterossexuais e suas parceiras com outros pacientes 95 homossexuais masculinos, demonstrou que naquele país, circulam duas epidemias diferentes. A primeira entre homens e mulheres heterossexuais, geralmente pobres e com nível sócio-cultural baixo, com 77% deles infectados pelo subtipo F e a segunda, entre homossexuais de nível sócio-cultural elevado, entre os quais apenas 10% eram portadores do subtipo F. Por outro lado, poder-se-ia argumentar que estas diferenças entre subtipos e a categoria de exposição sexual entre sexos poderia ser decorrente do momento da introdução do subtipo na população e não no subgrupo populacional infectado. Com base neste argumento, o subtipo F poderia ter sido introduzido mais recentemente na população, coincidindo com a mudança da epidemia para a transmissão heterossexual, sem que tenha estabelecido qualquer relação entre subtipo e forma de transmissão do HIV-1. O trabalho produzido por Medeiros também constatou significativa proporção de heterossexuais

com subtipo F contra maior proporção de homossexuais entre os de subtipo B, ambos com o diagnóstico de aids em um mesmo período de tempo, o ano de 2002.

Analisando as mutações para os ITRN, observa-se que a mutação no códon 211, foi mais freqüente no subtipo F do que no B, e esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,005$). O inverso observa-se com a mutação 210, que foi mais prevalente para o subtipo B do que o F ($p < 0,005$). Outras mutações mais prevalentes identificadas nos dois subtipos não tiveram diferença estatisticamente significante, mas o gráfico apresenta algumas mutações encontradas no subtipo B, que não foram evidenciadas no F, talvez em decorrência do pequeno tamanho da amostra do subtipo F (códon 65, 77, 116, 118 e 151).

A prevalência das mutações relacionadas aos IP nos dois subtipos, revelam diferenças estatisticamente significantes nos códon 35,36 e 63 ($p = 0,000$) sendo os dois primeiros revelados apenas no subtipo F e o terceiro no subtipo B. Convém salientar a presença da mutação no códon 20 mais freqüente no subtipo F e no códon 77 no subtipo B ($p = 0,0004$ e $p = 0,001$ respectivamente). Dados semelhantes foram encontrados por Couto-Fernandes et al., 2005 e Rodrigues et al., 2005 em amostras da RENAGENO. Pode-se sugerir que os dois subtipos respondem com produção de mutações diferentes quando da falência ao tratamento antiviral, principalmente frente aos inibidores de protease. Entretanto estas diferenças ocorrem principalmente em mutações secundárias, que não apresentam um sentido específico de resistência frente aos anti-retrovirais, de modo que não é possível prever se estas diferenças podem conduzir a diferentes níveis de resistência aos anti-retrovirais (BRINDEIRO et al., 2003). O acompanhamento das respostas terapêuticas aos esquemas de resgate terapêutico poderão auxiliar na compreensão do significado das diferenças nas mutações desenvolvidas pelos diferentes subtipos virais. No estudo realizado por Medeiros et al., 2005 que acompanhou por um período médio de 22 meses um total de 62 pacientes, sendo 47 portadores do subtipo B e 15 portadores do subtipo F do HIV-1. Medeiros observou semelhança entre os desfechos nos dois subtipos virais com 63,8% no subtipo B e 73,3% no subtipo F tendo atingido carga viral indetectável ao final deste período. Entretanto a autora acompanhou apenas pacientes sem tratamento antiviral prévio e não a resposta após a falha terapêutica. Assim aguarda-se que estudos mais aprofundados sobre o perfil das mutações relacionados com os diferentes subtipos possam orientar quanto ao melhor esquema de resgate terapêutico para os pacientes com falha a vários esquemas, e na melhor combinação de drogas anti-retrovirais para cada subtipo viral.

6 CONCLUSÕES

- O perfil dos pacientes com aids com falha terapêutica aos anti retrovirais que realizaram o teste de genotipagem no LACEN-PE, constitui-se predominantemente de adultos assintomáticos, do sexo masculino, semelhante nos seis estados estudados;
- A maioria dos pacientes submetidos à genotipagem pós falha terapêutica, diagnosticados após 1997, apresentavam contagem média de linfócitos TCD4+ de 268 células/mm³ e falência a mais de um esquema anti-retroviral;
- A frequência de mutações primárias associadas à resistência aos Inibidores da Transcriptase Reversa Nucleosídeos e Não Nucleosídeos foi bastante elevada, atingindo percentuais de 97,9% e 94,4 %, respectivamente;
- A frequência de mutações associadas aos Inibidores de Proteases foi de 94,8%, entretanto a frequência de mutações primárias associadas a esta classe atingiu cerca de 52,1%;
- A resistência a duas classes de anti-retrovirais predominou entre os pacientes estudados, ocorrendo em 61,4%. Cerca de 18,9% apresentou resistência a três classes de anti-retrovirais. Tais constatações demonstram significativa restrição de opções terapêuticas para resgate em pacientes com falha terapêutica;
- Foi identificada elevada prevalência da mutação no códon 184 e nas mutações associadas aos timidínicos (TAMs). Tais mutações revelam resistência a maioria dos inibidores da transcriptase reversa nucleosídeos amplamente usados nos esquemas terapêuticos com anti retrovirais potentes, no Brasil;
- A prevalência dos subtipos identificados nos estados estudados, mostrou uma importante circulação do subtipo F no estado de Pernambuco, diferente dos outros estados nordestinos. Tal diferença sugerem diferenças intra-regionais da epidemia e pode resultar em diferentes respostas ao tratamento anti retroviral;
- As diferenças nas mutações aos ITRN e ITRNN detectadas nos subtipos B e F, foram pouco importantes. As diferenças nas mutações aos IP foram mais frequentes, mas ainda se desconhece a implicação dessas diferenças na resposta aos tratamentos de resgate pós falência terapêutica.

REFERÊNCIAS

APETREI, C.; MARX, P. A.; SMITH, S. M. The evolution of HIV and its consequences. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, Philadelphia, v. 18, p. 369-394, 2004.

AVILLA, M. M. et al. Two HIV-1 epidemics in Argentina: different genetic subtypes associated with different risk groups. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, Hagerstown, v. 29, p. 422-426, 2002.

BECKER, P. G. et al. Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase in antiretroviral drug-naïve Ugandan adults. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, New York, v. 16, p. 807-813, 2000.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO AIDS E DST. Brasília: Ministério da Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS, ano 1, n. 1, jan./jun. 2004.

BONGERTZ, V. et al. HIV-1 diversity in Brazil: genetic, biologic, and immunologic characterization of HIV-1 strains in three potential HIV vaccine evaluation sites. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, New York, v. 23, p. 184-193, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. *Infecção pelo HIV em adultos e adolescentes; recomendações para terapia anti-retroviral*. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br>>. Acesso em: 15 jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. *Políticas de tratamento. Renageno (genotipagem)*. Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/genotipagem>> Acesso em: 15 jul. 2005.

BRINDEIRO, R. M. et al. Brazilian Network for HIV Drug Resistance Surveillance (HIV-BResNet): a survey of chronically infected individuals. *AIDS*, Philadelphia, v. 17, n. 10, p. 1-7, 2003.

BRITO, A. M.; CASTILHO, E. A.; SZWARCOWALD, C. L. Regional patterns of the temporal evolution of the AIDS epidemic in Brazil following the introduction of antiretroviral therapy. *Braz. J. Infect. Dis.*, Salvador, v. 9, n. 1, p. 9-19, 2005.

CARIDE, E. et al. Drug-resistance reverse transcriptase genotyping and phenotyping of B and non-B subtypes (F and A) of human immunodeficiency virus type 1 found in Brazilian patients failing HAART. *Virology*, New York, v. 275, p. 107-115, 2000.

CERQUEIRA, D. M. et al. HIV- 1 subtypes and mutations associated to antiretroviral drug resistance in human isolates from central Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 35, p. 187-192, 2004.

CHAIX, M. L. et al. Prevalence of genotypic drug resistance among French patients infected during the year 1999. In: CONFERENCE ON RETROVIRUSES AND OPPORTUNISTIC INFECTIONS, 8., 2001, Chicago. *Abstract*. Chicago: The Body, 2001. p. 755.

CHIROUZE, C. et al. Risk factors for Abacavir-induced hypersensitivity syndrome in the “real world. *Pathol. Biol.* Paris, v. 52, n. 9, p. 529-533, 2004.

CLAVEL, F.; HANCE, A. J. HIV Drug resistance. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 350, p. 1023-1035, Mar. 2004.

CLEVENBERGH, P. et al. Prevalence ok nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) resistance-associated mutations and polymorphisms in NNRTI-naive HIV-infected patients. *HIV Clin. Trials*, St. Louis, v. 3, p. 36-44, 2002.

CLOLET, B. et al. Prevalence of HIV Protease mutations on failure of Nelfinavir-Containing HAART: a retrospective anlysis of four clinical studies and two observacional cohorts. *HIV Clin. Trials*, St. Louis, v. 3, n. 4, p. 316-323, 2002.

CLOLET, B. Havana study shows benefits of genotype testing: study utilized visible genetics' TRUGENE HIV-1 genotyping kit. *Prnewswire*, New York, 18 Sep. 2000. Disponível em: <<http://www.aegis.com/news/pr/2000/pr000939.html>>. Acesso em: 10 out. 2003.

COFFIN, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis and therapy. *Science*, Washington, v. 267, p. 483-489, 1995.

COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al. HIV-1 subtyping in Salvador, Bahia, Brazil: a city with African sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, New York, v. 22, p. 288-293, 1999.

COUTO-FERNANDEZ, J. C. et al. Human immunodeficiency vírus type 1 (HIV-1) genotyping in Rio de Janeiro, Brazil: assessing subtype and drug-resistance associated mutations in HIV-1 infected individuals failing highly active antiretroviral therapy. *Mem. Ins. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 73-78, Feb. 2005.

CUELLAR, M. C. C. *Fatores que influenciam a resposta ao tratamento anti-retroviral em pacientes com AIDS*. 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

- D'AQUILA, R. T. et al. Drug resistance mutations in HIV-1. *Top. HIV Med.*, San Francisco, v. 10, n. 2, p. 21-25, May/June 2002.
- DELGADO, E. et al. Analysis of HIV type 1 protease and reverse transcriptase sequences from Venezuela for drug resistance-associated mutations and subtype classification: a UNAIDS study. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, New York, v. 17, p. 753-758, 2001.
- DIAZ, R. S. Especial genotipagem. *Trat. Hoje: Bol. Ter. HIV/Aids, DST e Hepatites Virais*, Brasília, ano 1, n. 3, p. 1-4, set. 2003.
- DIAZ, R. S. *Guia para o manuseio de testes de resistência anti-retroviral no paciente infectado pelo HIV-1*. São Paulo: Abbott, 2004.
- DURANT, J. et al. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial [see comments]. *Lancet*, London, v. 353, n. 9171, p. 2173-2174, Jun. 1999.
- FRATER, J. et al. Association between secondary mutations in human immunodeficiency virus type 1 protease and therapeutic outcome. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 185, n. 1376, 2002.
- GATELL, J. M. et al. Documento de consenso de GESIDA sobre la utilización de los estudios de resistencias en la practica clínica. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.*, Barcelona, v. 19, Feb. 2001.
- GURTLER, L. G. P. H. et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameron. *J. Virol.*, Washington, v. 68, p. 1581-1585, 1994.
- HERTTOGS, K. et al. A rapid method for simultaneous detection of phenotypic resistance to inhibitors of protease and reverse transcriptase in recombinant human immunodeficiency virus type 1 isolates from patients treated with antiretroviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother*, Washington, v. 42, p. 269-276, 1998.
- HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults infected with human immunodeficiency virus type 1: 2003 recommendations of an International AIDS society-USA Panel. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 37, p. 113-128, Jul. 2003.
- HIRSCH, M. S. et al. Antiretroviral drug resistance testing in adults With HIV infection: implications for clinical management. *JAMA*, Chicago, v. 279, p. 1984-1991, 1998.
- LEDERGERBER, B. et al. Clinical Progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. *Lancet*, London, v. 353, p. 863-868, 1999.

LITTLE, S. J. et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 347, n. 6, p. 438-439, Ago. 2002.

LITTLE, S. J. et al. Reduced antiretroviral drug susceptibility among patients with primary HIV infection. *JAMA*, Chicago, v. 282, p. 1142-1149, 1999.

LOUWAGIE, J. F. E. et al. Phylogenetic analysis of gag genes from 70 international HIV-1 isolates provides evidence for multiple genotypes. *AIDS*, Philadelphia, v. 7, p. 769-780, 1993.

MANSKY, L. M.; TEMIN, H. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.*, Washington, v. 69, p. 5087-5094, 1995.

MEDEIROS, L. B. *Resistência primária do HIV-1 em pacientes atendidos no Serviço de Referência HIV/AIDS do Hospital das Clínicas da UFPE*. 2005. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

MORGADO, M. G. et al. Molecular epidemiology of HIV-1 in Brazil: high prevalence of HIV-1 subtype B and identification of an HIV-1 subtype D infection in the city of Rio de Janeiro, Brazil. Evandro Chagas Hospital AIDS Clinical Research Group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*, Hagerstown, v. 18, n. 5, p. 488-494, 1998.

MORTENSEN, C.; AZEVEDO, M. L.; MUNERATO, P. *Manual de genotipagem do HIV*. São Paulo: Applied Biosystems do Brasil, 2002.

MUNERATO, P. et al. Patterns of HIV-1 genotypic antiretroviral resistance in clinical practice: a survey of the Brazilian network for genotypic resistance. In: IAS CONFERENCE OF HIV PATHOGENESIS AND TREATMENT, 3., 2005, Rio de Janeiro. *Abstract book*. Geneva: International Aids Society, 2005. p. 36.

PERELSON, A. S. et al. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, Washington, v. 271, p. 1582-1586, 1996.

PETROPOULOS, C. J. et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother*, Washington, v. 44, p. 920-928, 2000.

PIRES, I. L. et al. Prevalence of human immunodeficiency virus drug resistance mutations and subtypes in drug-naive, infected individuals in the army health service of Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 42, n. 1, p. 426-430, 2004.

PUIG, T. et al. Prevalence of genotypic resistance to nucleoside analogues and protease inhibitors in Spain. *AIDS*, Philadelphia, v. 14, p. 727-732, 2000.

RICHMAN, D. D. New strategies to combat HIV drug resistance. *Hosp. Prac.*, New York, v. 6, p. 47-58, 1996.

ROBERTSON, D. L. et al. HIV-1 nomenclature proposal. *Science*, Washington, v. 288, p. 55-56, 2000.

ROBERTSON, D. L. et al. Recombination in HIV-1. *Nature*, London, v. 374, p. 124-126, 1995.

RODRIGUES, R. et al. Antiretroviral resistance mutations in human immunodeficiency virus type 1 infected patients enrolled in genotype testing at Central Public Health Laboratory, São Paulo, Brazil: preliminary results. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 97-102, Feb. 2005.

ROLAND, M. E. The impact of genotypic antiretroviral resistance testing (GART) in patients failing antiretroviral therapy: CPCRA 046 (The GART Study). *HIV resistanceWeb*, [S. 1], abr. 1999. Disponível em: <<http://www.hivresistanceweb.com/protected/po/mr-99apr-gart.shtml>>. Acesso em: 10 out. 2003.

ROSS, L. et al. Viral genetic heterogeneity in HIV-1 infected individuals is associated with increasing use of HAART and higher viremia. *AIDS*, Philadelphia, v. 14, p. 813-819, 2000.

SAAG, M. S. et al. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 in vivo. *Nature*, London, v. 334, 440-444, 1988.

SABINO, E. C. et al. Identification of human immunodeficiency virus type 1 envelop genes recombinant between subtype B and F in Two epidemiologically linked individuals from Brazil. *J. Virol.*, Washington, v. 68, p. 6340-6346, 1994.

SABINO, F. C. et al. Distribution of HIV -1 subtypes seen in an AIDS clinic in São Paulo city, Brazil. *AIDS*, Philadelphia, v. 10, p. 1579-1584, 1996.

SHAFER, R. W. et al. Multiple concurrent reverse transcriptase and mutations multidrug resistance of HIV-1 isolates from heavily treated patients. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v. 128, p. 906-911, 1998.

SHAFER, R. W. Genotypic testing for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 15, p. 247-277, 2002.

SIMON, F. P. et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.*, New York, v. 4, p. 1032-1037, 1998.

SOARES et al. Epidemiologic and molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 in southern Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, New York, v. 34, n. 5, Dec. 2003.

SOTO-RAMIREZ, L. E. et al. HIV-1 langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science*, Washington, v. 271, p. 1291-1293, 1996.

STANFORD UNIVERSITY. *Stanford Sequence Resistance Database*. Stanford, 2005. Disponível em: <<http://hivdb.stanford.edu>>. Acesso em: 20 jun. 2004.

SUCUPIRA, M. C. et al. Antiretroviral treatment failure and HIV-1 genotypic resistance in Sao Paulo, Brazil. *Antivir. Ther.*, London, v. 6, p. 263-264, 2002.

TAMALET, C. et al. Prevalence of drug resistant mutants and virological response to combination therapy in patients with primary HIV-1 infection. *J. Med. Virol.*, New York, v. 61, p. 181-186, 2000.

TAMBUSSI, G. et al. Prevalence of mutation associated with resistance to nucleoside analogues in a cohort of naive HIV-1 positive subjects during the period 1984-1997. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, Milano, v. 12, suppl. 1/2, p. 32-34, 1998.

TANURI, A. et al. HIV-1 subtypes among blood from Rio de Janeiro Brazil. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.*, Hagerstown, v. 20, p. 60-66, 1999.

TANURI, A. et al. Prevalence of mutations related to HIV-1 antiretroviral resistance in Brazilian patients failing HAART. *J. Clin. Virol.*, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-46, 2002.

THOMSON, M. M.; PÉREZ-ÁLVAREZ, L.; NÁJERA, R. Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet*, London, v. 2, p. 461-471, Ago. 2002.

UK COLLABORATIVE GROUP ON MONITORING THE TRANSMISSION OF HIV DRUG RESISTANCE. Analysis of prevalence of HIV-1 drug resistance in primary infection in the United Kingdom. *BMJ*, London, v. 322, p. 1087-1088, 2001.

VAN VAERENBERGH, K. et al. Prevalence of genotypic resistance among antiretroviral drug-naïve HIV-1 infected patients in Belgium. *Antivir. Ther.*, London, v. 6, p. 63-70, 2001.

WALERIA-ALEIXO, A.; CLETO, S. C.; GREGO, D. B. HIV-1 protease gene resistance profile among individuals failinghaart in Minas Gerais, Brazil. In: SIMPAIDS 2005 - SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PESQUISA EM HIV/AIDS, 6., 2005, Ouro Preto, MG. *Programas e temas livres*. Belo Horizonte: Centro de Estudos em Imunologia e Imunodeficiência, 2005. p. 46.

YERLY, S. et al. Transmission of antiretroviral-drug-resistant HIV-1 variants. *Lancet*, London, v. 354, p. 729-733, Aug. 1999.

ZAID, I. et al. Prevalence of mutations associated with antiretroviral drug resistance among HIV-1-infected persons in 10 US cities, 1997-2000. *Antivir. Ther.*, London, v. 6, suppl. 1, p. 118, 2001.

APÊNDICE A - Levantamento Individual dos Dados dos Pacientes

LEVANTAMENTO INDIVIDUAL DOS DADOS DOS PACIENTES

- 1-Numero da amostra _____ 2-UF _____
- 3-Data da entrada: _____ / _____ / _____
- 4-Nome: _____
- 5-Data de nascimento: _____ / _____ / _____ 6-Idade: _____ (anos)
- 7-Sexo masc _____ Fem _____ 8-Cidade de residência atual: _____
- 9-Diagnóstico sorológico da infecção pelo HIV: 9.1: ano _____
9.1-numero de meses _____ 9.2 Ignorado _____
- 10-Compareceu às 3 últimas consultas? Sim _____ Não _____ Ign _____
- 11-Sintomas: sim _____ Não _____ Ign _____
- 12-Ultimo CD₄: _____ cels/mm³ data: _____ / _____ / _____
- 13-Ultima Carga Viral: _____ Log _____ data _____ / _____ / _____
- 14-Tempo de uso de antiretrovirais: _____ meses Ignorado _____
- 15-Falência ao 1ºesquema: sim _____ Não _____
- 16-Numero de esquemas terapeuticos: _____ 17-Esquemas usados:

| DROGAS | DATA INÍCIO Mês/ano | DATA FIM Mês/ano |
|--------|------------------------|---------------------|
| 1- | | |
| 2- | | |
| 3- | | |
| 4- | | |
| 5- | | |
| 6- | | |
| 7- | | |
| 8- | | |
| 9- | | |
| 10- | | |
| 11 | | |
| 12 | | |

Dados do resultado da GENOTIPAGEM:

18-Data da coleta: _____ / _____ / _____ 19-Subtipo: _____ Ignorado _____

20-Amostra amplificada: Sim _____ Não _____

21-Amostra com mutação: Sim _____ Não _____

22-Amostra com mutação somente na RT: Sim _____ Não _____

22.1-Mutação para ITRN: Sim _____ Não _____

22.2-Mutação para ITRNN: Sim _____ Não _____

23-Amostra com mutação somente na PR: Sim _____ Não _____

24-Amostra com mutação na RT e na PR: Sim _____ Não _____

25-Amostra com MDR: Sim _____ Não _____

26-Presença de inserções: Sim _____ Não _____ Qual? _____

27-Mutações encontradas na RT para ITRN:

27.1-Principal: _____

27.2-Secundária: _____

28- Mutações encontradas na RT para INNTR:

28.1-Principal: _____

28.2-Secundária: _____

29- Mutações encontradas na PR:

29.1-Principal: _____

29.2-Acessórias: _____

ANEXO A - Drogas utilizadas na terapia anti retroviral (TARV).

| Drogas utilizadas na terapia anti retroviral (TARV) | | |
|---|----------------------------|-----------------------|
| Classe Farmacológica | Medicamentos | Nome Comercial |
| Inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN) | Zidovudina (AZT) | Retrovir |
| | Didanosina (ddI) | Videx |
| | Zalcitabina (ddC) | Hivid |
| | Estavudina (d4T) | Zeritavir ou Zerit |
| | Lamivudina (3TC) | Epivir |
| | Abacavir (ABC) | Ziagen |
| | Tenofovir (TDF) | Viread |
| | Zidovudina + Lamivudina | Biovir ou Combivir |
| Inibidores da transcriptase reversa não análogos nucleosídeos (ITRNN) | Nevirapina (NVP) | Viramune |
| | Delavirdina (DLV) | Rescriptor |
| | Efavirenz (EFV) | Stocrin ou Sustiva |
| Inibidores da protease (IP) | Saquinavir (SQV) | Invirase |
| | Indinavir (IDV) | Crixivan |
| | Ritonavir (RTN) | Norvir |
| | Nelfinavir (NFV) | Viracept |
| | Amprenavir (APV) | Agenerase |
| | Lopinavir/Ritonavir(LPV/r) | Kaletra |

ANEXO B - Rede de Laboratorios de Genotipagem-Renageno

| REDE DE LABORATORIOS DE GENOTIPAGEM-RENAGENO | |
|---|-----------------------------------|
| ESTADOS | QUANTIDADE DE LABORATÓRIOS |
| Bahia | 01 |
| Distrito Federal | 01 |
| Minas Gerais | 01 |
| Pará | 01 |
| Pernambuco | 01 |
| Rio Grande do Sul | 01 |
| Rio de Janeiro | 04 |
| São Paulo | 05 |
| Ceará | 01 |
| Espírito Santo | 01 |
| Paraná | 01 |
| TOTAL | 18 |

ANEXO D - Parecer do Médico de Referência em Genotipagem.

| | | | | |
|---|---|---|--|---|
| Ministério da Saúde | | Parecer do Médico de Referência em Genotipagem | | Formulário B |
| | | CN-DST/Aids Secretaria de Políticas de Saúde | | Nº do parecer _____ |
| 1. Unidade de Saúde onde realiza o tratamento | | | | |
| 2. CNPJ da Unidade de Saúde | | 3. Telefones de contato | | |
| DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE | | | | |
| 4. Nome (por extenso sem abreviações) | | | | |
| 5. Número do cartão CN-DST/AIDS | | 6. Número de identidade | | 7. Tipo de documento |
| 8. Data de nascimento | | 9. Sexo Masculino <input type="checkbox"/> Feminino <input type="checkbox"/> | | 10. Prontuário |
| | | | | 11. Gestante Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> |
| 12. Data do recebimento da solicitação Data: ____/____/____ | | 13. CRM do médico solicitante CRM/UF: ____/____ | | 14. Nome do médico solicitante |
| 15. Deferimento Pedido Indeferido <input type="checkbox"/> Pedido Deferido <input type="checkbox"/> | | 16. Motivo(s) | | |
| 17. Nome do Médico de Referência em Genotipagem | | | | |
| 18. Telefone de contato | | 19. Fax de contato | | 20. E-mail de contato |
| 21. Data do parecer Data: ____/____/____ | | 23. Médico de Referência em Genotipagem | | |
| 22. CRM do Médico de Referência em Genotipagem CRM/UF: ____/____ | | Carimbo e assinatura | | |
| PARA PREENCHIMENTO PELO LOCAL DE COLETA | | | | |
| 24. Nome da instituição | | | 25. Data da coleta | 26. Hora coleta |
| PARA PREENCHIMENTO PELO LABORATÓRIO EXECUTOR DO EXAME | | | | |
| 27. Nome da instituição | | | 28. Data do recebimento | 29. Hora |
| Genotipagem | 30. Identificador da amostra no laboratório | | 31. Condições de chegada da amostra <input type="checkbox"/> 1-Amostra adequada / 2-Amostra hemolisada / 3-Amostra em frasco inadequado / 4-Amostra mal identificada / 5-Amostra mal acondicionada / 7-Outros | |
| | 32. Responsável pelo preenchimento | | | |

ANEXO E - Consentimento Livre Esclarecido: Coordenação Nacional DST/Aids - Ministério da Saúde, Rede Nacional de Genotipagem

**CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO:
COORDENAÇÃO NACIONAL DST/AIDS - MINISTÉRIO DA SAÚDE
REDE NACIONAL DE GENOTIPAGEM**

O Ministério da Saúde e a Coordenação Nacional de DST/Aids, em conjunto com outras instituições públicas, procurando detectar a ocorrência de resistência do vírus da Imunodeficiência Humana - HIV em indivíduos que estejam utilizando medicamentos anti-retrovirais, vem procurando implantar uma rede nacional de laboratórios aptos a executar o exame conhecido como genotipagem. A realização desse exame, além de possibilitar a obtenção de informações ligadas à capacidade desse vírus de resistir aos medicamentos anti-retrovirais disponíveis, também poderá contribuir nas ações de combate à AIDS. A resistência do HIV aos medicamentos pode comprometer a capacidade dessas drogas beneficiarem as pessoas infectadas. Para a realização desse estudo, é necessário que seja colhido 10 ml do seu sangue. Uma ou mais coletas posteriores podem ser solicitadas a você, mas a autorização a essa coleta atual não o obriga a aceitar coletas posteriores. O sangue por você doado, além de permitir o isolamento e a caracterização do HIV, também deverá ter uma parte preservada para análises posteriores em instituições ligadas ao Ministério da Saúde ou à Organização Mundial da Saúde porém sempre dentro dos objetivos descrito acima. Caso alguma metodologia nova venha usar o material por você doado e isso traga informações que possa beneficiá-lo, essas informações estarão à sua disposição, sendo repassadas à unidade de saúde onde você está sendo acompanhado, após aprovação de um comitê de bioética. Você não tem nenhuma obrigação de contribuir para esse ou outro estudo, e sua recusa não ocasionará nenhum prejuízo em seu atendimento médico. A eventual concordância agora não implica em nenhuma obrigação de coletas futuras. Se você concordar em participar dessa pesquisa, acontecerá o seguinte:

- um dos pesquisadores, seu médico ou alguém da equipe de saúde poderá fazer uma breve entrevista e após consulta em seu prontuário, deverá preencher um formulário de solicitação do exame de genotipagem no qual deverá constar o seu nome, dados de identificação, dentre outras informações. Todas essas informações serão anotadas de forma confidencial. Mesmo participando do estudo, você poderá se recusar a fornecer algumas das informações solicitadas, desde que isso não comprometa a avaliação do exame. Em momento algum seu

nome será associado à entrevista em publicações do estudo. O resultado dessa pesquisa, se divulgado, irá garantir o total anonimato e a confidencialidade dos participantes.

- será coletado 10 ml de sangue do seu braço. Como em qualquer coleta de sangue, costuma haver desconforto local e risco da formação de hematoma leves. Todas as medidas habituais serão tomadas para que isso não aconteça. Sempre que possível, essa coleta será realizadas junto aos exames de rotina, evitando-se assim, coletas extras.

- os resultados dos exames de genotipagem serão encaminhados para a unidade de saúde onde você é acompanhado. Qualquer dúvida, favor contactar seu médico em sua unidade de saúde ou a Unidade de Assistência, Diagnóstico e Tratamento (UDAT) da CN DST AIDS pelos telefones 0XX-61-448 8008 ou 448 8009 Eu, abaixo assinado, responsabilizo-me pelo cumprimento das condições aqui expostas. Maria Candida de Souza Dantas - representante da Coordenação Nacional DST e Aids

Nome do médico responsável pelo pacientes na unidade de saúde.

Após leitura do texto acima, afirmo ter compreendido o propósito do estudo e concordo em participar dessa pesquisa.

Nome: _____ Local _____

Data ___/___/200__

ANEXO F – Cópia de um Laudo Celera Diagnostic/Abbott.



FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Antiretroviral Drug Resistance Report ^{1,2,3}

LACEN-PE-VIROLOGIA
 Praca Oswaldo Cruz, s/n-Boa Vista
 Recife- PE
 Tel: 81-34126308
 Fax: 81-34126340
 Email: a_salustiano@yahoo.com.br
 Laboratory Director: Dr. Jose Luis de Oliveira Magalhaes

Patient:
 D.O.B.: December 31, 1966
 Ordering Physician:
 Accession Number:
 Date Drawn: June 14, 2005
 Date Reported: July 13, 2005
 Laboratory Technician: Ana Salustiano/Sirleide Pereira

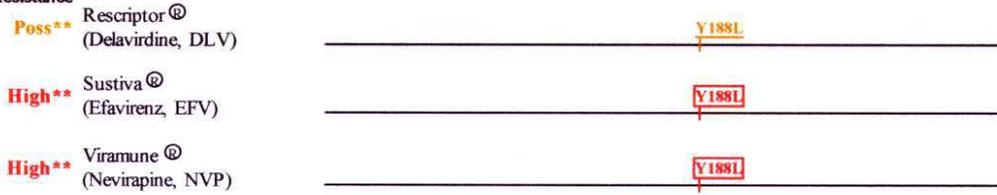
Signature: _____

Evidence of Resistance Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

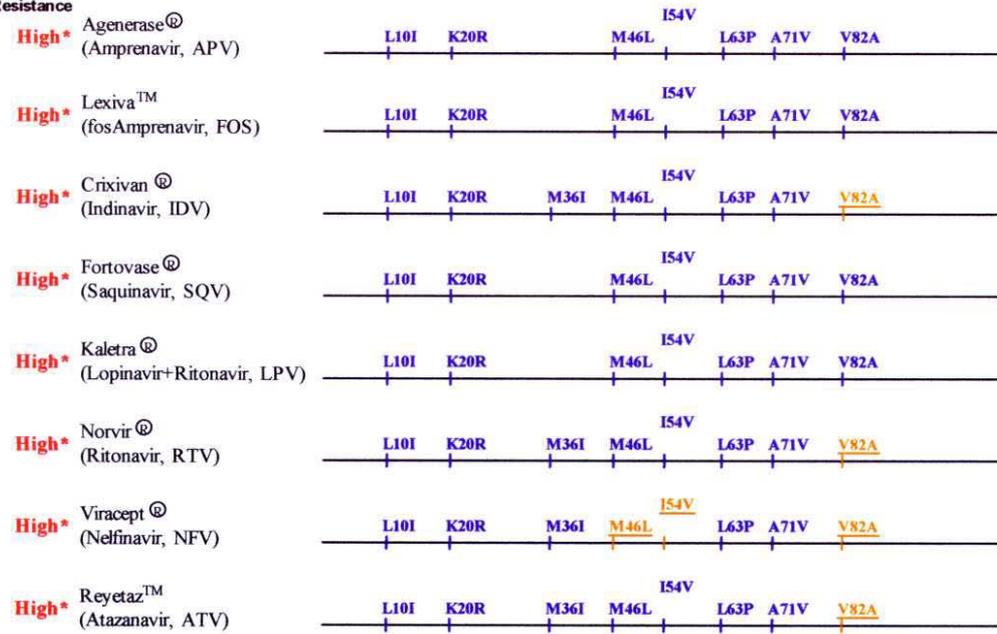
| | | | |
|--------------|--|------|-------|
| None | Epivir [®] (Lamivudine, 3TC) | D67N | T215Y |
| None | Emtriva [™] (Emtricitabine, FTC) | D67N | T215Y |
| None | HIVID [®] (Zalcitabine, ddC) | D67N | T215Y |
| Poss* | Retrovir [®] (Zidovudine, AZT) | D67N | T215Y |
| None | Videx [®] (Didanosine, ddI) | D67N | T215Y |
| Poss* | Zerit [®] (Stavudine, d4T) | D67N | T215Y |
| None | Ziagen [®] (Abacavir, ABC) | D67N | T215Y |
| None | Viread [®] (Tenofovir, TDF) | D67N | T215Y |

* Note - at least one mutation shown has not been fully validated.
 ** Note - at least one mutation shown has not been clinically verified
 *** For at least one mutation, both notes above apply.
 (SEE FOOTNOTE 3 FOR MUTATION SPECIFIC INFORMATION.)

Evidence of Resistance Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors



Evidence of Resistance Protease Inhibitors



* Note - at least one mutation shown has not been fully validated.
 ** Note - at least one mutation shown has not been clinically verified
 *** For at least one mutation, both notes above apply.
 (SEE FOOTNOTE 3 FOR MUTATION SPECIFIC INFORMATION.)

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE

Novel Mutations (HXB-2 variants not in HIV-1 Resistance Mutation List)

| | |
|-----------------------|---|
| Protease | V3I, K14R, I15V, L23I, S37N, R41K, I62V, I64V, L76V, I93L |
| Reverse Transcriptase | K20R, K101P, D123E, I135T, S162C, I178L, Q207E, L214F, P243S, V245E, P272A, R277K, A288G, I293V, E297K, I329L |

Software Version: ViroSeq v2.6
Profile Version: hiv3.0-di3.0.10-dl3.0.16-fn2.19-rs1.21

* Note - at least one mutation shown has not been fully validated.
** Note - at least one mutation shown has not been clinically verified
*** For at least one mutation, both notes above apply.
(SEE FOOTNOTE 3 FOR MUTATION SPECIFIC INFORMATION.)

1 EVIDENCE OF RESISTANCE RATING NOTATION KEY

- High** indicates that mutations present constitute a high level of genetic evidence for viral resistance.
Poss indicates that mutations present suggest the possibility of viral resistance.
None indicates that there is insufficient evidence for viral resistance.

2 MUTATION NOTATION KEY

- Red bold boxed** Presence of this mutation alone confers viral resistance.
Orange bold underlined Presence of this mutation alone confers the possibility of viral resistance.
Blue bold This mutation must appear with at least one other mutation to confer the possibility of viral resistance.

3 HIV-1 RESISTANCE MUTATION LIST

Footnote markers *, **, and *** apply only to the mutation that is marked. Unmarked mutations are fully validated.

NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

EpiVir (lamivudine, 3TC) and Emtriva (emtricitabine, FTC): ****M184I M184V** K65R ****69ins** M41L ****E44A** *E44D A62V ****D67E/G** *D67N K70R *V75I F77L F116Y V118I ****Q151L Q151M** L210W T215F/Y K219E/Q ****K219N/R**
 HIViD (zalcitabine, ddC): K65R T69D ****T69N** ****69ins** ****L74I L74V** ****Q151L Q151M** ****T69A/M** ****V75A/M/T** ****M184I M184V** M41L ****E44A** *E44D A62V ****D67E/G** *D67N K70R *V75I F77L F116Y V118I L210W ****T215C/D/E/I/SV** T215F/Y K219E/Q ****K219N/R**
 Retrovir (zidovudine, AZT): ****69ins** ****Q151L Q151M** T215F/Y M41L ****E44A** *E44D A62V ****D67E/G** *D67N K70R *V75I F77L F116Y V118I L210W ****T215C/D/E/I/SV** K219E/Q ****K219N/R** ****G333D/E**
 Videx (didanosine, ddI): K65R ****69ins** ****L74I L74V** ****Q151L Q151M** M41L ****E44A** *E44D A62V ****D67E/G** *D67N ****T69A/I/N/S** T69D K70R ****V75A/M/T** *V75I F77L F116Y V118I ****M184I M184V** L210W T215F/Y K219E/Q ****K219N/R**
 Zerit (stavudine, d4T): ****69ins** ****V75A/M/S/T** ****Q151L Q151M** T215F/Y M41L ****E44A** *E44D A62V K65R ****D67E/G** *D67N *V75I F77L F116Y V118I L210W ****T215C/D/E/I/SV** K219E/Q ****K219N/R**
 Ziagen (abacavir, ABC): ****69ins** ****Q151L Q151M** M41L ****E44A** *E44D A62V K65R ****D67E/G** *D67N K70R ****L74I L74V** *V75I F77L *Y115F F116Y V118I ****M184I M184V** L210W T215F/Y K219E/Q ****K219N/R**
 Viread (tenofovir, TDF): K65R ****69ins** M41L *D67N K70R *V75I F77L F116Y ****Q151L Q151M** L210W T215F/Y K219E/Q ****K219N/R**

NON-NUCLEOSIDE REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Rescriptor (delavirdine, DLV): K103N Y181C ***Y181I** ****Y181V** ****P236L** *L100I ***K101E** ****K103S/T** ****V106A** ****Y106M** ****V108I** ****Y188C/L** ****Y188H** ****G190E** ****M230I** ****Y318E** ****A98G** ****K101Q** ****V179D/E**
 Sustiva (efavirenz, EFV): K103N ****Y188I** ****G190E** ***G190S** *L100I ****K103S** ****V106A** ****V106M** **Y181C** ***Y181I** ****Y188C** ****Y188H** ***G190A** ****P225H** ****M230I** ****A98G** ***K101E** ****K101Q** ***V108I** ****V179D/E**
 Viramune (nevirapine, NVP): K103N ****V106A** ****V106M** **Y181C** ***Y181I** ****Y181V** ****Y188C/L** ****Y188H** ***G190A/S** ****G190E** *L100I ***K101E** ****K103S/T** ***V108I** ****M230I** ****A98G** ****K101Q** ****V179D/E** ****F227L**

PROTEASE INHIBITORS

Agenerase (amprenavir, APV) and Lexiva (fos-amprenavir, FOS): ****I50V** ****I54L/M** **I84V** *V32I *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R *L33F M46I *M46L ****M46V** *I47V *I54T I54V L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S V82A/T ****V82F/S** L90M
 Crixivan (indinavir, IDV): V82A/T ****V82F/S** **I84V** **L90M** *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R ****L24I** *V32I M36I M46I *M46L ****M46V** *I47V G48V *F53L ****I54L/M** *I54T I54V L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S *V77I *N88D ****N88S/T**
 Fortovase (saquinavir, SQV): G48V **I84V** **L90M** *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R M46I *M46L ****M46V** *F53L ****I54L/M** *I54T I54V L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S *V77I
 Kaletra (lopinavir+ritonavir, LPV): *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R ****L24I** *V32I *L33F M46I *M46L ****M46V** ****I47A** *I47V G48V ****I50V** *F53L ****I54A/L/M** *I54T I54V L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S V82A/T ****V82F/S** I84V L90M
 Norvir (ritonavir, RTV): V82A/T ****V82F/S** **I84V** **L90M** *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R ****L24I** *V32I *L33F M36I M46I *M46L ****M46V** *I47V G48V ****I50V** *F53L ****I54L/M** *I54T I54V L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S *V77I
 Viracept (nelfinavir, NFV): D30N **L90M** **M46I** *M46L ****M46V** G48V ****I54L/M** *I54T I54V V82A/T ****V82F/S** **I84V** ****N88D** ****N88S/T** *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R M36I ****M36V** L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S *V77I
 Reyataz (atazanavir, ATV): ****I50L** V82A/T ****V82F/S** **I84V** *L10F/V L10I ****L10R** *K20M K20R ****L24I** *V32I *L33F M36I ****M36L/V** M46I *M46L ****M46V** G48V *F53L ****I54L/M** *I54T I54V L63P *A71T A71V ****G73A/C/T** *G73S ****N88D** ****N88S/T** L90M

* Note - at least one mutation shown has not been fully validated.
 ** Note - at least one mutation shown has not been clinically verified
 *** For at least one mutation, both notes above apply.
 (SEE FOOTNOTE 3 FOR MUTATION SPECIFIC INFORMATION.)

ANEXO G - Tabela Mutações - Ias

International AIDS Society–USA Topics in HIV Medicine

MUTATIONS IN THE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO REVERSE TRANSCRIPTASE INHIBITORS

Nucleoside and Nucleotide Reverse Transcriptase Inhibitors

| | | | | | | | | |
|---|----|----|----|--------|-----|-----|-----|-----|
| Multi-nRTI Resistance: 151 Complex | A | V | F | F | Q | | | |
| | 62 | 75 | 77 | 116 | 151 | | | |
| | V | I | L | Y | M | | | |
| Multi-nRTI Resistance: 69 Insertion Complex | M | A | D | K | | | L | T |
| | 41 | 62 | 67 | 69 | 70 | | 210 | 215 |
| | L | V | N | Insert | R | | W | Y |
| Multi-nRTI Resistance: NAMs ² | M | E | D | K | V | | L | T |
| | 41 | 44 | 67 | 70 | 118 | | 210 | 215 |
| | L | D | N | R | I | | W | Y |
| Zidovudine ^{3,4} | M | E | D | K | V | | L | T |
| | 41 | 44 | 67 | 70 | 118 | | 210 | 215 |
| | L | D | N | R | I | | W | Y |
| Stavudine ^{3,5} | M | E | D | K | V | | L | T |
| | 41 | 44 | 67 | 70 | 118 | | 210 | 215 |
| | L | D | N | R | I | | W | Y |
| Didanosine ^{6,7} | | K | | L | | | | |
| | | 65 | | 74 | | | | |
| | | R | | V | | | | |
| Zalcitabine | | K | T | L | | M | | |
| | | 65 | 69 | 74 | | 184 | | |
| | | R | D | V | | V | | |
| Abacavir ⁸ | | K | | L | Y | M | | |
| | | 65 | | 74 | 115 | 184 | | |
| | | R | | V | F | V | | |
| Lamivudine ⁹ | | E | | | V | M | | |
| | | 44 | | | 118 | 184 | | |
| | | D | | | I | V | | |
| Tenofovir ^{3,10} | | K | | | | | | |
| | | 65 | | | | | | |
| | | R | | | | | | |

Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors

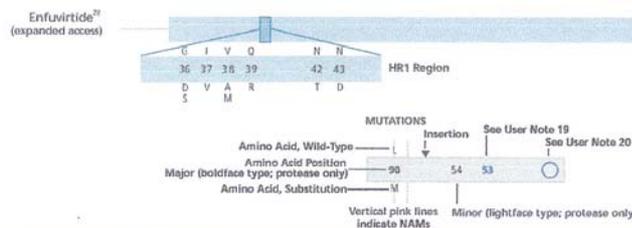
| | | | | | | | | |
|---|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Multi-NNRTI Resistance ¹¹ | | K | | | Y | | | |
| | | 103 | | | 188 | | | |
| | | N | | | L | | | |
| Multi-NNRTI Resistance: Accumulation of Mutations ¹² | | L | V | | Y | G | | M |
| | | 100 | 106 | | 181 | 190 | | 230 |
| | | I | A | | C | S | | L |
| | | I | A | | I | A | | |
| Nevirapine | | L | K | V | V | Y | Y | G |
| | | 100 | 103 | 106 | 108 | 181 | 188 | 190 |
| | | I | N | A | I | C | C | A |
| | | I | N | A | I | I | L | H |
| Delavirdine ¹³ | | K | | | Y | Y | | P |
| | | 103 | | | 181 | 188 | | 236 |
| | | N | | | C | L | | L |
| Efavirenz ^{13,14} | | L | K | V | | Y | Y | G |
| | | 100 | 103 | 108 | | 181 | 188 | 190 |
| | | I | N | I | | C | L | S |
| | | I | N | I | | I | A | H |

MUTATIONS IN THE PROTEASE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO PROTEASE INHIBITORS

Protease Inhibitors¹⁶

| Protease Inhibitor | 10 | 20 | 24 | 32 | 33 | 36 | 46 | 47 | 50 | 53 | 54 | 55 | 63 | 71 | 73 | 77 | 82 | 84 | 88 | 90 |
|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Multi-PI Resistance: Accumulation of Mutations ¹⁷ | L | | | | | | M | | | | I | | | V | I | | L | | | |
| | 10 | | | | | | 46 | | | | 54 | | | 82 | 84 | | 90 | | | |
| | F | | | | | | L | | | | V | | | A | V | | V | | | M |
| | I | | | | | | | | | | M | | | F | | | T | | | |
| | R | | | | | | | | | | L | | | S | | | I | | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | T | | | A | | | |
| Indinavir ¹⁸ | L | K | L | | V | M | M | | | | I | | | A | G | V | V | I | | L |
| | 10 | 20 | 24 | | 32 | 36 | 46 | | | | 54 | | | 71 | 73 | 77 | 82 | 84 | | 90 |
| | I | M | I | | I | I | L | | | | V | | | V | S | I | A | V | | M |
| | R | | | | | | | | | | | | | T | A | | F | | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | | | | T | | | |
| Ritonavir | L | K | | | V | L | M | | | | I | | | A | | V | V | I | | L |
| | 10 | 20 | | | 32 | 33 | 36 | | | | 46 | | | 54 | | 71 | 77 | 82 | 84 | 90 |
| | F | M | | | I | F | I | | | | L | | | V | | T | I | A | V | M |
| | I | | | | | | | | | | | | | L | | | | F | | |
| | R | | | | | | | | | | | | | | | | | T | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | | | | | S | | |
| Saquinavir | L | | | | | | | | G | | I | | | A | G | V | V | I | | L |
| | 10 | | | | | | | | 48 | | 54 | | | 71 | 73 | 77 | 82 | 84 | | 90 |
| | I | | | | | | | | V | | V | | | V | S | I | A | V | | M |
| | R | | | | | | | | | | L | | | T | | | | | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Nelfinavir | L | | | D | | M | M | | | | | | | A | | V | V | I | N | L |
| | 10 | | | 30 | | 36 | 46 | | | | | | | 71 | 77 | 82 | 84 | 88 | 90 | |
| | F | | | N | | I | L | | | | | | | V | | I | A | V | D | M |
| | I | | | | | | | | | | | | | T | | | F | | S | |
| | R | | | | | | | | | | | | | | | | T | | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | | | | S | | | |
| Amprenavir | L | | | V | | M | I | I | I | | | | | G | | | | I | | L |
| | 10 | | | 32 | | 46 | 47 | | 50 | | 54 | | | 73 | | | | 84 | | 90 |
| | F | | | I | | L | V | V | V | | L | | | S | | | | V | | M |
| | I | | | | | | | | | | V | | | | | | | | | |
| | R | | | | | | | | | | M | | | | | | | | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Lopinavir/Ritonavir ^{19,20} | L | K | L | | V | L | M | I | I | F | I | L | | A | G | | V | I | | L |
| | 10 | 20 | 24 | | 32 | 33 | 46 | 47 | 50 | 53 | 54 | 63 | | 71 | 73 | | 82 | 84 | 88 | 90 |
| | I | M | I | | I | F | L | V | V | L | V | P | | V | S | | A | V | | M |
| | R | | | | | | | | | | | | | T | | | F | | | |
| | V | | | | | | | | | | | | | | | | T | | | |
| Atazanavir ²¹ (expanded access) | | | | V | | M | I | I | | | | | | A | | V | I | N | L | |
| | | | | 32 | | 46 | 50 | 54 | | | 71 | | | 71 | | 82 | 84 | 88 | 90 | |
| | | | | I | | I | L | L | | | V | | | V | | A | V | S | M | |

MUTATIONS IN THE GP41 ENVELOPE GENE ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO ENTRY INHIBITORS



For each amino acid residue, the letter above the bar indicates the amino acid associated with wild-type virus and the letter(s) below indicate the substitution(s) that confer viral resistance. The number shows the position of the mutation in the protein. Mutations selected by protease inhibitors in Gag cleavage sites are not listed because their contribution to resistance is not yet fully defined. HR1 indicates first heptad repeat; NAMs indicates nRTI-associated mutations; nRTI indicates nucleoside reverse transcriptase inhibitor; NNRTI indicates nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; PI indicates protease inhibitor. The figures were last published in *Topics in HIV Medicine* in June 2002.

Amino acid abbreviations: A, alanine; C, cysteine; D, aspartate; E, glutamate; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.

ANEXO H - Cópia do Comitê de Ética do Projeto Original-MS



MINISTERIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1121/2001

Registro CONEP = 2857 (Este nº deverá ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Protocolo CEP = -

Processo nº 25000.100823/2001-54

Projeto de Pesquisa: "Projeto de implantação de uma rede nacional de genotipagem do HIV-1 (RENAGENO) em pacientes com falha terapêutica aos anti-retrovirais"

Pesquisador Responsável: Dra. Maria Cândida Souza Dantas (Biomédica)

Instituição: MS - Serviço de Assistência Especializada em HIV / AIDS do SUS
Grupo III (MS)

Ao se proceder à análise do protocolo em questão, cabem as seguintes considerações:

- a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;
- b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta - se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado.

Brasília, 20 de setembro, de 2001.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP-MS